

De voordrachten, uitgesproken tijdens het symposium 'Endocrinologie' leverden het materiaal voor deze uitgave.

Het symposium vond plaats op 25 en 26 maart 1977 in Amsterdam, en werd georganiseerd door de Biologische Raad van de Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen.

In de redactiecommissie voor deze uitgave hadden zitting: prof. dr. J. Lever (voorzitter), prof. dr. J. de Wilde, drs. H.M. van Emden (Biologische Raad) en R.J.P. Aalpol (Pudoc).

Dirk-77-5 52

endocrinologie

J. Lever en J. de Wilde (redactie)



Centrum voor Landbouwpublikaties en Landbouwdocumentatie

Wageningen – 1978

BIBLIOTHEEK
LANDBOUWVERSCHOOL
WAGENINGEN

Toelichting op de omslagillustratie:

Het endocriene systeem heeft een hiërarchische organisatie. Aan de top staat het neuro-endocriene complex, dat de verbinding vormt met het zenuwstelsel. Aldus worden de twee systemen, die de coördinatie en integratie van de levensfuncties verzorgen, gekoppeld.

Het neuro-endocriene systeem oefent zijn werking uit via gespecialiseerde zenuwcellen, de neuro-secretorische cellen, die via hun axonen hormonen transporteren naar gespecialiseerde axon-uiteinden of eindorganen (neurohemale organen) waar ze aan de bloedbaan worden afgegeven. Op hun beurt kunnen deze neuro-hormonen gesubordineerde endocriene klieren tot werking aanzetten. Tussen deze klieren en de neuro-endocriene centra bestaan terugkoppelingssystemen, waardoor regelkringen ontstaan. Het neuro-endocriene stelsel kan bovendien de afbraak van hormonen in het bloed regelen; als gevolg van beide regelingssystemen kunnen hormoonniveaus worden ingesteld (homeostatische regeling).

Het neuro-endocriene stelsel ontvangt naast inwendige ook uitwendige informatie, die deels via de zintuigen, deels direct (extrasensorisch) aan het centrale zenuwstelsel wordt toegevoerd. De neuro-endocriene integratie is het proces, dat beide typen informatie harmoniseert. Het transport van hormonen in de bloedbaan impliceert soms de rol van dragereiwitten die enerzijds de hormonen tegen enzymatische afbraak kunnen beschermen, anderzijds de overdracht naar het doelwit-orgaan kunnen vergemakkelijken.

De subcellulaire werking van hormonen die leidt tot een activerend of remmend effect op levensprocessen, heeft men lange tijd niet kunnen doorgronden, maar de moleculaire biologie heeft inzichten opgeleverd die deze werking meer begrijpelijk maakt. We weten tegenwoordig dat vele hormonen hun effect uitoefenen (1) door beïnvloeding van de transcriptie- of translatieprocessen die leiden tot het vormen van specifieke eiwitten (2) door wijziging van enzymactiviteiten en (3) door op celmembranen te werken en daarvan bijvoorbeeld de permeabiliteit voor metabolieten te beïnvloeden.

Specifieke receptoren in de cellen van de doelwit-organen verzorgen de primaire ontvangst, die dikwijls nog via een tweede boodschapper tot het uiteindelijke effect leidt.

Hormonen zijn dus informatie-overdragers waarvan de 'boodschap' slechts door bepaalde cellen wordt 'verstaan' en daaraan zijn specificiteit ontleent.

ISBN 90 220 663 8

© Pudoc, Centrum voor Landbouwpublicaties en Landbouwdocumentatie, Wageningen, 1978

Druk: Boek- en Offsetdrukkerij Verweij Wageningen B.V.

Inhoud

Algemene problemen van de endocrinologie

prof. dr. J. Lever *Biologisch Laboratorium der Vrije Universiteit te Amsterdam* 7

Het neuro-endocriene systeem

prof. dr. J. Joosse *Biologisch Laboratorium der Vrije Universiteit te Amsterdam* 16

Het binnenspel van vissen en derzelver voortplanting

prof. dr. P.G.W.J. van Oordt *Zoölogisch Laboratorium, Sectie Vergelijkende Endocrinologie, Rijksuniversiteit te Utrecht* . . . 42

Het endocriene systeem en aanpassingen van stekelbaarzen aan hun milieu

mevr. dr. B. Baggerman *Zoölogisch Laboratorium, Biologisch Centrum, Rijksuniversiteit te Groningen* 64

Het werkingsmechanisme van peptidehormonen

dr. J.W. Hekkelman *Laboratorium voor Celbiologie en Histologie der Rijksuniversiteit te Leiden* 93

Het werkingsmechanisme van steroïdhormonen

prof. dr. H.J. van der Molen, dr. W.M.O. van Beurden, dr. W. de Boer en dr. E. Mulder *Afdeling Biochemie, Faculteit der Geneeskunde, Erasmus Universiteit te Rotterdam* 112

Functie van hormonen bij ontwikkeling en stofwisseling van insecten

dr. A.M.Th. Beenackers *Laboratorium voor Scheikunde Dierfysiologie der Rijksuniversiteit te Utrecht* 126

Hormonale invloed op voortplanting en milieurelaties van insecten

prof. dr. J. de Wilde *Laboratorium voor Entomologie der Landbouwhogeschool te Wageningen* 150

Invloed van neuropeptiden op het gedrag van zoogdieren

dr. Tj.B. van Wimersma Greidanus en prof. dr. D. de Wied *Rudolf Magnus Instituut voor Farmacologie der Rijksuniversiteit te Utrecht* 178

Klinische aspecten van de endocrinologie

prof. dr. J.J. van der Werff ten Bosch *Afdeling Endocrinologie, Groei en Voortplanting, Faculteit der Geneeskunde, Erasmus Universiteit te Rotterdam* 195

Bronst op bestelling bij landbouwhuisdieren

dr. Th. A.M. Kruip *Kliniek Verloskunde, Gynaecologie en Kunstmatige Inseminatie, Faculteit der Diergeneeskunde, Rijksuniversiteit te Utrecht* 207

Hormonen en insectenbestrijding

dr. G.B. Staal *Zoecon Corporation te Palo Alto, California, U.S.A.* 234

Slotbeschouwing

prof. dr. P.J. Gaillard *Laboratorium voor Cytologie en Experimentele Histologie der Rijksuniversiteit te Leiden* 259

Literatuur 269

Verklarende woordenlijst 284

Register 293

Algemene problemen van de endocrinologie

J. Lever

De endocrinologie bestrijkt een breed en gevarieerd terrein. Zij houdt zich immers bezig met de hormonale processen bij alle meercellige diergroepen. Ieder van deze groepen vertoont specifieke endocriene eigenschappen. In deze publikatie zullen dan ook, onder meer, typische bijzonderheden van wormen, slakken, insekten, vissen, amfibieën en zoogdieren ter sprake moeten komen.

Het gaat de endocrinologie echter niet alleen om het begrijpen van de vormingswijze en de functies van de hormonen bij elk van deze groepen apart, maar ook om het opsporen van fundamentele principes die het functioneren van alle dieren beheersen.

In dit inleidende hoofdstuk zal daarom de nadruk gelegd worden op de belangrijkste algemene problemen van de endocrinologie. Hierdoor kan een kader ontstaan waarin de gegevens en inzichten van de auteurs van de volgende hoofdstukken passen.

Twee principes van coördinatie en regeling

Dieren onderscheiden zich van planten doordat zij als duidelijke eenheden, als individuen, actief in het milieu opereren. Zij reageren daarbij voortdurend op allerlei factoren en situaties. Deze kunnen fysisch-chemisch van aard zijn, zoals het zoutgehalte van het water, de temperatuur, de belichtingsintensiteit en de daglengte. Maar het betreffen daarnaast steeds ook biotische aspecten van de omgeving: voedselorganismen, predatoren, en ingewikkelde verhoudingen met soortgenoten, die bij voorbeeld te maken hebben met samenwerking, concurrentie, agressie, sexualiteit en verzorging van jongen. Deze zeer complexe actieve relatie van ieder individueel dier met het milieu impliceert dat alle organen en weefsels steeds harmonisch moeten samenwerken bij de realisering van het gedrag en van de overige externe en interne activitei-

ten van het betreffende exemplaar. Hieruit volgt dat er een voortdurende coördinatie en regeling van al deze processen moet plaatsvinden. Daarvoor dient een mechanisme aanwezig te zijn dat aan enkele voorwaarden moet voldoen. Er is allereerst een communicatiesysteem nodig dat de onderdelen van het lichaam met elkaar verbindt, terwijl verder door dat systeem signalen vervoerd dienen te worden die op speciale plaatsen door bepaalde factoren worden opgewekt en, na integratie, op andere specifieke plaatsen effecten bewerkstelligen. In het dierenrijk zijn bij de realisering hiervan twee principes gevolgd, namelijk het nerveuze en endocriene principe.

Het nerveuze principe Alle dieren bezitten een zenuwstelsel dat speciaal voor de zojuist beschreven functies dient. Het verbindt alle delen van het lichaam met zijn vertakt geleidingssysteem. Dit systeem is opgebouwd uit achter elkaar geschakelde eenheden, de neuronen. De signalen (actiepotentialen) lopen snel langs de uitlopers van deze cellen en hebben een uniform karakter, al kunnen de duur en de sterkte verschillen. Zij worden opgewekt in aan het lichaamsoppervlak of inwendig gelegen zintuigen van allerlei aard, en worden vervolgens veelal in centrale delen van het systeem met elkaar verrekend, om ten slotte via specifieke banen de activiteit van zeer bepaalde cellen of celtgroepen positief of negatief te beïnvloeden.

Het zenuwstelsel is dus een compleet coördinatie- en regelsysteem: het is een communicatienet dat continu het hele dier bestrijkt, het heeft eigen receptie- en integratiemechanismen, het beschikt over een specifiek signaal, en het kan de signalen zeer gelokaliseerd en gedoseerd afleveren.

Het endocriene principe Hierbij wordt niet van een eigen communicatiesysteem gebruik gemaakt, maar de signalen, in de vorm van de hormonen, worden door de endocriene weefsels en organen in het voor vele andere doeleinden gebruikte algemene circulatiesysteem afgegeven. De hormonen komen daardoor na verloop van tijd overal terecht. Dat zij hun effect wel op specifieke cellen uitoefenen is dan ook te danken aan het feit dat zij ieder een karakteristieke chemische structuur bezitten, terwijl de zogenaamde doelwit-cellen selectief op hen reageren. Hoewel dikwijls van verspreide, niet direct onderling verbonden endocriene organen wordt gebruik gemaakt, kan ook, althans tot op zekere hoogte,

gecoördineerd worden. Dit is bij voorbeeld het geval wanneer twee endocriene klieren een gemeenschappelijk doelwit-orgaan hebben en de één een activerend en de ander een remmend effect uitoefent. Ook kunnen endocriene organen elkaar beïnvloeden, waarbij zelfs een hiërarchie of een andere vorm van relatie-netwerk mogelijk is. In dergelijke gevallen kan van een *endocrien systeem* worden gesproken.

De verschillen tussen het nerveuze en het endocriene principe zijn kort samengevat, dat het nerveuze principe gebruik maakt van een eigen communicatiesysteem waardoor op de biologisch snelst mogelijke wijze specifieke signalen langs directe wegen naar de doelwit-organen gaan, terwijl bij het endocriene principe specifieke signalen indirect hun, op hen specifiek reagerende, doelen bereiken via de wat langduriger en meer lukrake weg van het algemene circulatiesysteem.

De vraag wat de biologische betekenis is van het bestaan van deze twee principes is niet geheel bevredigend te beantwoorden. Wellicht is het zo dat met behulp van hormonen gemakkelijker langzaam verloopende en langduriger processen die een continue bijstelling vereisen, kunnen worden geregeld. Men bedenke dat ook bij hogere planten dergelijke processen hormonaal worden beheerst. De dierlijke levenswijze — met beweeglijkheid, organismale voeding, ketens van predatoren enz. — vereist echter tevens een snelle reactiviteit, waarvoor het nerveuze principe zorgt.

Neuro-endocriene integratie

Ons uitgangspunt was dat de dieren als individuen actief in het milieu optreden, waarbij alle onderdelen harmonisch moeten samenwerken. Hieruit volgt dat de twee gebruikte coördinatie- en regelmechanismen ook op elkaar afgestemd moeten zijn. Het is het zenuwstelsel, het meest complete systeem, dat hierbij de leiding heeft. Dat is te danken aan het fundamenteel dubbele karakter van zijn werkingswijze. Het gebruikt namelijk niet één, maar twee typen van signalen. Het eerste hiervan is de reeds genoemde snelle actiepotentiaal langs de uitlopers van de neuronen. Ten tweede wordt bij overdracht van de boodschap van het ene neuron op het andere, maar ook bij die van het laatste neuron van een baan op een effector, echter gebruik gemaakt van een chemisch signaal, een zogenaamde transmitter-stof. Ieder neuron is dan ook niet alleen

een geleider van actiepotentialen, maar tevens een kliercel. Daar de banen specifiek verlopen kan bij de overdracht, en dat geldt zeker voor de uiteinden van het systeem, van een beperkt aantal stoffen gebruik gemaakt worden. Het gaat immers om een activering van de effector (zoals bij een dwarsgestreepte skeletspier) waarbij één stof voldoende is, of om een activering dan wel remmen van een orgaan, waarvoor in principe twee verschillende chemische signalen nodig zijn, die uit de aard der zaak aan de uiteinden van aparte banen moeten worden uitgescheiden.

De transmitter-stoffen oefenen ter plekke — op een ander neuron of op een effector — hun werking uit. Het essentiële kliercel-karakter van ieder neuron vormt daarnaast echter tevens de basis voor het verschijnsel dat bepaalde neuronen hun secretieproduct niet dadelijk op effector-cellen afgeven, maar in het circulatiesysteem afscheiden, waardoor het per definitie een hormoon is. Dergelijke cellen worden neurosecretorische of — en daar dient de voorkeur aan gegeven te worden — *neuro-endocriene cellen* genoemd.

Gezien de aard van het tweede communicatiesysteem dienen de 'neurohormonen' weer chemisch van elkaar te verschillen, althans wanneer verschillende effecten moeten worden bereikt. In sommige gevallen regelen zij zelf de activiteiten van bepaalde organen of weefsels. Dikwijls werken zij echter indirect doordat zij op specifieke wijze de activiteiten van buiten het centrale zenuwstelsel gelegen endocriene organen beheersen. Door deze functie vervullen de neuro-endocriene cellen de rol van de gezochte verbindende schakels tussen de twee regelsystemen die bij de dieren worden aangetroffen.

Door de ontdekking van deze *neuro-endocriene integratie* is ons inzicht in het functioneren van de dieren belangrijk toegenomen. De continu via externe en interne perceptie binnenkomende stroom van informatie blijkt nu immers niet alleen verwerkt te worden door het eigen geleidingssysteem van het zenuwstelsel, maar wordt via de neuro-endocriene wissels ook doorgespeeld naar het hormonale systeem. Was het vroeger al wel bekend dat vele endocriene organen en daardoor allerlei endocrien geregelde processen beïnvloed worden door dagelijkse, seizoens- of andere meer of minder abrupte veranderingen in het milieu, nu men oog heeft gekregen voor het bestaan van neuro-endocriene centra heeft men een completer beeld gekregen van de wijze waarop dit gebeurt. Dit heeft tevens bevorderd dat er veel meer onderzoek wordt

uitgevoerd op de grensvlakken tussen zintuigfysiologie, zenuwfysiologie, ethologie en oecologie enerzijds en endocrinologie anderzijds. Dat zal ook duidelijk tot uitdrukking komen in verscheidene volgende hoofdstukken.

Werkingswijze van endocriene organen en relatienetwerken

Wanneer wij even stilstaan bij de werkwijze van endocriene organen rijst een aantal nieuwe problemen. De processen die hormonaal beïnvloed worden hebben, zoals gezegd, veelal een langdurig of zelfs een permanent karakter; als voorbeeld kunnen worden genoemd: groei, stofwisseling, excretie, voortplanting, endocriene effecten op het zenuwstelsel en het gedrag, en ook homeostatische processen zoals de handhaving van de osmotische waarde of van de concentratie van een ion of van glucose in het circulatiesysteem.

Dit durend karakter van de endocriene beïnvloeding brengt met zich mee dat de hormoonafgifte veelal steeds bijgesteld moet worden. Het dier zal immers het ene ogenblik stil zitten, maar dan ineens actief gaan bewegen; het eet en drinkt bij tijd en wijle, of vecht, of legt eieren. En al deze gebeurtenissen hebben dikwijls ook consequenties voor dergelijke endocrien geregelde processen. De intensiteit van de afgifte van het hormoon en daarmee de concentratie hiervan in het circulatiesysteem, de zogenaamde hormoon-titer, kan in principe op verschillende manieren geregeld worden. Stel dat een endocrien orgaan als functie heeft de bloedspiegel van de een of andere stof constant te houden. Dat kan gebeuren doordat de endocriene cellen zelf reageren op daling en stijging van de concentratie van deze stof door meer of minder hormoon af te geven. Het kan ook zijn dat de activiteit van deze cellen secundair geregeld wordt door een hormoon van een ander endocrien orgaan dat primair reageert op wijzigingen in de concentratie van de betreffende stof. Maar het is ook mogelijk dat de concentratie van de stof voortdurend nerveus geregistreerd wordt, waarna via een neuro-endocriene schakel het betreffende endocriene orgaan wordt beïnvloed. Wanneer we hierbij nu ook nog bedenken dat bij sommige processen, bij voorbeeld de stofwisseling en de voortplanting van bepaalde dieren, talrijke hormonen en endocriene organen een onmisbare rol spelen, is het duidelijk dat de endocrinoloog dikwijls met zeer ingewikkelde relatienetwerken en 'feedback'-mechanismen geconfronteerd wordt.

Chemische aard en werkingwijze van de hormonen

In het voorgaande werd er reeds op gewezen dat bij het endocriene principe de signalen die voor specifieke doelwit-organen bestemd zijn, verschillend moeten zijn gezien de aard van het gebruikte communicatiesysteem. Dat brengt ons op de chemische aard van de hormonen. Het is merkwaardig dat de hormonen slechts tot enkele typen verbindingen behoren. Zo produceren alle neuro-endocriene cellen en vele perifere endocriene organen proteïnaire hormonen: proteïnen, grotere of kleinere polypeptiden of aminozuur-modificaties. De meeste andere hormonen, zowel bij vertebraten als evertrebraten, zijn steroïden. Het juveniel hormoon van de insekten is één van de weinige hormonen die niet tot deze twee groepen van verbindingen behoren. Het is een isopreenderivaat en verwant aan de lipiden.

Wanneer de endocrinologie haar aandacht speciaal op de chemische structuur van de hormonen richt komt een hele serie vragen aan de orde.

De eerste betreft de hormoon synthese in de endocriene cellen. Van sommige proteïnaire hormonen ligt de volgorde van de samenstellende aminozuren in het DNA in haar geheel vast. Zij zijn in het genoom door één gen gerepresenteerd en worden direct via RNA en het ribosomale vertaalapparaat gemaakt. Dikwijls worden zij echter als grotere pro-hormoonmoleculen vervaardigd waarvan nog stukken moeten worden afgeknipt. Andere hormonen worden enzymatisch geassembleerd uit een aantal apart gemaakte polypeptideketens. Ten slotte zijn er die in het cytoplasma door de werking van een serie enzymen worden gesynthetiseerd. Dit laatste geldt ook voor de steroïd-hormonen, die in het algemeen via verscheidene stappen vanuit cholesterol worden gemaakt.

Een volgende vraag betreft het vervoer van de hormonen door het circulatiesysteem. Sommige worden als losse opgeloste moleculen door het bloed vervoerd. Bij andere hormonen is slechts een deel op deze wijze vrij aanwezig en in staat met de doelwit-cellen te reageren, terwijl de meerderheid tamelijk los is gebonden aan bepaalde plasmaproteïnen. Deze vormen daardoor een soort van buffervoorraad waaruit de vrije en verbruikte moleculen kunnen worden aangevuld. Bij nog weer andere hormonen werkt juist de gebonden vorm actief op de doelwit-cellen in.

Hiermee wordt weer een nieuw complex van problemen aangesne-

den, dat in de volgende hoofdstukken besproken zal moeten worden. Wij concludeerden reeds dat de hormonen een specifieke structuur dienen te hebben omdat zij op bepaalde cellen moeten inwerken. Het complement hiervan is natuurlijk dat deze cellen hen, bij wijze van spreken, moeten kunnen herkennen onder alle chemicaliën die langs hen circuleren. Daaraan is vervolgens de vraag verbonden hoe de hormonen wanneer zij eenmaal gepakt zijn hun werking uitoefenen.

Het is gebleken dat de doelwit-cellen beschikken over receptoren, moleculen of molecuul-groepen die, in de celmembraan of in het cytoplasma gelegen, zich met een bepaald hormoon kunnen binden. De specifieke binding tussen hormonen en receptoren is dus het cardinale gebeuren in het endocriene regelingsproces waarbij het signaal zijn doel treft.

Er zijn twee hoofdmanieren bekend waarop het hormoon vervolgens zijn werking binnen de cel uitoefent. De eerste is dat na de hormoonreceptorbinding aan de celmembraan door middel van een bepaald enzym een aspecifieke zogenaamde tweede boodschapper, in vele gevallen cyclisch-AMP, wordt vrijgemaakt die vervolgens via een hele serie stappen bepaalde effecten uitoefent op de cytoplasmatische processen in de betreffende cel. Bij de tweede beïnvloedingswijze gaat het hormoon door de cel heen naar de nucleus en werkt daar zodanig in op het genregulatiemechanisme dat de aanmaak van boodschapper-RNA voor bepaalde proteïnen, vooral enzymen, wordt bevorderd. Soms is deze activiteit zelfs onder het microscoop te constateren, doordat onder invloed van een hormoon bepaalde chromosoomdelen lokale verdikkingen, zogenaamde 'puffs', gaan vertonen.

Evolutie

Evenals in alle andere takken van de biologie rijzen er in de endocrinologie vragen met betrekking tot de evolutie. Men denke bijvoorbeeld aan de relatie tussen het endostyl, zoals dat bij *Amphioxus* en de larven van kaaklozen wordt aangetroffen, en de schildklier, en aan de relatie tussen de beide vergroeide bijnier-componenten bij de hogere vertebraten en de verspreid en los van elkaar liggende overeenkomstige organen bij de vissen. Van een ander karakter is het feit dat talrijke proteïnaire hormonen bij verschillende groepen en soorten van de gewervelde dieren grotere of kleinere verschillen in aminozuursamenstelling ver-

tonen. Deze zijn interessant in verband met vragen betreffende de fylogenetische verwantschap, maar zij zijn ook van belang voor het onderzoek van de werkzame onderdelen van deze hormonen. Overeenkomstige verschijnselen en vragen doen zich voor bij de steroïdhormonen.

Verder is geconstateerd dat een bepaald hormoon soms bij verschillende vertebraten tamelijk uiteenliggende functies vervult. Hoe is dat ontwikkeld en wat zijn de relaties tussen deze functies? Van nog veel verstrekkender aard zijn de problemen rond het ontstaan van het endocriene principe als zodanig. Zo kan bij voorbeeld de vraag gesteld worden of er eerst endocriene organen zijn opgetreden terwijl later de neuro-endocriene regulatie ontstond, of dat wij ons het omgekeerde moeten voorstellen, namelijk dat de neuro-endocriene cellen primair zijn gevormd en de perifere endocriene organen pas naderhand zijn ontstaan. Hierbij moet er tevens aan gedacht worden dat parallel met de ontwikkeling van de endocriene organen de gevoeligheid van bepaalde cellen door middel van hormoonreceptoren moet zijn opgetreden. Op een aantal van deze vragen zal in volgende hoofdstukken nader worden ingegaan.

Endocrinologische methoden

De endocrinologie maakt gebruik van een aantal karakteristieke methoden. Dat een bepaald orgaan een endocriene functie vervult kan worden vastgesteld door het operatief te *extirperen* (verwijderen) of op andere wijze uit te schakelen. De hierdoor veroorzaakte uitvalsverschijnselen moeten dan weer kunnen worden opgeheven door *implantatie* van het betreffende weefsel of door *injecties* met homogenaten of extracten hiervan. Om de zo aangetoonde hormonen te kunnen isoleren zijn *toetsen* nodig waarbij gebruik gemaakt wordt van duidelijke specifieke en liefst kwantitatief te bepalen effecten.

Veel endocrinologische experimenten worden in vivo uitgevoerd. In toenemende mate worden de endocriene effecten echter ook in vitro bestudeerd met behulp van geïsoleerde lichaamsonderdelen of celcultures in weefselkweken. De karakteristieke endocrinologische methoden worden aangevuld met het gehele technische arsenaal waarover de biologie tegenwoordig de beschikking heeft.

Maatschappelijke toepassingen

Wij hebben nu in vogelvlucht de meest belangrijke algemene problemen in het veld van de endocrinologie besproken en het wordt tijd om een aantal van hen van wat meer nabij te gaan bezien. Voordat daartoe wordt overgegaan dient er echter nog op te worden gewezen dat de vorderingen die in deze wetenschap zijn gemaakt zich niet beperken tot interessante inzichten in het functioneren van de dieren. Zoals bekend speelt de endocrinologie reeds lang een uiterst belangrijke rol bij het opsporen van de oorzaken van talrijke ziekten van de mens en de huisdieren, en bij de klinische bestrijding hiervan.

In toenemende mate wordt tegenwoordig verder ook onderzoek gedaan over de vraag of de in de endocrinologie verworven kennis gebruikt kan worden ten behoeve van verscheidene andere maatschappelijke vraagstukken. Vanzelfsprekend denken wij dan dadelijk aan de hormonale beïnvloeding van de menselijke voortplanting. Dat is echter slechts één van de toepassingsmogelijkheden waaraan in de volgende hoofdstukken veel aandacht zal worden geschonken.

Het neuro-endocriene systeem

J. Joosse

Uit de inleiding is gebleken dat dieren beschikken over twee regulatiesystemen, namelijk het nerveuze en het endocriene systeem. Tevens is gesteld dat er een hechte samenwerking tussen deze systemen moet bestaan en dat daarbij de neurosecretorische cellen een zeer belangrijke rol spelen.

Het doel van dit hoofdstuk is duidelijk te maken wat de typische kenmerken van neurosecretorische cellen zijn en hoe ze functioneren. Tevens zal ingegaan worden op het vóórkomen van deze cellen in de verschillende diergroepen. Bij het bespreken van de functie van de neurosecretorische cellen zal vooral aandacht besteed worden aan hun relatie met de endocriene organen. Daarbij zal duidelijk worden dat er diergroepen zijn die geen endocriene organen bezitten of die geen bloedvaatstelsel bezitten, zodat het begrip endocriene regulatie op moeilijkheden stuit. Als dan blijkt dat bij die dieren toch vormen van neurosecretie voorkomen, is dat aanleiding tot het maken van een aantal opmerkingen over evolutie-aspecten betreffende het verschijnsel neurosecretie.

Typering van de neurosecretorische cel

Men kan de neurosecretorische cel het best typeren door deze te vergelijken met de 'gewone' zenuwcel (neuron) en de endocriene cel (figuur 1).

Zenuwcellen vertonen onder bepaalde omstandigheden actiepotentialen, d.w.z. depolarisaties van de celmembraan. Deze beginnen gewoonlijk in het cellichaam in de axonheuvel en planten zich vervolgens voort langs het axon. Deze uitloper van de zenuwcel verbindt het cellichaam met een volgend neuron of direct met het te innervieren orgaan (doelwit of effector), waaraan een boodschap (prikkel) moet worden

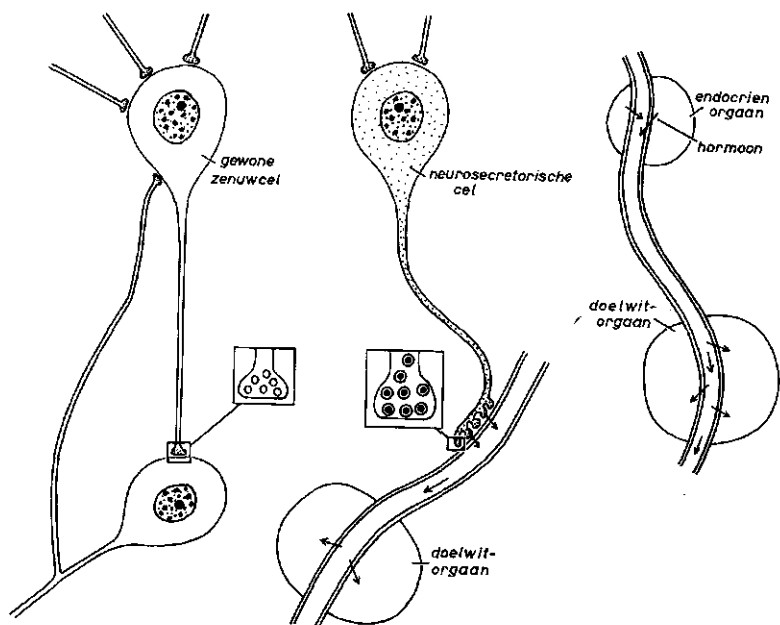


Fig. 1. Vergelijking van de werkwijze van het gewone neuron, de neurosecretorische cel en een endocrien orgaan. De beide details geven de synaps van het gewone neuron, en het neurohemale uiteinde van de neurosecretorische cel met de elementaire granula weer.

doorgegeven. Als doelwit kunnen dus bijvoorbeeld andere neuronen, spiercellen of kliercellen fungeren. Met deze doelwit-cellen gaat het neuron met het axonuiteinde gewoonlijk een nauw contact aan in de vorm van een synaps. Bij aankomst van de actiepotentiaal bij de synaps scheidt het neuron een stof af (neurotransmitter) in de zeer kleine ruimte tussen het neuronuiteinde en de doelwit-cel. Hierop reageert de doelwit-cel. Daarmee is de prikkel overgedragen. Kenmerkend voor de zenuwcel is nu dat hij door zijn merkwaardige structuur via de, soms zeer lange en buitengewoon talrijke uitlopers (axonen) met al zijn effectoren in direct contact kan treden en voorts dat het doorgeven van een prikkel zeer snel gaat, in de grootte-orde van milliseconden. Dat komt door het snelle transport van de actiepotentiaal en het zeer snel afgeven van de transmitterstof in de synaptische spleet gevolgd door snelle enzymatische afbraak of terugresorptie.

Cellen van *endocriene organen* geven hun boodschap in de vorm van een bepaalde chemische stof (hormoon) af aan het bloed, dat voor het transport door het gehele lichaam zorg draagt. De cellen in de doelwitorganen waarvoor de boodschap bestemd is, reageren specifiek op deze chemische stof, waarbij er nog gradaties in de reactie kunnen optreden naar gelang de concentratie van het hormoon (hormoonspiegel of titer, bijvoorbeeld in het bloed) en de variaties in gevoeligheid van deze cellen voor het hormoon. Het is typerend voor hormonen dat zij, in vergelijking tot de neurotransmitters, veel langer vrij kunnen blijven circuleren (in de grootte-orde van uren) alvorens zij geheel uitgescheiden of afgebroken zijn. Deze eigenschap maakt hormonen zeer geschikt voor het reguleren van langdurige processen.

Men zou *neurosecretorische cellen* nu kortweg kunnen definiëren als neuronen die hun secretieproducten aan het bloed afgeven. Die producten heten dan ook neurohormonen. Enerzijds bezitten neurosecretorische cellen elektrische eigenschappen (membraanpotentiaal, actiepotentiaal) die niet principieel verschillen van die van de gewone neuronen. Morfologisch is er ook een sterke gelijkenis: de neurosecretorische cellen bezitten ook axonen, maar anderzijds gaan deze axonen niet naar spier- of kliercellen of naar andere neuronen, maar naar de directe omgeving van een bloedvat of bloedsinus, waar zij het neurohormoon afgeven (figuur 1).

Functioneel gezien is een neurosecretorische cel dus in staat om nerveuze informatie te vertalen in een boodschap die een hormonaal karakter draagt. In het licht van het voorgaande zouden we ook kunnen stellen dat de neurosecretorische cel de extreem kort durende nerveuze salvo's omzet in een endocriene boodschap met een veel langere echo, want neurohormonen hebben halveringstijden van minuten tot uren.

Deze eerste introductie van het begrip neurosecretie roept meteen vragen op, zoals welke boodschappen er door het zenuwstelsel via de neurosecretorische cel worden doorgegeven en voor wie die boodschappen bestemd zijn.

Functionele betekenis van neurosecretie

Het is algemeen bekend dat voortplanting, groei, stofwisseling en osmoregulatie behoren tot activiteiten die in dieren hormonaal gereguleerd worden. De hormonen die hierbij direct betrokken zijn, worden bij ver-

tebraten geproduceerd in de geslachtorganen, de hypofyse, de schildklier en de bijnier.

Maar het is evenzeer duidelijk dat bij de regulatie van deze processen in sterke mate rekening moet worden gehouden met de milieumomstandigheden. Er is in elk individu van een soort een nauwkeurige tijdsregistratie nodig om de mannelijke en vrouwelijke partners gelijktijdig geslachtsrijp te laten worden. Het voortbrengen van de jongen moet zoveel mogelijk samenvallen met het beschikbaar zijn van het juiste voedsel in voldoende hoeveelheden. De stofwisseling moet zodanig gestuurd worden dat voor trekactiviteiten tijdig voldoende reserves zijn gevormd. Migratie van vissen gaat vaak gepaard met sterke osmotische veranderingen in het milieu waarop het dier meteen moet kunnen reageren of zelfs moet worden voorbereid.

Uit de volgende hoofdstukken zal nog blijken dat veel diersoorten in staat zijn om milieufactoren, zoals de veranderingen in de daglengte, het temperatuurverloop, de samenstelling van het voedsel, de osmotische waarde van het milieu, voortdurend te registreren en te integreren. Het zijn de zintuigen en het zenuwstelsel die deze taken verrichten. Dit geldt niet alleen voor externe factoren. Ook vele interne parameters — bijvoorbeeld de bloeddruk, de osmotische waarde van het bloed, de vulingstoestand van de darm — worden door interne metingen waargenomen en in het zenuwstelsel verwerkt. Maar ook deze gegevens zijn van belang voor vele hormonaal gereguleerde processen.

Uit het bovenstaande kunnen we concluderen dat het zenuwstelsel zeer veel en voor de overleving van het individuele dier en de diersoort uiterst belangrijke informatie heeft mee te delen aan organen waarin processen verlopen die endocrien gestuurd moeten worden. Er is kennelijk veel en belangrijk werk te doen voor neurosecretorische cellen die deze nerveuze boodschappen kunnen vertalen en doorgeven. Zo bezien is het een logische conclusie om te stellen dat er ook wel verschillende typen van neurosecretorische cellen moeten bestaan. Zouden er dieren bestaan die geen neurosecretorische cellen nodig hebben? Dat lijkt uiterst onwaarschijnlijk.

Ontdekking van neurosecretorische cellen

Neurosecretorische cellen zijn ontdekt in lichtmicroscopische histologische preparaten van zenuwstelsels van vertebraten. Men vond daarin

cellen die merkwaardige kleurreacties vertoonden en dacht aanvankelijk dat dit degenerende cellen waren. Het was Ernst Scharer die in 1928 als eerste meende dat deze cellen een speciale functie zouden kunnen hebben. Het heeft tot 1949 geduurd voordat Bargmann met de chroom-aluinhematoxyline-kleurmethode van Gomori een geschikte techniek introduceerde om niet alleen de neurosecretorische cellichamen, maar ook hun axonen goed zichtbaar te maken. Met deze methode heeft men in korte tijd in vele diergroepen neurosecretorische cellen gevonden.

Al spoedig kreeg men de indruk dat er morfologisch een grote mate van uniformiteit viel op te merken. Neurosecretorische cellen liggen vaak in groepen bijeen in het centrale zenuwstelsel. Hun axonen vormen bundels, neurosecretorische banen genoemd, die eindigen in een aan het bloed grenzend weefsel waar het hormoon wordt afgegeven, het neurohemale gebied of orgaan. Vaak vertakken de axonen zich in het afgiftegebied zeer sterk, waarbij elke vertakking eindigt in een klein blindzakje, het neurohemale uiteinde. Celgroepen, tractus en neurohemaal orgaan samen worden wel een neurosecretorisch systeem genoemd.

Klassieke neurosecretorische systemen

De uniformiteit van de reeds vroeg ontdekte neurosecretorische systemen in een aantal grote diergroepen maakt het mogelijk om te spreken van klassieke neurosecretorische systemen. Pas later heeft men oog gekregen voor systemen die hiervan afwijken. Eerst zullen de klassieke systemen worden beschreven.

Bij de gelede wormen, zoals de zeeduizendpoot *Nereis* (Polychaeta), liggen in de cerebrale ganglia een aantal neurosecretorische celgroepen (figuur 2). Hun uitlopers verenigen zich tot één tractus, die naar de ventrale zijde van de met elkaar vergroeide ganglia loopt. Daar waaieren de uitlopers uit en geven hun hormoon af in een neurohemale zone die dicht bij een groot bloedvat ligt.

Bij de kreeften (Crustacea) vindt de neurohormoonafgifte o.a. plaats in de zogenaamde sinusklieren die in de oogstelen liggen op de grote nerveuze centra die de optische prikkels verwerken (figuur 3). De groepen neurosecretorische cellen die de sinusklie als afgifteplaats gebruiken, liggen verspreid in de oogstelen, maar deels ook ver daarbuiten, tot in de thoracale ganglia toe.

Vertegenwoordigers van de insecten bezitten vaak verschillende neu-

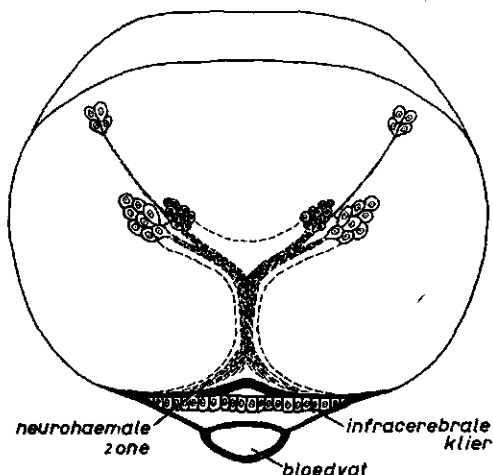


Fig. 2. Dwarsdoorsnede van de cerebrale ganglia van een polychaete worm met daarin aangegeven neurosecretorische celgroepen en hun banen naar het neurohemale gebied aan de ventrale zijde. (Naar Bern & Hagadorn, 1965.)

rosecretorische celgroepen in de cerebrale ganglia, waarvan de axonen naar de corpora cardiaca lopen (figuur 4). Deze organen liggen tegen de aorta aan zodat de hormoonafgifte in de corpora cardiaca gemakkelijk kan leiden tot opname van het hormoon in de bloedstroom.

Bij de vertebraten vond men verschillende neurosecretorische celgroepen in het gebied van de hypothalamus (figuur 5). Van sommige van deze groepen voeren de axonen naar de hypofyse-achterkwab (neurohypofyse) waar bloedvaten doorheen lopen. Een tweede belangrijke afgifteplaats is de eminentia mediana, dat is het gedeelte van de hersenbodem direct gelegen achter het chiasma opticum. De doorbloeding van dit gebied is zodanig georganiseerd, dat het bloed na het verlaten van de haarvaten van de eminentia direct naar haarvaten van de hypofyse-voorkwab loopt (figuur 8f, g).

Het ligt voor de hand dat men op grond van dit type gegevens tot de conclusie kwam dat de neurosecretorische celgroepen in de hersenen van dieren in bepaalde centra liggen en dat ook de afgifteplaatsen de neiging vertonen tot concentratie.

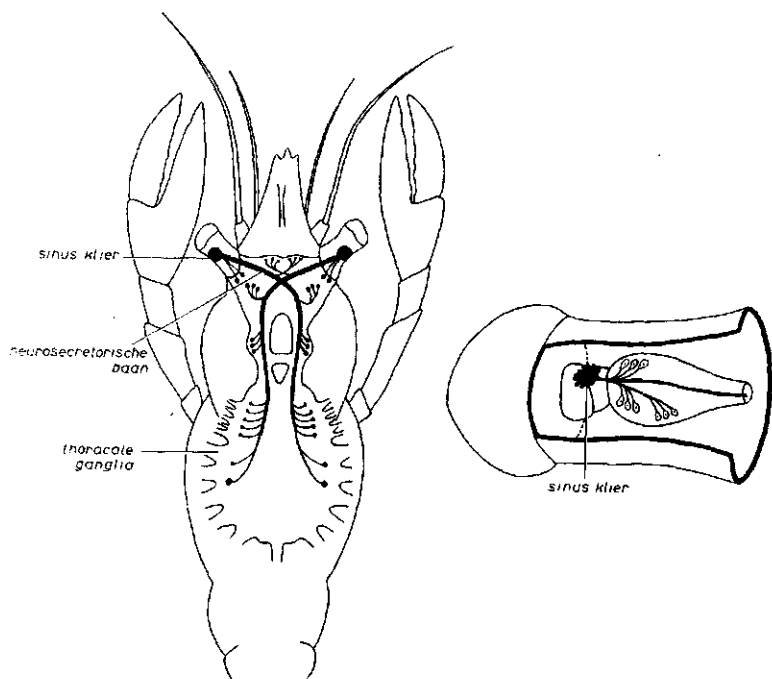


Fig. 3. De ligging van sinusklieën in de oogstelen van een kreeft met de er naar toe lopende neurosecretorische banen van neurosecretorische celgroepen. In een detail van een oogsteel zijn de optische nerveuze centra te zien. Ook hier liggen neurosecretorische celgroepen die de sinusklieër als neurohemaal orgaan gebruiken. (Naar Carlisle & Knowles, 1959.)

Perifere neurosecretie

Inmiddels is dit klassieke beeld gewijzigd. Men begint zich meer te interesseren voor het feit dat bijvoorbeeld bij gelede wormen en insecten het zenuwstelsel zo gebouwd is dat in elk lichaamssegment ganglia voorkomen. En men wist reeds lang, maar begint er nu ook oog voor te krijgen, dat in vele van die ganglia ook neurosecretorische cellen liggen met vlak er bij de afgifteplaatsen voor het hormoon. Bij de vissen ontdekten men zelfs een neurosecretorisch centrum in de uiterste punt van het ruggemerg in de staart, de urofyse.

Wat betreft de concentratie van de afgifteplaatsen vormen de slak-

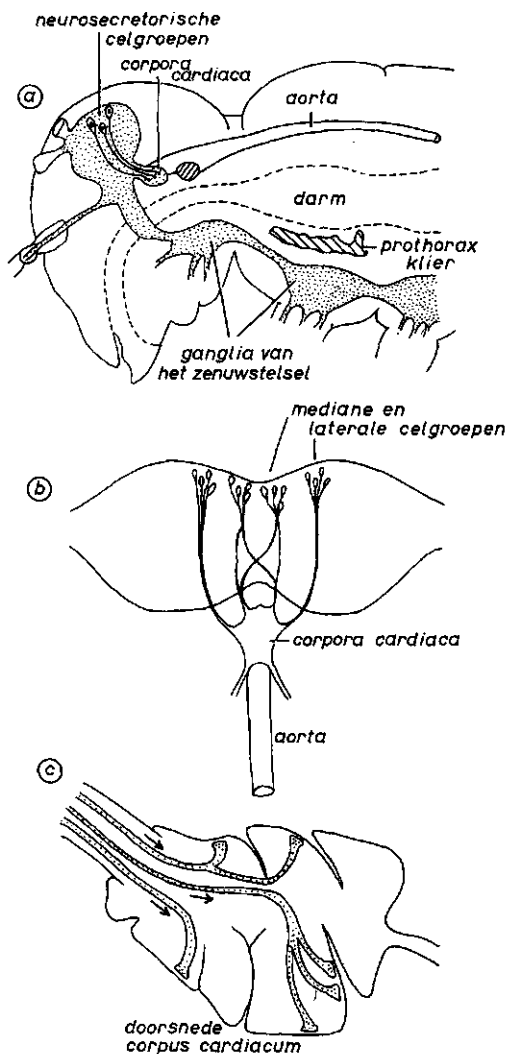


Fig. 4.

a. De ligging der neurosecretorische centra in de kop van een insect. (Naar Bern & Hagadorn, 1965.)

b. Positie van neurosecretorische celgroepen in de cerebrale ganglia van een insect met de afvoerbanen naar de corpora cardiaca.

c. Lengtdoorsnede van een corpus cardiacum van de Coloradokever met de neurohemale uiteinden van neurosecretorische cellen daarin. (Naar Schooneveld, 1970.)

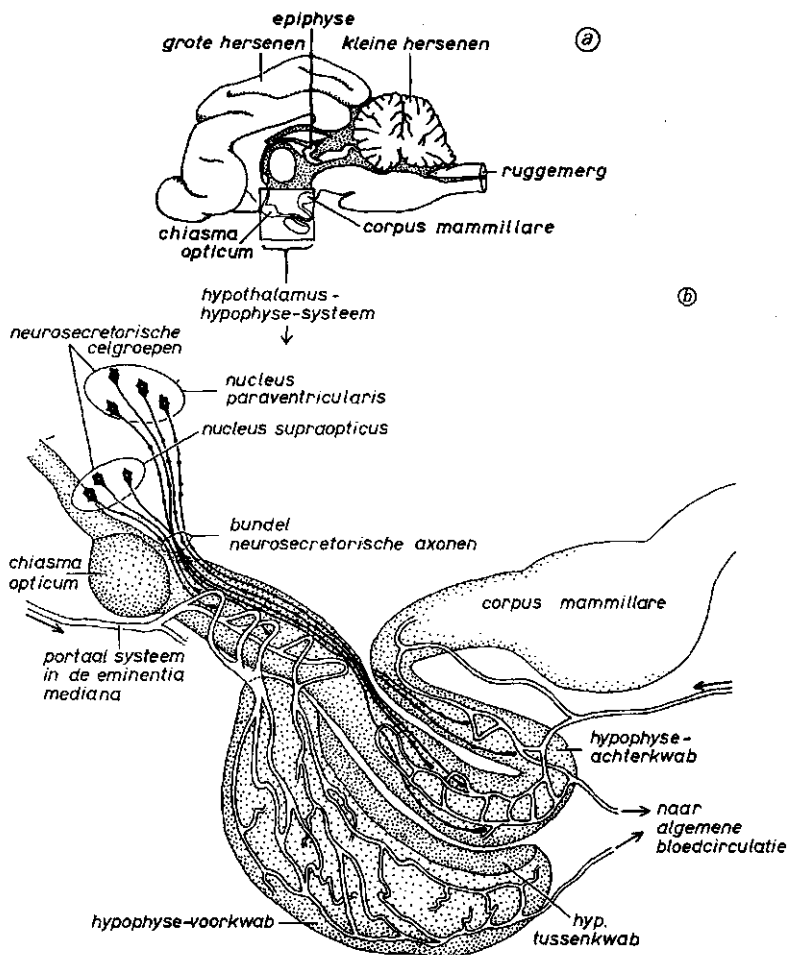


Fig. 5. Het hypothalamo-hypofysaire neurosecretorische systeem van zoogdieren. Er zijn twee plaatsen voor neurohormoon afgifte aangegeven: in de hypofyse-achterkwab met doorbloeding van de algemene circulatie, en in de eminentia mediana in het portale systeem dat de neurohormonen naar de hypofyse-voorkwab voert. (Naar Frye, 1967.)

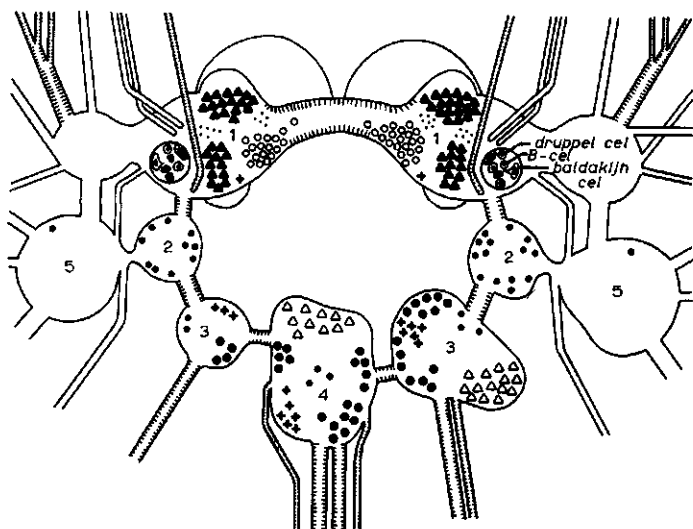


Fig. 6. Topografie van de neurosecretorische celtypen in de ring van ganglia om de slokdarm van de poelslak *Lymnaea stagnalis*. 1 = cerebrale ganglia, 2 = pleurale ganglia, 3 = parietale ganglia, 4 = visceraal ganglion, 5 = pedale ganglia. Terwille van de overzichtelijkheid zijn de pedale ganglia zijwaarts uitgeklappt: deze liggen normaal tegen elkaar onder de andere ganglia. Elke celtype is met een apart teken aangegeven. (Naar Wendelaar Bonga, 1970.)

ken, waarover nog niet gesproken werd, een extreem voorbeeld van het tegenovergestelde. Bij de zoetwaterslak *Lymnaea stagnalis* — in Nederland zeer algemeen voorkomend en poelslak genoemd — liggen vele groepen neurosecretorische cellen in de ring van ganglia om de slokdarm (figuur 6). De neurohemale gebieden van deze cellen beslaan de oppervlakken van vrijwel alle verbindingen tussen de ganglia, van de meeste zenuwen en zelfs dringen uitlopers door tot in het bindweefsel er omheen (Wendelaar Bonga, 1970). Dit betekent dat de binnenzijde van de bekleding (het perineurium) van deze commissuren, connectieven en zenuwen geheel bezet is met neurohemale uiteinden. Als daar hormoonafgifte plaatsvindt is de bloedbaan snel bereikt want deze dieren hebben een open bloedvaatstelsel; alle zenuwen liggen grotendeels vrij in de bloedsinussen.

Maar hier blijft het niet bij. Uitlopers van neurosecretorische cellen

worden bij de poelslak ook aangetroffen in de nier, in de gonade en zelfs in de aan de buitenwereld grenzende huid (Swindale & Benjamin, 1976). Men heeft dit perifere neurosecretie genoemd (figuur 8b; Wendelaar Bonga, 1970). Dit verschijnsel is ook algemeen voorkomend bij insecten (Maddrell, 1974). De functionele betekenis ervan komt later nog aan de orde.

Uit het bovenstaande blijkt dat er op morfologische gronden naast de klassieke, ook andere vormen van neurosecretorische systemen voorkomen. Als we echter afzien van de wijze waarop de neurosecretorische systemen zijn uitgevoerd, blijkt dat het verschijnsel van neurosecretie bij alle dierlijke organismen voorkomt, van het eenvoudige zoetwaterpo-liepje *Hydra* tot de mens. Kennelijk ligt aan het verschijnsel neurosecretie een zeer fundamenteel principe ten grondslag, dat tijdens de ontwikkeling van de diergroepen nooit overbodig is geworden. Zoals we al eerder constateerden is dat ook begrijpelijk, omdat neurosecretorische cellen de communicatie tussen het nerveuze en het endocriene systeem verzorgen.

Neurosecretorische celtypen

Lichtmicroscopisch kon men met de eerder genoemde Gomori-methode slechts twee typen neurosecretorische cellen onderscheiden, namelijk cellen die positief reageerden en donkerblauw secreet bleken te bevatten, en cellen waarvan de inhoud met een tegenkleuring reageerde, bijvoorbeeld met floxine. De kleuring maakt korrels in het cytoplasma, de uitlopers en de neurohemale gebieden zichtbaar. Wanneer echter cellen die dezelfde kleur aannemen in verschillende groepen liggen, suggereert dit dat deze groepen een verschillende functie zouden kunnen hebben. Met een door Peute & Van de Kamer (1967) geïntroduceerde en door Wendelaar Bonga (1970) verder ontwikkelde techniek, de alciaanblauw-alciaangeel-methode, kan men meerdere celtypen onderscheiden door het optreden van verschillende mengvormen van de kleuren blauw en geel. Met deze methode konden in de poelslak 10 verschillende neurosecretorische celtypen worden onderscheiden (figuur 6).

Deze lichtmicroscopische methoden kan men combineren met elektronenmicroscopische.

In het *elektronenmicroscopische* beeld blijkt, dat wat histologisch als kleurbare granula of druppels in neurosecretorische cellen te zien is, in feite bestaat uit grote aantallen veel kleinere korreltjes die men daarom elementair granula genoemd heeft (figuur 7). Deze bolvormige granula bestaan uit een membraan waarbinnen het hormoon is opgeslagen. De granula reflecteren het licht in levende cellen. Daardoor zijn de neurose-

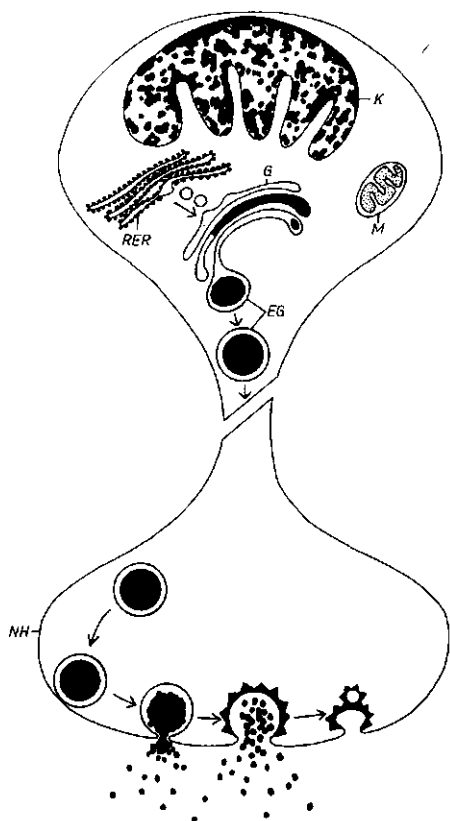


Fig. 7. Neurosecretorische cel in het elektronenmicroscopisch beeld met in het cellichaam aangegeven de productie van het secreet en de elementair granula. EG = elementair granulum, G = Golgi-zone, K = celkern, M = mitochondrion, NH = neurohemaal uiteinde, RER = ruw endoplasmatisch reticulum. (Figuur beschikbaar gesteld door E.W. Roubos.)

cretorische cellen, vooral in de kleine evertrebraten-zenuwstelsels, in levende toestand herkenbaar aan de blauwwitte kleur.

De diameter van elementair granula en het meer of minder elektrodicht zijn van de inhoud van granula vormen goede hulpmiddelen om in het elektronenmicroscopische beeld de verschillende neurosecretorische celtypen uit elkaar te houden. Bovendien blijken deze kenmerken weer een grote uniformiteit in het hele dierenrijk te bezitten. Op dit moment kan gesteld worden dat van alle neuronen waarvan het neurosecretorische karakter met zekerheid is vastgesteld, de elementair granula een diameter hebben groter dan 100 nm. In de gewone neuronen is de diameter van de granula met daarin vermoedelijk de neurotransmitterstof waarschijnlijk altijd kleiner dan 100 nm.

Het onderzoek naar de *chemische samenstelling* van neurohormonen heeft reeds belangrijke resultaten geboekt. In het algemeen kan men stellen dat de neurohormonen bestaan uit kleine eiwitmoleculen, zogenaamde peptiden, die uit een vrij beperkt aantal aminozuren zijn opgebouwd. De neurohormonen die in de neurohypofyse van de zoogdieren worden afgegeven (vasopressine en oxytocine) bestaan elk uit 8 aminozuren. De neurohormonen die de hypofyse-voorkwab reguleren variëren in grootte van 3-14 aminozuren. Bij de evertrebraten zijn van verschillende neurohormonen nog slechts de molecuulgewichten bekend; hun afmetingen zijn als regel niet erg groot. Ook hier blijkt een grote uniformiteit van de eigenschappen van neurosecretorische cellen in het dierenrijk. Een neurohormoon dat de rode pigmentgranula in de chromatoforen van de garnaal *Pandalus borealis* doet concentreren in het centrum van de cellen blijkt bijvoorbeeld ook uit 8 aminozuren te zijn opgebouwd. Waarschijnlijk komen bij insecten ook wel neurohormonen van grotere afmetingen voor.

De *synthese* van de peptidehormonen vindt vanzelfsprekend plaats aan het ruw endoplasmatisch reticulum van neurosecretorische cellen (figuur 7). Dit materiaal wordt vervoerd naar de Golgi-systemen, waar het verpakt wordt in de eerder genoemde elementair granula. De granula worden in verschillende hoeveelheden opgeslagen in de cellichamen. Het transport naar de neurohemale uiteinden vindt waarschijnlijk plaats langs de microtubuli van het celskelet.

Voor het begrijpen van het functioneren van neurosecretorische cel-

len is het essentieel om een inzicht te hebben in het *mechanisme van de afgifte* van het hormoon. Algemeen wordt verondersteld dat bij aankomst van een actiepotentiaal vanuit het cellichaam van de neurosecretorische cel bij de neurohemale uiteinden een depolarisatie van de membraan optreedt, die tot gevolg heeft dat calciumionen dit uiteinde binnendringen. Daardoor zouden de perifeer gelegen elementair granula contact maken met de binnenzijde van het axonuiteinde. Op de contactplaats treedt een opening op, zowel in het granulum als in de celmembraan. Door de opening kan de inhoud van het elementair-granulum zich door diffusie verspreiden. Deze wijze van afgeven van het hormoon wordt exocytose (uitsluizen) genoemd (figuur 7). De belangrijkste gronden voor deze theorie zijn de volgende. Elektrische stimulatie van neurosecretorische cellen leidt tot afgifte van het hormoon. Kunstmatige depolarisatie van de membraan met behulp van een fysiologische oplossing met hoog kaliumgehalte leidt ook tot afgifte van het hormoon. Tenslotte ziet men in het elektronenmicroscopische beeld van de neurohemale uiteinden vaak indentaties in de vorm van omega-figuren, die er op wijzen dat op het moment van de fixatie exocytose plaatsvond (figuur 7).

Bij het afgiftemechanisme zien we het duidelijkst gedemonstreerd hoe een nerveuze stimulus (actiepotentiaal) omgezet wordt in een hormonaal antwoord (exocytose van het hormoon).

Met behulp van de thans genoemde kenmerken: de ligging in het zenuwstelsel, de lichtmicroscopische kenmerken zoals de celdiameter en kleurbaarheid van het neurosecreet, de elektronenmicroscopische gegevens over grootte en elektronendichtheid van elementair granula en eventueel de chemische structuur van het hormoon, kan men op plattegronden de aantallen en typen van neurosecretorische cellen aangeven.

Complete *plattegronden* zijn er nog niet veel. Het eerder genoemde voorbeeld van de poelslak (figuur 6) is bijzonder overzichtelijk doordat de celtypen zo fraai in aparte groepen liggen. Dit geval is hoogst uitzonderlijk. Heel vaak liggen de verschillende celtypen gedeeltelijk vermengd, of zelfs, zoals bij de Coloradokever (Schooneveld, 1970) volledig door elkaar. Illustratief voor de grote problemen die men ontmoet bij het nauwkeurig in kaart brengen van neurosecretorische systemen is het geval van de rat, waar men ook nu nog steeds niet een volledig beeld heeft van het verloop van de banen en de afgifteplaatsen van bepaalde

neurohormonen (het hoofdstuk van Van Wimersma Greidanus en De Wied behandelt dit onderwerp uitvoerig). Toch is een volledig inzicht van de ligging der neurosecretorische cellen een voorwaarde voor het gericht opsporen van hun functie. Het is immers typerend voor het functioneren van endocriene systemen dat een gedeeltelijke wegnahme van de hormoonvormende cellen geen effect sorteert, daar de resterende cellen door verhoging van hun produktie het verlies kunnen compenseren.

Functionele betekenis van neurohormonen

Wanneer men kennis neemt van de manier waarop de functie van neurohormonen in het allereerste begin van de geschiedenis der neuro-endocrinologie ontdekt is, blijkt dat toevalligheden een belangrijke rol hebben gespeeld. Zo bestudeerden Perkins en Koller onafhankelijk van elkaar de kleurveranderingen die garnalen kunnen vertonen als aanpassing aan de kleur van de ondergrond. De kleurverandering komt tot stand doordat de pigmentgranula in de chromatoforen zich meer of minder uitspreiden binnen de sterk vertakte uitlopers van deze cellen. Het was reeds duidelijk geworden dat voor de kleurverandering de ogen onmisbaar zijn. Maar experimenten die bedoeld waren om aan te tonen dat de zenuwen naar de gebieden met de betreffende chromatoforen de commando's voor de concentratie of verspreiding van granula overbrengen, vielen negatief uit. Beschadiging van de bloedvaten naar het abdomen bleek reeds voldoende om de reactie van de chromatoforen uit de schakelen. Toch kon men geen kleine zenuwen langs die bloedvaten ontdekken. Eerst na al deze proeven kwam men tot de conclusie dat bloedvaten bloed transporteren waarin soms hormonen aanwezig zijn. Zowel Perkins als Koller publiceerden in 1928 het onverwachte resultaat dat injecties van oogsteelextracten kleurveranderingen in hun garnalen konden bewerkstelligen en dat zij hierin de werking van een hormoon veronderstelden. Uit vele latere onderzoeken is gebleken dat hun visie volkomen juist was. Bij de Crustacea komen meerdere neurohormonen voor die in de sinusklieren van de oogstelen worden afgegeven (figuur 3) en die elk chromatoforen met een bepaalde kleur granula reguleren. Kleurverandering kan optreden als aanpassing aan de ondergrond, kan een rol spelen bij het sexueel gedrag, of kan, zoals bij de wenkkrab *Uca pugilator*, ritmisch verlopen met het getij.

Het zou te ver voeren om het boeiende verhaal over de ontdekking van de functie van neurohormonen bij de insecten gedetailleerd weer te geven. Het was Wigglesworth die in de dertiger jaren bezig was met het bestuderen van de voedingsgewoonten van de bloedzuigende wants *Rhodnius prolixus*. Deze dieren hebben aan één grote bloedmaaltijd voldoende om een geheel larvestadium door te komen. Na de maaltijd verwijderde Wigglesworth de zuigsnuut om elke voedselopname uit te sluiten. Onder zijn proefdieren bleken er enkele te zijn die daarna niet vervelden. Het is een geniale zet van hem geweest om te gaan uitzoeken waarom deze dieren niet verveld waren. Hij ontdekte dat hij bij de niet vervelde dieren met de zuigsnuut een deel der hersenen verwijderd had. Verder experimenteel werk toonde aan dat de hersenen een endocriene factor produceren die de vervelling in gang zet met tussenkomst van een endocriene klier. Jammer voor Wigglesworth was, — een collega maakte hem er op attent — dat zijn vondst al eerder, en wel reeds omstreeks 1920, was gedaan door Kopeč, die met mottelarven werkte, maar wiens publikatie niet aansloeg, kennelijk omdat de tijd er niet rijp voor was.

Deze toevallige opsporing van de functie van neurosecretorische cellen had plaats vóór de tijd waarop deze histologisch geïdentificeerd en gelokaliseerd werden. Kent men de positie van de cellen, dan worden andere technieken toepasbaar. De klassieke endocrinologische methode voor de opsporing van de produktieplaats van een hormoon is die, waarbij men het veronderstelde endocriene centrum verwijdert, de daarna optredende uitvalsverschijnselen opspoort, en vervolgens herstel tracht te verkrijgen door implantatie van het eerst weggenomen orgaan of door injectie van een extract van dat orgaan. Omdat neurosecretorische cellen geen afzonderlijke organen vormen pleegt men de cellen te doden door cauterisatie (plaatselijke verhitting) met een hoogfrequente elektrische stroom. Bij evertetraten kan men daarna hele ganglia waarin de te onderzoeken celgroepen liggen met hun neurohemale organen implanteren om zelf te zien of dit herstel oplevert. Dit gaat vooral goed bij dieren met een open bloedvaatstelsel, bijvoorbeeld bij kreeftachtigen, insecten en mollusken (Geraerts, 1975). Bij vertetraten is dit niet mogelijk; dan is men geheel aangewezen op injectie van extracten.

In vrijwel alle diergroepen zijn nu functies van neurohormonen bekend. Het grootste aantal functies is bekend bij de insecten, Crustacea

en vertebraten. De processen die door deze hormonen gecontroleerd blijken te worden, vertonen in de verschillende diergroepen sterke overeenkomst. Het is zeer opvallend dat steeds weer dezelfde functies terugkeren: regulatie van voortplanting, groei, stofwisseling en water- en ionenhuishouding. Maar ook zien we dat bijzondere, voor de betreffende diergroep typische functies ontdekt worden: regulatie van de vervelling bij geleedpotigen, van de kleurverandering bij kreeften en garnalen, van de schelpgroei bij slakken, en van de melkafgifte bij zoogdieren.

Het is dus niet zo zeer op het punt van de functies dat er grote verschillen bestaan tussen verschillende diergroepen. Is er dan geen duidelijke ontwikkelingslijn te zien in de neuro-endocriene systemen? Deze is er wel, maar ligt meer in het vlak van de directe of indirecte beïnvloeding van de doelwitorganen, zoals hieronder zal blijken.

Ontwikkeling van het principe der neurosecretie

Tot nu toe hebben wij in onze redenering over hormonen in het geheel geen aandacht geschonken aan het feit dat er dieren voorkomen die geen bloedvaatstelsel bezitten en dus per definitie ook geen hormonen kunnen hebben. Dit is het geval bij de sponzen, de poliepen en kwallen en de platwormen. Bij deze dieren zijn tot nu toe inderdaad geen endocriene klieren ontdekt. Maar zij hebben wel neurosecretorische cellen. Met grote zekerheid is dit het geval bij *Hydra*. Uit functioneel onderzoek van Schaller (1976) is gebleken dat bij dit dier een neurohormoon met een peptidekarakter en een molecuulgewicht van 1000 voorkomt, dat de vorming van nieuwe poliepjes en de celdelingen stimuleert, en dat reeds werkzaam is bij ongelooflijk geringe concentraties in het water, namelijk bij minder dan 10^{-10} mol/l. Dit hormoon kan gewonnen worden uit elementair granula met een diameter van 120 nm. Elektronenmicroscopisch onderzoek van Westphall (1973) bracht een wel zeer bijzonder feit aan het licht. Zij toonde aan dat bij *Hydra* neuronen voorkomen die de eigenschappen van zintuigcel, schakelneuron, motorneuron en neurosecretorische cel alle in zich verenigd hebben (figuur 8a). Het is zeer verleidelijk om uit deze ontdekking de conclusie te trekken dat in de eerste dierlijke vormen die tijdens de evolutie ontstonden, de zenuwcel een primitief karakter had, waarin taken die we later in aparte cellen vinden nog alle door één cel konden worden verricht.

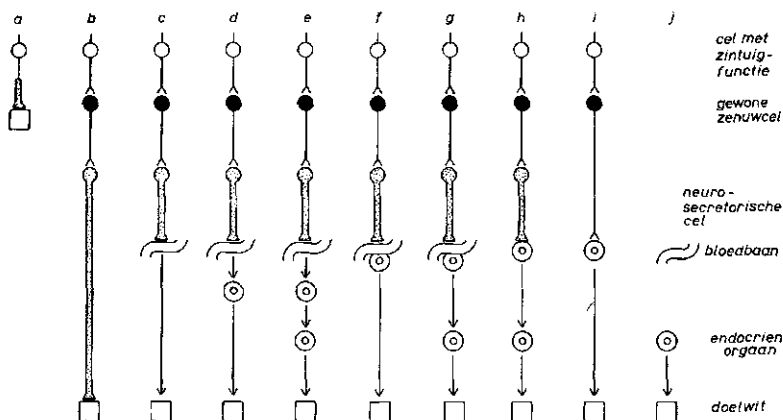


Fig. 8. Vergelijking van de verschillende mogelijkheden voor (neuro-)endocriene controle in het dierenrijk (voor nadere verklaring wordt verwezen naar de tekst).
 a. primitieve neurosecretie (bijvoorbeeld bij Hydra);
 b. perifere neurosecretie (bijvoorbeeld bij insecten en slakken);
 c. neurohormonale regulatie (bij alle dieren die een bloedvaatstelsel bezitten);
 d en e. neuro-endocriene regulatie; neurosecretorische mechanismen van de tweede en derde orde (d bij alle dieren die endocriene organen bezitten; e alleen bij vertebraten);
 f en g. als e, maar met een portaal systeem (bij vertebraten);
 h. neurosecretomotorische innervatie (bijvoorbeeld in de hypofyse-voorkwab van vissen);
 i. nerveuze regulatie van endocriene organen (bijvoorbeeld optische klieren van inktvissen en bijniemerg der vertebraten);
 j. endocriene regulatie los van het neurosecretorische systeem (bijvoorbeeld de hormonen betrokken bij de calcium-stofwisseling van zoogdieren).

Bij die taken hoorde dan ook reeds de produktie van hormonen. Deze neurohormonen konden via de axonen bij hun doelwit-cellen worden afgegeven. Daardoor is de concentratie plaatselijk hoger. Het hormoon bereikt de cellen door diffusie. Deze vorm van endocriene regulatie zou dan de meest oorspronkelijke zijn.

Hoewel deze benadering van de onderzoeksresultaten met *Hydra* speculatief is, is de lokale afgifte van hormonen zonder gebruik te maken van het bloedtransport de laatste tijd meer in de aandacht gekomen. Er is reeds op gewezen bij de bespreking van het verschijnsel van perifere neurosecretie bij slakken en insecten. Dit houdt in dat de neu-

rosecratorische cel zich in een dergelijk geval meer gedraagt als neuron dan als endocriene cel: de axonen van neurosecratorische cellen lopen naar de doelwit-organen toe en geven daar tussen de cellen hun hormoon af. Dit hormoon komt daarna eventueel wel weer door diffusie terecht in de bloedbaan, maar lokaal is de concentratie van het hormoon veel hoger dan in het bloed.

Een vergelijkbaar verschijnsel is beschreven voor de hypofyse van vissen (zie het hoofdstuk van Van Oordt). Daar lopen de axonen der neurosecratorische cellen naar de hypofysevoorkwab toe. Hun neurohemale uiteinden maken zelfs een synapsachtig contact met de daar aanwezige endocriene cellen. Hier gedragen de neurosecratorische cellen zich dus meer als gewone neuronen voor wat betreft de overdracht van hun boodschap. Men heeft dit verschijnsel neurosecretomotorische innervatie genoemd (figuur 8h). Het is mogelijk dat deze bijzondere vormen van neurohormoonafgifte vooral ten doel hebben dat de doelwitcellen met een hoge hormoonconcentratie gestimuleerd kunnen worden. Daarmee staan deze vormen op één lijn met het reeds genoemde portale systeem dat de neurohormonen uit de hypothalamus rechtstreeks voert naar de hypofysevoorkwab (figuur 8f, g en de paragraaf 'Klassieke neurosecratorische systemen').

Uit het feit dat de perifere neurosecretie en de neurosecretomotorische innervatie nog steeds zeer verspreid door het dierenrijk voorkomen, mogen we concluderen dat de wijze waarop het neuro-endocriene systeem bij *Hydra* is georganiseerd niet abnormaal is, maar eenvoudig samenhangt met het ontbreken van het bloedvaatstelsel. Het kan daarom zeer goed functioneren als hypothetisch model voor de herkomst van endocriene systemen: deze zijn voorafgegaan door neuro-endocriene systemen. Daarmee dringt zich wel meteen de vraag op of de primitieve neuronen eerst overgegaan zijn tot de produktie van kortlevende transmitters of van langer levende neurohormonen. Hierover kan men slechts opmerken dat de werkingwijze van prikkeloverdracht met behulp van transmitters gespecialiseerder is, en dat daarom de secretie van hormonen oorspronkelijker zou kunnen zijn. Dit principe treffen we immers ook reeds bij planten aan.

Neurosecretorische mechanismen

Onder de diergroepen die men algemeen als de 'lagere' ziet, zijn het de gelede wormen die als laagst ontwikkelde groep een bloedvaatstelsel bezitten. Bij de Oligochaeta (bijvoorbeeld de regenworm) kent men geen structuren die als endocrien orgaan zouden kunnen functioneren. Dit is mogelijk wel het geval bij de Polychaeta (bijvoorbeeld *Nereis*), waar in de omgeving van het neurohemale gebied in de cerebrale ganglia groepen cellen liggen die vermoedelijk een endocriene functie hebben (de intracerebrale klier: figuur 2). Zolang dit nog niet definitief bewezen is, moeten we stellen dat in alle wormengroepen de neurohormonen direct op hun doelwit-organen werkzaam zijn. Men noemt dit wel neurosecretorische mechanismen van de eerste orde. Zij komen in alle diergroepen voor (figuur 8c en figuur 9).

Bij de geleedpotigen, de mollusken, de stekelhuidigen en de vertebraten komen daarnaast tweede orde mechanismen voor (figuur 8d en figuur 9). Hierbij oefent het neurohormoon een regulerende invloed uit op een endocrien orgaan, dat op zijn beurt het doelwit-orgaan met zijn

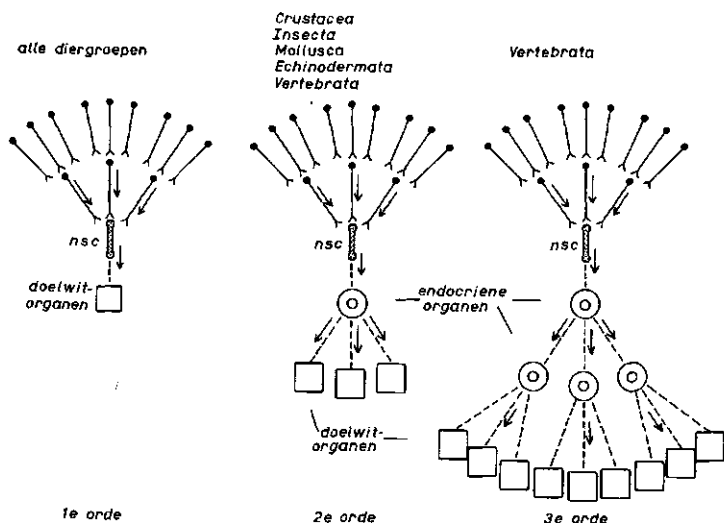


Fig. 9. De verschillende orden van neurosecretorische mechanismen en het voorkomen daarvan in het dierenrijk. nsc = neurosecretorische cellen. (Afgeleid van Scharrer & Scharrer, 1963.)

hormoon reguleert. Voorbeelden zijn de regulatie van de vervelling bij geleedpotigen, waar het endocriene orgaan door de prothoracaalklier bij de insekten en het Y-orgaan bij de Crustacea vertegenwoordigd wordt. Voorts wordt de vrouwelijke voortplantingsactiviteit bij de poelslak eveneens met tussenkomst van een endocrien orgaan, de dorsaallichaampjes, gestimuleerd. Tenslotte kunnen we bij de vertebraten stellen dat de afgifte van groeihormonen van de hypofysevoorkwab neurohormonaal gereguleerd wordt.

Neurosecretorische mechanismen van de derde orde zijn alleen bekend van de vertebraten (figuur 8e en figuur 9). Bij deze dieren wordt de voortplanting gereguleerd door geslachtshormonen die vooral in de gonaden geproduceerd worden. De hormoonsecretie van gonaden wordt gereguleerd door hormonen uit de hypofyse. De hypofysevoorkwab-cellen die deze hormonen produceren worden op hun beurt weer gereguleerd door neurohormonen uit de hypothalamus, zodat tussen het neurohormoon en het doelwit-orgaan twee hormonen geplaatst zijn. De regulatie van de schildklierhormoon-secretie vindt volgens een vergelijkbaar schema plaats.

Men is algemeen van mening dat in deze reeks neurosecretorische mechanismen van eerste tot derde orde een ontwikkelingslijn te zien is van de endocriene systemen. Het ingewikkelde samenspel van een aantal hormonen dat betrokken is bij de regulatie van een bepaald proces zou de stabiliteit van zulke systemen bij de hoger ontwikkelde vormen kunnen bevorderen. Men zou kunnen stellen dat enerzijds vanuit de primaire zenuwstelsels waar de neurohormonale systemen deel van uit maken, aan de nerveuze kant van de neurosecretorische cel zich een steeds verfijnder georganiseerd zenuwstelsel ontwikkelde met toenemende integrerende capaciteiten, en dat anderzijds aan de kant van de doelwitorganen een endocrien systeem is ontwikkeld dat op zich door terugkoppelingsmogelijkheden een eigen endocriene integratie-capaciteit verkreeg (figuur 10a).

Keren we nog eens terug naar onze eerste gedachte over de betekenis van de neurosecretorische cel, dan krijgt deze in de verst ontwikkelde systemen de merkwaardige plaats van vertaler van een boodschap die het resultaat is van de integrerende capaciteit van het hoog ontwikkelde centrale zenuwstelsel. Deze boodschap wordt doorgegeven aan een endocrien systeem dat daarmee weer een gecompliceerd samenspel van hormonen in gang zet. Men heeft de neurosecretorische cel zoals nu weer-

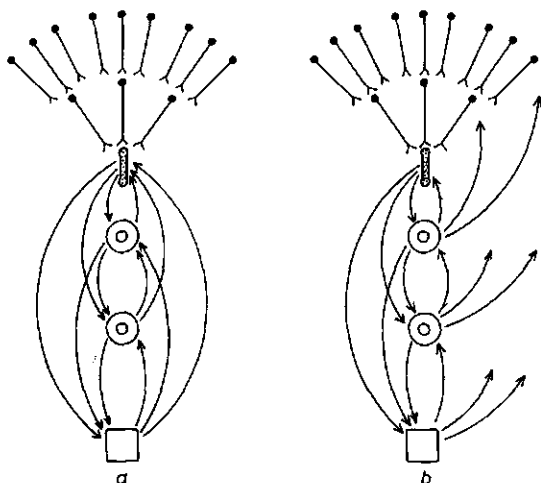


Fig. 10. Het terugkoppelingsmechanisme:

a. binnen het endocriene systeem en

b. met inbegrip van de werking van het terugkoppelingsmechanisme van hormonen op het zenuwstelsel.

gegeven wel de naam 'final common pathway' gegeven, een naam die voor zichzelf spreekt als men de suggestieve figuur hiervoor van E. en B. Scharrer beziet (figuur 9, 3e orde).

Neuro-endocriene integratie

Toch kan dit beeld nog niet volledig zijn. Het is niet goed denkbaar dat het zenuwstelsel geen informatie terug zou ontvangen over wat er zich allemaal afspeelt in het endocriene systeem dat het zelf regeert. Dit zou moeten betekenen dat hormonen op enigerlei wijze een invloed hebben op het zenuwstelsel. Dit blijkt inderdaad het geval te zijn. Men moet deze effecten echter in twee categorieën onderscheiden.

In de eerste plaats is reeds lange tijd bekend dat de gedragingen van dieren in de voortplantingstijd sterk verschillen van die buiten de voortplantingsperiode. De hormonen die betrokken zijn bij de regulatie van de voortplanting oefenen een directe invloed uit op bepaalde zenuwcentra van waaruit het seksuele gedrag wordt geïnduceerd. De wijze waarop

de hormonen deze verandering in het zenuwstelsel tot stand brengen is nog lang niet duidelijk. Een model voor dit type onderzoek dat door neurofysiologen hoog aangeslagen wordt, is de verminderde eetactiviteit en kruipbewegingen van de zeeslak *Aplysia* wanneer in zijn bloed het ovulatiehormoon circuleert.

Het tweede type effect van hormonen op het zenuwstelsel heeft betrekking op de regulatie van de activiteit (hormoon synthese en afgifte) van de neurosecretorische cellen (Roubos, 1976). Over dit toch wel zeer centrale probleem in de neuro-endocrinologie is nog niet veel concreets te zeggen. Het probleem kan als volgt omschreven worden. Elke regulatie is alleen mogelijk als bericht ontvangen wordt over de reactie van het doelwit. Een zenuwcel die een andere zenuwcel een bericht doorgeeft, ontvangt meestal van dit tweede neuron via een speciale uitloper informatie over de reactie van deze cel (figuur 1). Endocriene systemen werken eveneens met dit principe van terugkoppeling: de insuline-producerende cellen in het pancreas meten zelf de suikerconcentratie in het bloed en verminderen hun hormoonafgifte als deze concentratie door het effect van het eigen hormoon verlaagd is (negatieve terugkoppeling van de suikerspiegel in het bloed).

In de neurosecretorische cel zijn beide regulatiesystemen met hun eigenschappen verenigd. Het neuron dat de neurosecretorische cel stimuleert kan over zijn activiteit niet door de neurosecretorische cel zelf geïnformeerd worden, want deze kan geen transmitterstoffen maken die voor de overdracht van die boodschap nodig zijn en deze heeft geen uitlopers die eindigen op andere zenuwcellen. Er zouden dus neuronen moeten bestaan die gevoelig zijn voor de concentratie in het interne milieu van het neurohormoon dat door de neurosecretorische cel wordt afgegeven en waarvan zij de activiteit reguleren; ofwel, bij neurosecretorische mechanismen van hogere orde een gevoeligheid voor de hormonen die door neuro-endocrien gereguleerde endocriene organen geproduceerd worden (bijvoorbeeld hormonen geproduceerd door de gonaden).

Onderzoek over deze problematiek vergt een goede samenwerking van neurofysiologen en endocrinologen. Dat is waarschijnlijk een van de redenen waarom het lang heeft geduurd voordat hier grondig onderzoek over verricht werd. Het probleem van de regulatie van de neurosecretorische activiteit staat momenteel sterk in de belangstelling. Bij vertebraten is reeds aangetoond dat de hierboven genoemde terugkoppelings-

mechanismen op het centrale zenuwstelsel inderdaad bestaan. Een hypothetisch schema hiervoor is weergegeven in figuur 10b. Dit schema illustreert hoe nauw het nerveuze en endocriene systeem met elkaar geïntegreerd zijn.

Nerveuze regulatie van endocriene organen

Er zijn enige gevallen bekend van endocriene organen die nerveus gereguleerd worden (figuur 8i).

Onder de evertebraten betreft dit vooral de optische klieren van inktvissen. Deze klieren produceren een hormoon dat de voortplantingsactiviteit in al zijn aspecten stimuleert. Merkwaardig is dat deze klieren onder remmende invloed staan van hersenzenuwen. De overdracht van de prikkels aan de endocriene cellen geschiedt met behulp van een transmitterstof. Snijdt men de zenuwen naar deze klieren door, dan worden ze hyperactief (Highnam & Hill, 1977).

Zeer recent is een tweede geval bekend geworden, namelijk de nerveuze regulatie van de afgifte van het adipokinetisch hormoon bij de treksprinkhaan *Locusta migratoria*. Dit hormoon verhoogt het lipide gehalte in het bloed van deze dieren tijdens een vluchtperiode (het hoofdstuk van Beenackers behandelt dit onderwerp uitvoeriger).

Deze beide gevallen betreffen echter endocriene organen, waarvan de cellen bepaalde nerveuze kenmerken bezitten zoals kleine uitlopers. In hun ontstaan vertonen ze ook een relatie tot het zenuwstelsel. Zelfs blijkt het adipokinetisch hormoon een klein eiwitmolecuul te zijn (decapeptide) (Stone et al., 1976). Mogelijk zijn deze endocriene organen daarom te beschouwen als buiten het zenuwstelsel geplaatste groepen neurosecretorische cellen, waarvan de nerveuze kenmerken gereduceerd zijn. In deze richting ontwikkelen zich misschien ook de zogenaamde 'bag cells' van *Aplysia*, die een ovulatiehormoon produceren. Deze cellen bezitten nog alle nerveuze eigenschappen van neurosecretorische cellen, doch liggen in aparte groepen om de bases van zenuwen in lobben van het abdominale ganglion. In tegenstelling tot het verschijnsel van de perifere neurosecretie waarbij de neurosecretorische cel zich meer neuronaal gedraagt (figuur 8b), is in de hier genoemde voorbeelden het endocriene karakter van deze cellen meer op de voorgrond getreden.

Bij de vertebraten is het bijniermersg of chroomaffine-weefsel te be-

schouwen als een nerveus gereguleerde klier. Deze vormt het hormonaal werkzame adrenaline en noradrenaline. Dit zijn stoffen die ook bekend zijn als transmitterstof van zenuwcellen. Het bijniervorm is daarom te beschouwen als een endocrien orgaan dat ontstaan is uit groepen gewone neuronen waarvan de uitlopers op vergelijkbare wijze gereduceerd zijn als hierboven voor neurosecretorische cellen werd gesuggereerd.

Niet-neurohormonaal gereguleerde endocriene organen

In het voorgaande werd de betekenis der neurosecretie centraal gesteld. Daarbij is naar voren gebracht dat in het verleden de regulatie door neurohormonen vermoedelijk voorafgegaan is aan de regulatie door hormonen afkomstig van endocriene organen. Dit zou kunnen suggereren dat endocriene organen altijd in relatie tot neurohormonale systemen zouden moeten staan. Bij de evertrebraten zijn tot nu toe inderdaad geen endocriene organen ontdekt die los staan van een neuro-endocriene controle.

Bij vertebraten bestaan deze wel. De hormonen die betrokken zijn bij de regulatie van de maag-darm-secretie en die welke de calcium-stofwisseling reguleren kunnen kennelijk via terugkoppelingsmechanismen zonder bemoeienis van het zenuwstelsel functioneren (figuur 8j). De processen die zij reguleren hebben ook weinig te maken met externe milieufactoren.

Samenvatting

Neurosecretorische cellen komen voor in alle dierlijke organismen. Het zijn zenuwcellen die prikkels kunnen opnemen van gewone zenuwcellen en deze omzetten in een hormonaal antwoord door de uitscheiding van een neurohormoon. Binnen één diersoort komen meerdere typen neurosecretorische cellen voor, die elk een eigen functie hebben en een speciaal type hormoonmolecuul afgeven. Deze neurohormonen zijn voor zover bekend altijd kleine eiwitmoleculen (peptiden).

Men onderscheidt klassieke neurosecretorische systemen waarbij de cellen in groepen liggen, waarvan de axonen in bundels lopen naar neurohemale organen waar zij het hormoon in het bloed afgeven. Daarnaast komen verschijnselen als perifere neurosecretie voor: de neurosecretorische cellen breiden hun axonen daarbij uit tot in de doelwit-orga-

nen. Dan treedt het neuronale karakter van de neurosecretorische cel meer op de voorgrond.

Neurohormonen kunnen voorts direct regulerend werkzaam zijn op de doelwit-organen, of dit kan geschieden door tussenkomst van een tweede hormoon geproduceerd door een endocrien orgaan. Zelfs kunnen twee successieve hormonen tussengeschakeld zijn. Deze drie mechanismen komen naast elkaar voor bij de vertebraten. Bij de geleedpotigen, de mollusken en de stekelhuidigen treft men de beide eerstgenoemde mechanismen aan, terwijl in de lagere diergroepen alleen het eerste mechanisme is gevonden. Waarschijnlijk vertegenwoordigt dit mechanisme de historisch primaire vorm van endocriene regulatie.

Het feit dat neurosecretie bij alle dieren voorkomt, duidt er op dat het een zeer fundamentele betekenis heeft. Neurohormonen blijken te zijn betrokken bij de regulatie van bijvoorbeeld groei, voortplanting, stofwisseling en water- en ionenhuishouding. Deze processen moeten nauwkeurig afgestemd worden op milieufacties zoals temperatuur, daglengte, voedselbeschikbaarheid, zoutgehalte. Milieufacties worden geregistreerd door zintuigen en geïntegreerd door het zenuwstelsel. Het is de taak van neurosecretorische cellen om de hieruit resulterende informatie hormonaal vertaald door te geven aan de verschillende organen in het lichaam. Daarmee vervullen zij een onmisbare schakelfunctie in de voortdurende interactie van het dier en zijn milieu.

Het binnenspel van vissen en derzelver voortplanting

P.G.W.J. van Oordt

*'Het is te verwonderen, datter treffelijke lieden zijn,
die groot gelt besteedden aen Kinckhorens en Mosselschelpen
daar niet fraeys aan is als de seldsaemheidt ... Ey, Heeren
Apen, Ghy verstaet het binnen spel niet.'*

Roemer Visser
'Sinnepoppen.'

Inleiding

Enige duizenden jaren geleden leefde de mens van wat hij in de natuur aantrof. Z'n voedsel verkreeg hij door het verzamelen van vruchten en door de jacht op land- en waterdieren. Civilisatie maakte een einde aan deze primitieve manier van voedselvoorziening; de mens ging vruchtboomen planten, graan en groente verbouwen, schapen, geiten en runderen hoeden. De jacht werd een opwindend tijdverdrijf, of — met een modern woord — een sport. Tenminste, voor zover het landdieren betraf. Bij de jacht op waterdieren was en is het sportieve element kwantitatief gezien onbetekenend. Daar gaat het nog voornamelijk om het verzamelen van voedsel in de natuur.

Op visserijgebied zijn we vergeleken met onze verre voorvaders alleen in technisch opzicht voortgeschreden. Maar dan ook zo ver voortgeschreden, dat we onvoorstelbare hoeveelheden vis aan de zeeën kunnen onttrekken. Met de groei van de wereldbevolking en de toenemende vraag naar eitwitrijk voedsel zou dat ook een goede zaak zijn, ware het niet dat de zeeën ondanks hun uitgestrektheid niet onuitputtelijk zijn. Er komt een eind aan de mogelijkheid om in steeds kortere tijd steeds grotere hoeveelheden vis aan land te brengen. Vangstbeperking is bepaald geen luxe. Ja, spoedig zal de tijd moeten aanbreken, dat we de vissen en schaaldieren die we willen opeten, op dezelfde wijze hebben

verkregen als de rest van ons voedselpakket, namelijk door eigen kweek.

Er wordt al heel wat vis gekweekt: zes miljoen ton per jaar. Maar in 1985 moet dat naar de mening van de Wereld Voedsel- en Landbouworganisatie (1976) twaalf miljoen ton zijn, en rond de eeuwwisseling dertig miljoen ton. Kustgebieden, al of niet gedraineerde moerassige streken, meren, rivieren en andere delen van het aardoppervlak die niet toegankelijk zijn voor landbouw en veeteelt, kunnen uitstekend dienen voor het kweken van vis, vooral als de plaatselijke bevolking gewend is met waterdieren om te gaan en in het achterland vis graag gegeten wordt. Maar ook dan is aquacultuur niet alleen een kwestie van de aanleg van vijvers en de opleiding van technici; dan gaat het ook om het verrichten van een grote hoeveelheid wetenschappelijk onderzoek; onderzoek op zo uiteenlopende gebieden als de sociologie en de technologie, en de pathologie, fysiologie en endocrinologie van vissen. Om namelijk op economisch verantwoorde wijze vissen te kweken, moet de verwerking van het produkt goed zijn, mag de kostprijs de opbrengst niet overtreffen, en moet men heel goed weten onder welke omstandigheden de dieren een optimale groei vertonen en wat gedaan moet worden om de aanmaak van rijpe geslachtscellen ongestoord te doen verlopen.

Bij sommige zoetwatervissen, zoals karpers, tilapia's en forellen, vormt de kweek niet zo'n groot probleem. Ze stellen eisen aan hun milieu, die goed in te willigen zijn, en kunnen dan ook vrij eenvoudig in gevangenschap tot een voorspoedige groei en tot voortplanting gebracht worden. Er zijn echter ook soorten waarbij dat anders ligt, en waarbij met name de voortplanting in gevangenschap grote moeilijkheden oplevert. Dat geldt bijvoorbeeld voor de hardersoorten (*Mugil spp.*) en voor de bandeng of 'milkfish' (*Chanos chanos*). Het gaat hier om euryhaliene zeewatervissen met een zeer wijde verspreiding. Beide hebben de gewoonte hun eieren te leggen in kustwateren. De larven zwemmen dan naar riviermondingen, lagunes en moerassige gebieden, waar ze een overvloed aan voedsel vinden en goed groeien. Voor de geslachtsrijping en voortplanting trekken ze weer tijdig terug naar zee.

Deze levenswijze is al eeuwenlang bekend, en wat de harder betreft maakt men er in Italië en Israël gebruik van door de jonge vissen vóór hun anadrome trek te vangen en over te brengen naar afgesloten zoet- of brakwaterbekkens. Hetzelfde gebeurt met de bandeng in pacifische kustlanden (Korringa, 1976). Het houden in zoet- of brakwater levert

voor de groei geen enkel probleem op, maar het is op enkele uitzonderingen na nog nooit gelukt harders en bandengs in gevangenschap tot voortplanting aan te zetten. Voor jong broed was en is men aangewezen op de natuurlijke bron: de kustwateren. De laatste jaren is de vangst van harder- en bandenglarven echter sterk teruggelopen. Zo sterk zelfs, dat de eeuwenoude kweek van deze vissoorten wordt bedreigd, en dát in een tijd dat de aquacultuur juist gestimuleerd moet worden.

Er zal dus wat gedaan moeten worden om op kunstmatige wijze bevruchte eieren van harders en bandengs te verkrijgen, en trouwens niet alleen van deze soorten, maar van veel meer beenvissen, waarvan thans nog uitsluitend grote hoeveelheden aan de natuur onttrokken worden. Daartoe wordt de endocrinoloog te hulp geroepen. De voortplanting wordt immers gereguleerd door hormonen. Wellicht kan de endocrinoloog zeggen wat je aan al deze vissen moet toedienen om ze rijpe eieren en sperma te doen afzetten. Maar dan moet die onderzoeker wel weten hoe de hormonale regulatie van de vorming en het afzetten van rijpe geslachtsprodukten bij beenvissen in het algemeen tot stand komt en zal hij in staat moeten zijn door eigen werk leemten in de kennis op te vullen. Gelukkig bestaat er over dit onderwerp veel literatuur; zo veel zelfs, dat ik me bij de onderhavige bespreking ervan moet beperken tot het aangeven van enkele hoofdlijnen (M. Fontaine heeft recent een overzichtsartikel geschreven; 1976).

Het endocriene stelsel van beenvissen

Vooropgesteld zij, dat het endocriene stelsel van beenvissen niet afwijkt van het algemene, in de voorafgaande hoofdstukken geschetste beeld, en dus bestaat uit een neuro-endocrien gedeelte en uit een aantal endocriene klieren. Dat neuro-endocriene gedeelte kan, zoals bij alle vertebraten, omschreven worden als het hypothalamus-neurohypofysesysteem. Onder de endocriene klieren neemt de adenohipofyse een centrale plaats in. Van daaruit wordt namelijk de activiteit van perifere endocriene klieren, zoals de schildklier, het interrenale weefsel en de gonaden gereguleerd. Omgekeerd echter wordt de activiteit van de adenohipofyse zowel door diezelfde perifere endocriene organen als door het hypothalamus-neurohypofysesysteem bepaald.

Er zijn dus aan het endocriene stelsel van vertebraten zoals beenvissen drie componenten te onderscheiden, te weten het hypothalamus-

neurohypofyse systeem, de adenohipofyse en de perifere endocriene klieren. De betekenis van ieder van deze drie componenten voor de regulatie van de voortplanting zal nu worden besproken, te beginnen met de centrale endocriene klier: de adenohipofyse.

De adenohipofyse (figuur 1)

Tijdens de embryonale ontwikkeling wordt de adenohipofyse bij beenvissen aangelegd als een massieve verdikking van het ectoderm juist boven het voorste ectodermale deel van de darm. Het betreffende groepje cellen is gelegen tegen de ventrale wand van de voorhersenen, en wel onder dat deel, dat zich differentieert tot infundibulum. In de bodem van het infundibulum dringen tijdens de ontwikkeling steeds meer bundels van zenuwvezels door. Daarbij ontstaat de neurohypo-

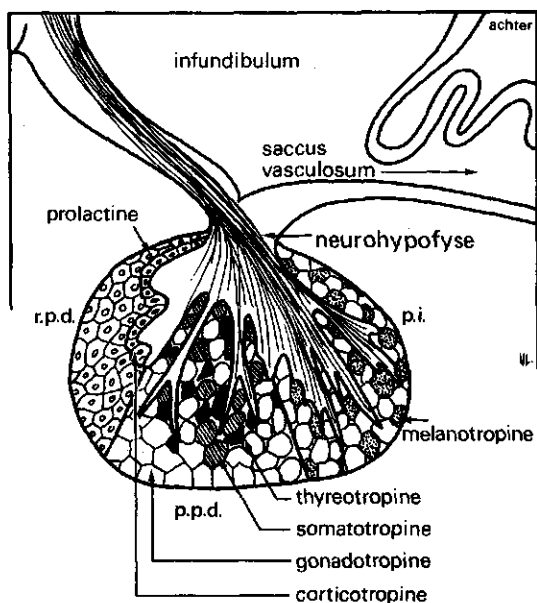


Fig. 1. Schematische overlangse doorsnede door de hypofyse van een beenvis. r.p.d. = rostrale pars distalis, p.p.d. = proximale pars distalis, p.i. = pars intermedia. De namen van de hormonen verwijzen naar het celtype van de adenohipofyse waarin deze hormonen gevormd worden.

fyse, die er uit ziet als een schijnbaar onregelmatig vertakt systeem van zenuwbundels in de adeno-hypofyse.

In volwassen toestand is die adeno-hypofyse een discus- tot eivormig orgaan-tje, dat de neurohypofyse uitlopers omgeeft. Nu zijn die uitlopers van de neurohypofyse niet zo onregelmatig tussen het adeno-hypofyse-weefsel vertakt als op het eerste gezicht wel lijkt. Een overlangse coupe door de gehele hypofyse laat zien, dat de meeste en de breedste vezels eindigen in het achterste deel van de adeno-hypofyse, dat in analogie met het overeenkomstige deel bij de tetrapoden *pars intermedia* wordt genoemd. De rest van de adeno-hypofyse heet dan om dezelfde reden *pars distalis*.

Als nu de zojuist genoemde overlangse coupe afkomstig is van goed gefixeerd weefsel, en men gaat die coupe kleuren volgens een methode waarmee verschillende typen secretiegranula op grond van verschillen in affiniteit voor bepaalde kleurstoffen kunnen worden onderscheiden, dan blijkt de adeno-hypofyse grotendeels opgebouwd te zijn uit een zevental verschillende typen klier-cellen, ieder met voor het celtype karakteristieke secretiegranula in het cytoplasma. Niet alleen in het licht-microscopische beeld zijn die typen van elkaar te onderscheiden, maar ook op elektronenmicroscopische foto's. Daarbij gaat het om verschillen in vorm en grootte van de granula en om verschillen in elektronen-dichtheid van de inhoud.

Op grond van de kleurbaarheid van de granula verdeelt men de cel-typen in twee categorieën: de basofiele en de acidofiele. Die namen duiden op verschillen in affiniteit voor basische en zure kleurstoffen. Dit criterium leverde in de praktijk zoveel problemen op, dat het is verlaten, maar de namen basofiel en acidofiel zijn blijven bestaan. Men duidt er tegenwoordig mee aan of een cel respectievelijk PAS-positieve of PAS-negatieve secretiegranula bevat. 'PAS' is een afkorting van 'peri-odic acid-Schiff', de naam van een kleurmethode voor 1,2-glycolgroepen in koolhydraten, onder andere aanwezig in glyco- en mucoproteïnen. Adeno-hypofyse-cellen, die dergelijke stoffen bevatten, zijn PAS-positief, de overige PAS-negatief.

Er zijn honderden beschrijvingen van de celtypen in de adeno-hypofyse van beenvissen (van Oordt, 1968; Ball & Baker, 1969; Holmes & Ball, 1974). Daaruit blijkt enerzijds een zekere soortsvariatie, anderzijds een duidelijk bij alle soorten voorkomend thema. Dat thema is als volgt: in de *pars intermedia* komen twee celtypen voor, het ene PAS-positief,

het andere PAS-negatief, en in de pars distalis komen een stuk of vijf celtypen voor. Die liggen daar niet kris-kras door elkaar, maar vertonen een duidelijke lokalisatie. Zo zijn er in de pars distalis twee typen acidofiele cellen te onderscheiden, waarvan het ene in de voorste en het andere in de achterste helft voorkomt. Op grond daarvan verdeelt men de pars distalis in een rostraal en een proximaal deel. In feite bestaat de hele adeno-hypofyse dus uit een pars distalis rostralis, een pars distalis proximalis en een pars intermedia. Vaak worden die drie delen respectievelijk de pro-, meso- en metaadeno-hypofyse genoemd.

De rostrale pars distalis bestaat grotendeels uit acidofiele cellen met granula, die een grote affiniteit hebben voor erythrosine. Daarnaast komen in dit gedeelte van de hypofyse zwak basofiele cellen voor, gerangschikt in rijen langs de uitlopers van de neurohypofyse. Deze cellen zijn selectief te kleuren met loodhematoxyline. De acidofiele cellen uit de proximale pars distalis zijn meestal in het dorsale gedeelte, niet ver van de neurohypofyse gelegen. Ze hebben relatief grove granula, die vooral met oranje-G goed kleurbaar zijn. In de proximale pars distalis komen twee typen basofiele cellen voor, die moeilijk van elkaar zijn te onderscheiden. Het ene is vaak wat kleiner en hoekiger van vorm dan het andere. De grotere en meer afgeronde basofiele cellen bevatten bovendien vaak relatief grote globuli, waarin lytische enzymen zoals zure fosfatase zijn aan te tonen. Soms komen beide typen basofiele cellen verspreid door de proximale pars distalis voor, maar er zijn ook soorten waar de grote, afgeronde cellen geconcentreerd zijn in het ventrale gedeelte van de proximale pars distalis.

Modern histologisch onderzoek van de adeno-hypofyse is vrijwel nooit uitsluitend gericht op de morfologische kenmerken, maar verbindt de vorm met de functie van de celtypen. Daarbij gaat men er, op grond van talloze resultaten van experimenteel werk, van uit, dat bij alle vertebraten, dus ook bij de beenvissen, ieder celtype een eigen hormoon produceert. Zonder stil te staan bij de opzet van dat experimentele werk kan gezegd worden, dat de algemene conclusie luidt: in de rostrale pars distalis vormen de acidofiele cellen het hormoon prolactine en de zwak basofiele cellen corticotroop hormoon; in de proximale pars distalis vormen de acidofiele cellen groeihormoon, de kleine, hoekige basofiele thyreotropine en de grote, afgeronde basofiele cellen gonadotroop hormoon; en in de pars intermedia produceren de PAS-negatieve cellen

het melanoforen-stimulerend hormoon. De functie van de PAS-positieve cellen in de pars intermedia is nog onzeker.

Het gonadotrope hormoon (GTH)

Van alle zojuist genoemde functies van de adenohipofyse interesseert ons op dit moment uiteraard het meest de gonadotrope, omdat het daarbij, zoals de naam al zegt, gaat om een gericht zijn op de gonaden. Dat de adenohipofyse van beenvissen een dergelijke functie heeft, blijkt uit de resultaten van door velen uitgevoerd onderzoek, waarbij de hypofyse werd weggenomen of een meer of minder gezuiverd homogenaat van hypofyseweefsel werd toegediend (Pickford & Atz, 1957; Hoar & Randall, 1969; Holmes & Ball, 1974). Zonder hypofyse komt zowel de produktie van gameten als die van geslachtshormonen tot stilstand, en door toedienen van een hypofysehomogenaat wordt de vorming van beide gestimuleerd.

Hierbij doet zich de vraag voor of de vorming van eicellen en spermïen en de produktie van geslachtshormonen ieder door een afzonderlijk GTH gestimuleerd wordt, of beide door één en hetzelfde hormoon. Het is ook denkbaar dat er één GTH is dat de gonaden induceert tot vorming van geslachtshormonen, en dat die op hun beurt aanzetten tot gametogenese. Dit standpunt is o.a. verdedigd door Lofts en medewerkers in 1966 en door Sundararaj & Nayyar in 1967. Ze vonden, dat in respectievelijk gehypofysectomeerde *Fundulus heteroclitus* en meerval-*len (Heteropneustes fossilis)* de spermatogenese hersteld kan worden door testosteron toe te dienen. In overeenstemming hiermede vonden Van den Hurk & Van de Kant (1975), dat in juveniele black mollies (*Mollienisia latipinna*) de vermenigvuldiging van de spermatogoniën en de vorming van de spermatocyten op gang gebracht kan worden met behulp van mannelijke geslachtshormonen.

Een ander argument voor de opvatting dat het bij beenvissen slechts om één GTH zou gaan, is, dat van de twee zoogdiergonadotropinen, te weten het follikel-stimulerend hormoon (FSH) en het luteïnisatiehormoon (LH), alleen het LH een invloed schijnt te hebben op de groei van de gonaden en op de vorming van hormonen en geslachtscellen in testis en ovarium. Het is zelfs zo – en dat is in verband met het uitgangspunt van dit betoog wel belangrijk – dat het vaak lukt om vrouwelijke vissen die in gevangenschap geen rijpe eicellen vormen, daartoe aan te zetten

door ze met het LH-achtige humane choriongonadotropine in te spuiten. Dat is onder meer mogelijk gebleken bij de eerder genoemde harder (*Mugil capito*; Abraham et al., 1967).

Men kan overigens terecht aanvoeren, dat het feit dat slechts één van de twee zoogdiersonadotropinen werkzaam is bij beenvissen, geen bewijs is voor de aanwezigheid van één enkel GTH in de adenohipofyse van deze dieren. Bovendien blijkt, dat bij de goudvis (*Carassius auratus*) ook zoogdier-LH geen effect heeft op de vorming en lozing van spermien, terwijl bij de karper (*Cyprinus carpio*) zoogdiersonadotropinen in het ovarium de activiteit van het enzym adenylcyclase niet kunnen verhogen. Om met enige zekerheid iets te kunnen zeggen over GTH van vissen moet men dan ook met gezuiverde preparaten van vissenhypofyses werken, niet met zoogdiersonadotropinen.

Dat hebben recentelijk Fontaine, Burzawa-Gérard en medewerkers te Parijs (1974) en Donaldson en medewerkers te Vancouver (1972) ingezien, en daarom hebben ze getracht de gonadotropinen te isoleren uit de hypofyses van respectievelijk de karper en de pacifische zalm *Oncorhynchus tshawytscha*. Een methanolextract van hypofyses werd achtereenvolgens onderworpen aan herhaalde ultracentrifugering, gelfiltratie en chromatografie. Zo werd een fractie verkregen die zowel de gametogenese als de productie van geslachtshormonen in de gonaden van vissen bleek te kunnen stimuleren. Let wel: één functie, niet twee; dus, concludeert men, wordt bij beenvissen slechts één GTH in de hypofyse gevormd. Dit hormoon toont een grote specificiteit, want het is totaal onwerkzaam in zoogdieren, en op de activering van het adenylcyclase in het ovarium van goudvissen werkt GTH van de aan de goudvis verwante karper 36 maal zo sterk als dat van de minder verwante zalm en 1000 maal zo sterk als dat van de in systematisch opzicht ver verwijderde steur.

Is de conclusie uit de resultaten van het zojuist genoemde biochemische onderzoek overigens wel terecht? Haider meende in 1975 van niet. Hij slaagde er namelijk in om met behulp van elektroforetische scheidingsmethoden uit een homogenaat van goudvishypofyses twee fracties met gonadotrope werking te isoleren. Voldoende bewijs voor het bestaan van twee verschillende gonadotropinen is dat overigens niet. Het is immers niet onmogelijk, dat hier sprake is van twee brokstukken van hetzelfde molecuul of van twee verschillende moleculen met bijna identieke werking, en, zoals Idler et al. (1975) geopperd hebben, afkomstig van respectievelijk mannelijke en vrouwelijke dieren.

Er moet dus nog heel wat werk verricht worden voordat we op grond van de resultaten van biochemisch onderzoek kunnen zeggen of bij beenvissen één dan wel twee gonadotrope hormonen voorkomen. Maar voor het beantwoorden van die vraag zijn we niet uitsluitend op biochemisch onderzoek aangewezen; morfologisch onderzoek kan ook helpen. Bij de bespreking van de histologische bouw van de adeno-hypofyse is opgemerkt, dat er doorgaans in de proximale pars distalis twee basofiele celtypen voorkomen, en wel kleine hoekige cellen, die thyreotroop hormoon vormen, en grote, meer afgeronde cellen, die GTH produceren. De vraag is nu of het al dan niet mogelijk is die gonadotrope cellen in twee verschillende celtypen te verdelen.

Velen hebben getracht die vraag te beantwoorden. Volstaan moet worden met een paar duidelijke voorbeelden. Matteij vermeldde in 1970, dat bij jonge Mexicaanse grottevisen (*Anoptichthys jordani*) de grote, afgeronde basofiele cellen in de proximale pars distalis tot ontwikkeling komen op het moment dat in de testes de spermatogenese en in de ovaria de dooivorming begint. Bij volwassen wijfjes is het cytoplasma van deze cellen kort voor het afzetten van de eieren gevuld met secretiegranula, en onmiddellijk daarna hebben die granula plaats gemaakt voor grote vacuolaire structuren, die het cytoplasma een schuimig aanzien geven. Lambert & van Oordt (1974) namen bij de zebravis (*Brachydanio rerio*) evenzo een correlatie waar tussen dergelijke basofiele cellen en de processen die zich in het ovarium afspelen. Werd de grootte van de celkernen als parameter voor secretorische activiteit gebruikt, dan bleek die activiteit gelijke tred te houden met de dooivorming van de oöcyten. Voortplantingsgedrag leidde tot een snelle en zeer sterke toename in activiteit, die luttele minuten later gevolgd werd door het afzetten van de eieren. Genoemde auteurs concluderen uit hun resultaten dat er niet meer dan één type gonadotrope cellen in de door hen onderzochte vissoorten is waar te nemen.

Andere auteurs menen echter twee typen te kunnen onderscheiden. Tot hen behoort Reinboth die in 1974 bij de zonnebaars (*Lepomis cyanellus*) weliswaar maar één type afgeronde basofiele cellen vindt, maar meent dat daarvan degene die in het ventrale deel van de proximale pars distalis gelegen zijn, het hormoon vormen voor het op gang brengen van de gametogenese, en de overige het hormoon dat de gonaden aanzet tot de vorming van geslachtshormonen. Olivereau (1976) vindt evenzo, en wel bij de paling (*Anguilla anguilla*) en de atlantische

zalm (*Salmo salar*) twee celtypen waarvan het ene in activiteit correleert met de vorming van geslachtshormonen, het andere met de gametogenese.

Er is ook elektronenmicroscopisch onderzoek verricht om meer te weten te komen over de gonadotrope cellen in de adeno-hypofyse van beenvissen. Daarvan mag vooral het zorgvuldige, kwantitatieve werk van Kaul & Vollrath (1975a) genoemd worden. In de proximale pars distalis van de goudvis (*Carassius auratus*) vinden de auteurs een celtype met granula van gemiddeld 216 nm en grote globuli van 1 tot 3 μ m in diameter. Dit is het enige celtype, dat voorafgaande aan het afzetten van de eieren een degranulatie en vacuolisatie vertoont, en dat reageert op het toedienen van een stof, die bij zoogdieren de activiteit van gonadotrope cellen doet toenemen. Een dergelijk celtype in de hypofyse van de black molly (*Mollienisia latipinna*) vertoonde in de experimenten van Peute et al. (1976) een verlies aan secretorisch materiaal na behandeling met een mannelijk geslachtshormoon. Andere celtypen reageerden niet op deze behandeling. Er kan dus zowel bij de goudvis als bij de black molly maar één gonadotroop celtype worden aangetoond.

Een eensluidend, definitief antwoord op de vraag of er bij beenvissen twee gonadotrope hormonen in de adeno-hypofyse gevormd worden of slechts één, is dus al met al noch door het biochemische noch door het morfologische onderzoek gegeven. Misschien dat in de toekomst met een combinatie van biochemisch en morfologisch onderzoek het probleem opgelost kan worden. Een dergelijke combinatie is de immuun-histochemische onderzoeksmethode. Toegepast op ons probleem komt die methode hier op neer, dat een coupe van de hypofyse wordt behandeld met een antistof tegen gonadotroop hormoon, waaraan een fluorescerende 'vlag' wordt gekoppeld. De behandeling leidt tot een immunologische reactie in de gonadotrope cellen, die vervolgens met behulp van een fluorescentiemicroscoop kunnen worden geïdentificeerd. Deze methode is al een aantal malen door verschillende auteurs toegepast, o.a. op hypofysemateriaal van de pacifische zalm (*Oncorhynchus nerka*), van de karper (Billard et al., 1971), van de goudvis en de stekelbaars (*Gasterosteus aculeatus*); en van de black molly, de zwaarddrager (*Xiphophorus helleri*) en de gup (*Poecilia reticulata*; Goos et al., 1975). Bij de pacifistische zalm ging men bij het onderzoek uit van anti-schape-LH, bij de overige vissen van anti-karpergonadotropine. Het zal geen verwondering wekken, dat in de betreffende publikaties slechts sprake is van

één type gonadotrope cellen. Een mogelijk tweede type zal met immunohistochemische methoden pas geïdentificeerd kunnen worden als beschikt kan worden over een gezuiverd preparaat van het tweede gonadotrope hormoon; als dat al bij beenvissen voorkomt tenminste.

We behoeven gelukkig niet te wachten met het bestuderen van andere aspecten van de endocriene regulatie van de voortplanting op het beantwoorden van de vraag naar het aantal gonadotrope hormonen. Een van die andere aspecten is de centrale regulatie van de gonadotrope activiteit van de hypofyse.

Het hypothalamus-neurohypofyse-systeem

De aanmaak en afgifte van hormonen door de adenohipofyse zijn geen continue processen, maar zijn onderhevig aan aanzienlijke schommelingen. Het zijn in feite zulke schommelingen in produktie en secretie van gonadotroop hormoon die voor een zeer belangrijk deel het cyclisch verloop van de voortplantingsactiviteit bepalen. Ze komen tot stand onder invloed van inwendige en uitwendige factoren, die de gonadotrope cellen in de adenohipofyse kunnen bereiken langs nerveuze en langs humorale weg; dat wil zeggen via de zenuwbanen, afkomstig uit de hypothalamus, die in de neurohypofyse eindigen en via de in de neurohypofyse aanwezige bloedvaten (Ball et al., 1965; Oliverau, 1971).

Dat dit zo is, blijkt uit het feit, dat na heterotopie transplantatie van de hypofyse verschillende celtypen, waaronder de gonadotrope, sterk achteruitgaan, en de activiteit van testis en ovarium daalt tot het niveau dat ook na wegnemen van de hypofyse bereikt wordt.

Voor de doorbloeding van de hypofyse wordt bloed vanuit de arteria carotis interna aangevoerd door de arteria hypophyseus (figuur 2). Die vertakt zich tot de zogenaamde primaire longitudinale plexus, gelegen in het grensgebied tussen de neuro- en de adenohipofyse. Vanuit de plexus lopen capillairen naar de periferie van de adenohipofyse, waar ze in een net van venolen uitmonden. Deze venolen komen samen in de gepaarde vena hypophyseus en die eindigen in de eveneens gepaarde vena cardinalis anterior (vergelijk Follenius, 1965).

De capillairen in de adenohipofyse grenzen niet onmiddellijk aan de kliercellen, maar verlopen in een fijn netwerk van zogenaamde intervasculaire kanalen. De wand van die kanalen wordt gevormd door een basaalmembraan van 30 à 40 nm dik, en in de kanalen bevinden zich

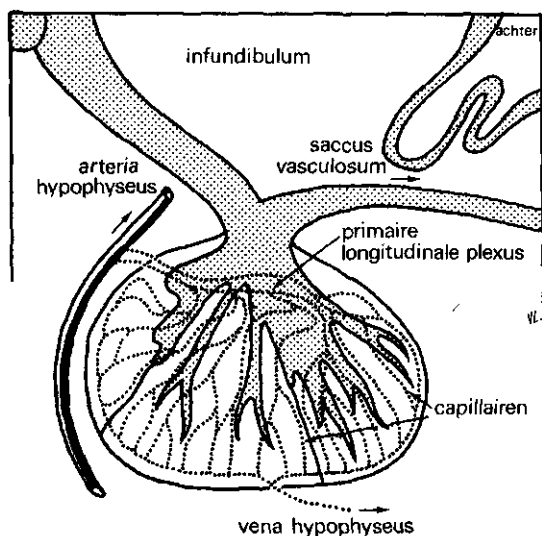


Fig. 2. Schematische overlangse doorsnede door de hypofyse van een beenvís, waarin de doorbloeding van dit orgaan is aangegeven.

een intervasculaire vloeistof, collagene vezels en fibroblasten. Transport van stoffen uit de capillairen moet dus verlopen via de intervasculaire vloeistof en de basaalmembraan.

De zenuwbundels die vanuit de neurohypofyse de adenohypofyse binnendringen verlopen in de intervasculaire ruimte, maar zijn van deze ruimte gescheiden door een basaalmembraan (figuur 3). Ze bevatten neurosecretorische zenuwvezels, die naargelang de grootte van de secretiegranula die er in voorkomen, in verschillende typen verdeeld kunnen worden. Doorgaans onderscheidt men, in navolging van Knowles & Vollrath, twee groepen, namelijk de zogenaamde A-vezels met granula van meer dan 100 nm in diameter, en zogenaamde B-vezels met granula kleiner dan 100 nm in diameter. De meeste van die vezels eindigen op de basaalmembraan, die de zenuwbundel van de perivasculaire ruimte scheidt. Hun secretieprodukten moeten dus via die basaalmembraan, de perivasculaire ruimte en de basaalmembraan tussen die ruimte en de klierzellen, de hormoonproducerende cellen in de adenohypofyse bereiken. Soms is de weg iets korter, namelijk als de basaalmembraan die de adenohypofyse omgeeft en die welke de zenuwbundels begrenst,

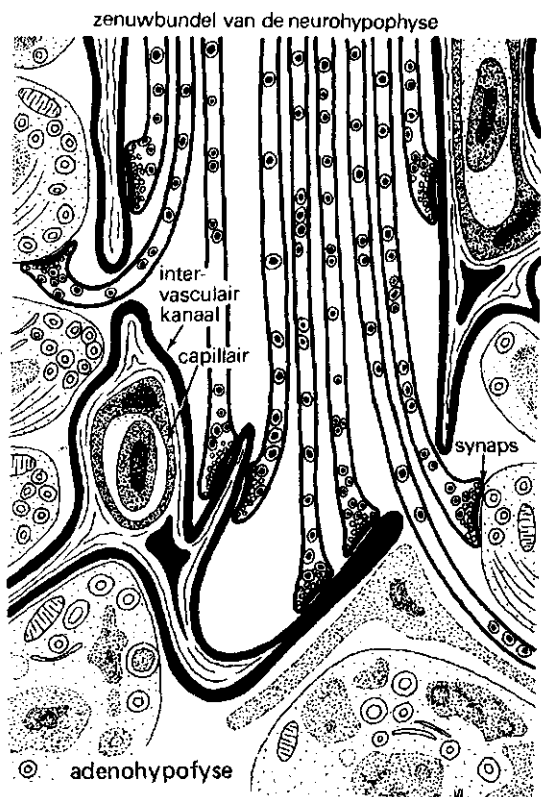


Fig. 3. Schematische weergave van de innervatie van de adenohypofyse van beenvissen door neurosecretorische neuronen.

precies tegen elkaar aan liggen. Er is dan geen perivasculaire ruimte te passeren. Daarnaast blijkt telkens weer, dat er zenuwvezels zijn die door de dubbele basaalmembraan heen dringen, en in de intercellulaire ruimte van de adenohypofyse gaan verlopen. Vaak maken deze vezels synaptisch contact met de klierzellen. Zo worden met name de gonadotrope cellen direct geïnnerveerd, zowel door A- als door B-vezels bij het zeepaardje (*Hippocampus kuda*), bij *Oryzias latipes*, bij de goudvis (Kaul & Vollrath, 1975b) en bij de black molly (Peute et al., 1976). Bij *Gillichthys mirabilis* en *Tilapia mossambica* innervieren alleen B-vezels de hormoonproducerende cellen in de proximale pars distalis, en bij de

paling, de zeelt (*Tinca tinca*), de blankvoorn (*Leuciscus rutilus*) en de forel (*Salmo gairdneri*; Peute et al., 1976) zijn geen synapsen van neurosecretorische vezels op de gonadotrope cellen gevonden.

Men heeft zich uiteraard afgevraagd waar die zenuwvezels in de neurohypofyse vandaan komen. Omdat het om neurosecretorische vezels gaat, is het antwoord in eerste instantie eenvoudig, namelijk: van neurosecretorische centra in de hypothalamus (figuur 4). Vergelijken we de grootte van de granula in de vezels met die in de centra, dan komen vooral de gepaarde nucleus preopticus en de eveneens gepaarde nucleus lateralis tuberis in aanmerking. Daarvan kan de eerste lichtmicroscopische

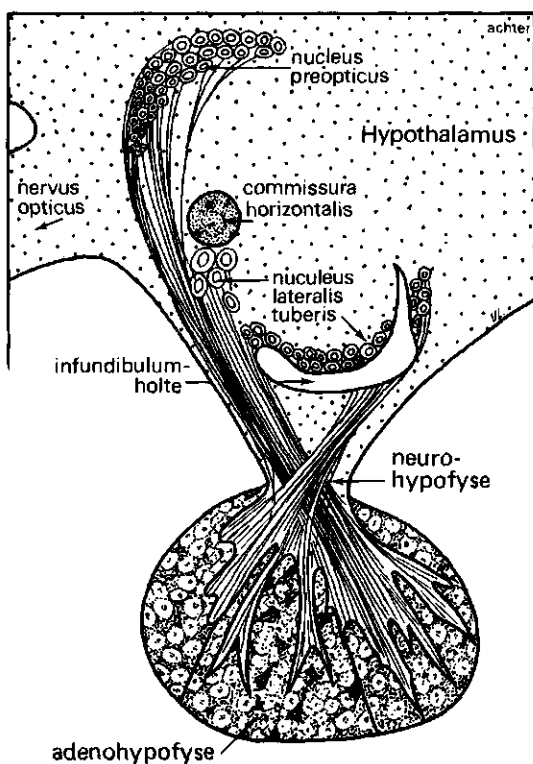


Fig. 4. Schematische parasagittale doorsnede door een deel van de hersenen en door de hypofyse van een beenvis, waarin aangegeven neurosecretorische kernen en banen van deze kernen naar de neurohypofyse.

pisch goed zichtbaar gemaakt worden door het neurosecreet te kleuren met aldehydfuchsiene of Victoria blauw of met het fluorescerende pseudocyanine (Sterba, 1967). Bovendien bevatten de neuronen van de nucleus preopticus zeer grote secretiegranula (A-vezels); een voor elektronenmicroscopisch onderzoek belangrijk gegeven. Uit de vele beschrijvingen blijkt, dat de nucleus preopticus gelegen is voorin de hypothalamus, ongeveer ter hoogte van het chiasma opticum. De kern heeft de vorm van een Australische boemerang met een verticaal, ventraal gericht, en een horizontaal, achterwaarts gericht deel. Vanuit de kern gaan banen naar de neurohypofyse, waar ze vrijwel allemaal eindigen in het achterste gedeelte, dat voornamelijk door cellen van de pars intermedia wordt omgeven. Dat laatste maakt, dat een invloed van de nucleus preopticus op de gonadotrope cellen in de pars distalis niet voor de hand ligt.

De nucleus lateralis tuberculi ligt meer caudaal in de hypothalamus. De kern bestaat uit drie of vier delen: een pars rostralis onder de kruisende vezelbundels van de commissura horizontalis, daarachter, tegen de ventrikelwand, een pars medialis, en parallel aan de pars medialis, vlak tegen de buitenwand van de hypothalamus, een pars lateralis. Pars medialis en pars lateralis zijn vaak verbonden door een pars ventrolateralis. Bij de meeste beenvissen is in de cellen van de nucleus lateralis tuberculi met in de histologie gebruikelijke technieken geen neurosecreet zichtbaar te maken. Niettemin zijn er vele beschrijvingen van deze kern bij verschillende beenvissen. Tot de moderne studies over dit onderwerp behoren die van Samuelsson et al. (1968) en die van Ekengren (1975) over de situatie bij de blankvoorn (*Leuciscus rutilus*), van Zambrano (1970) over de kern bij *Gillichthys mirabilis*, van Peter (1970; Peter & Nagahama, 1976), die de nucleus lateralis tuberculi van de goudvis (*Carassius auratus*) beschrijft, en van Terlouw (1976, ongepubliceerd), handelend over de hypothalamuskernen van de forel (*Salmo gairdneri*). Uit deze en andere publikaties blijkt, dat de nucleus lateralis tuberculi grote, soortspecifieke verschillen kan vertonen. In het kader van dit betoog kan op deze verschillen niet worden ingegaan, en moet volstaan worden met de opmerking, dat meestal de pars rostralis uit enkele zeer grote perikarya bestaat, en dat ófwel in de pars medialis of in de pars lateralis vele grote perikarya voorkomen. In die cellen zijn met behulp van het elektronenmicroscop secretiegranula waar te nemen. Meten van deze granula heeft aan het licht gebracht, dat in de meeste neuronen

van de nucleus lateralis tuberis de granula een diameter hebben beneden de 100 nm. Dergelijke vezels zijn dus in de nomenclatuur van Knowles en Vollrath B-vezels. Er komen in de nucleus lateralis tuberis echter ook A-vezels voor met granula groter dan 100 nm in diameter.

Voor zover het om een directe innervatie van gonadotrope cellen door A- en B-vezels gaat, is het erg waarschijnlijk, dat die afkomstig zijn van de nucleus lateralis tuberis. Maar, welk deel van deze kern het 'gonadotropin releasing hormone' (GRH) – dat is de stof die de adeno-hypofyse aanzet tot produktie en afgifte van gonadotropine – vormt, is niet gemakkelijk te zeggen. Peter (1970) heeft getracht er achter te komen door op verschillende plaatsen fijne lesies aan te brengen in de hypothalamus van de goudvis. Bij deze vis is de pars medialis van de nucleus lateralis tuberis goed ontwikkeld. Alleen uitschakelen van het middenstuk van deze pars medialis bleek te leiden tot verminderde gonadotrope activiteit van de hypofyse.

Dat wil overigens niet zeggen, dat bij alle beenvissen de gonadotropinesecretie alleen vanuit het middenstuk van de nucleus lateralis tuberis pars medialis wordt gereguleerd. Afgezien van de mogelijkheid, dat het bij andere soorten dan de goudvis best eens om een ander deel van de nucleus lateralis tuberis zou kunnen gaan, blijft het denkbaar dat ook andere centra dan deze kern betrokken zijn bij de regulatie van de gonadotropineafgifte. Dat zulks tot de reële mogelijkheden behoort, blijkt uit de recente resultaten van Goos & Murathanoglü (1977). Zij hebben zich van immuunhistochemische methoden bediend bij het opsporen van de plaats waar in de hersenen van de forel GRH gevormd wordt. Bij gebrek aan het zuivere forelle-GRH hebben ze daarbij een synthetisch produkt, identiek met het zoogdieren-LH releasing hormone, gebruikt. Zo konden ze neurosecretorische cellen zichtbaar maken, waarvan de perikarya gelegen zijn in het telencephalon, en de sterk vertakte axonen in de richting van de neurohypofyse lopen.

Dit zijn uiteraard niet meer dan eerste aanwijzingen en er zal nog heel veel moeten gebeuren voordat we precies weten van waar uit en op welke wijze de centrale regulatie plaats heeft van de produktie en secretie van gonadotroop hormoon door de adeno-hypofyse. Ondertussen interesseren ons ook de functies van het gonadotroop hormoon. We hebben al gezien dat het daarbij gaat om het stimuleren van de aanmaak en de afgifte zowel van geslachtshormonen als van eicellen en spermïën. Over deze processen is al zoveel geschreven, dat een redelijke samenvat-

ting van de publikaties binnen dit hoofdstuk uitgesloten is (Pickford & Atz, 1957; Barr, 1968; Hoar & Randall, 1969; Van den Hurk, 1975). Beperking is nog meer dan bij de reeds besproken facetten van ons onderwerp geboden; een beperking die neerkomt op het nemen van een paar subjectief gekozen voorbeelden. Die voorbeelden zijn alle ontleend aan werk over het ovarium van beenvissen.

Het ovarium (figuur 5)

Het ovarium van beenvissen is een doorgaans gepaard, zakvormig orgaan met een relatief dunne wand en een grote centrale holte, die uitmondt in de eileider. In de wand ontwikkelen zich grote aantallen eicellen. Dat wil zeggen, dat kleine oögoniën zich door mitose vermenigvuldigen en uitgroeien tot oöcyten. De jonge oöcyten worden omgeven door een laag min of meer kubische follikelcellen, de granulosa, en die op hun beurt door bindweefselachtige thecacellen. Een oöcyt omgeven door granulosa en theca noemt men een follikel. De follikels maken een groeifase door, waarbij vooral de hoeveelheid cytoplasma van de oöcyt sterk toeneemt. Na zekere tijd heeft er in het cytoplasma dooieropslag plaats; aanvankelijk als gevolg van dooievorming door de oöcyt zelf (endogene vitellogenese), daarna door aanvoer van dooier vanuit de lever (exogene vitellogenese). In een rijpe follikel is het cytoplasma van de oöcyt goeddeels opgevuld met grote dooiergranula. Lang niet alle follikels bereiken dat stadium. Vele gaan gedurende de groeifase of de vitellogenese te gronde. Daarbij wordt de gedegenerende oöcyt geheel geresorbeerd door de hypertrophiërende follikelcellen.

De follikels, die wel volledig uitgroeien, maken al of niet na een rustfase twee processen door, namelijk de rijping van de oöcyt en de ovulatie. Bij de rijping van de oöcyt gaat het om het verdwijnen van de kernmembranen en de daarop volgende meiotische deling. Ovulatie is het breken van de granulosa, de theca en de ovariumwand, en het vrijkomen van de oöcyt uit het ovarium. Na de ovulatie worden de eieren gelegd (ovipositie) en in het water bevrucht. Niet alle soorten beenvissen leggen onbevruchte eieren. Naast ovipare komen levendbarende soorten voor, waarbij inwendige bevruchting optreedt, en de embryonen zich in de ovariumwand of in het ovariumlumen ontwikkelen.

Nadat de follikel gebarsten en de rijpe eicel uitgestoten is, blijven de granulosa en theca nog korte tijd intact. Ze vormen een onregelmatig

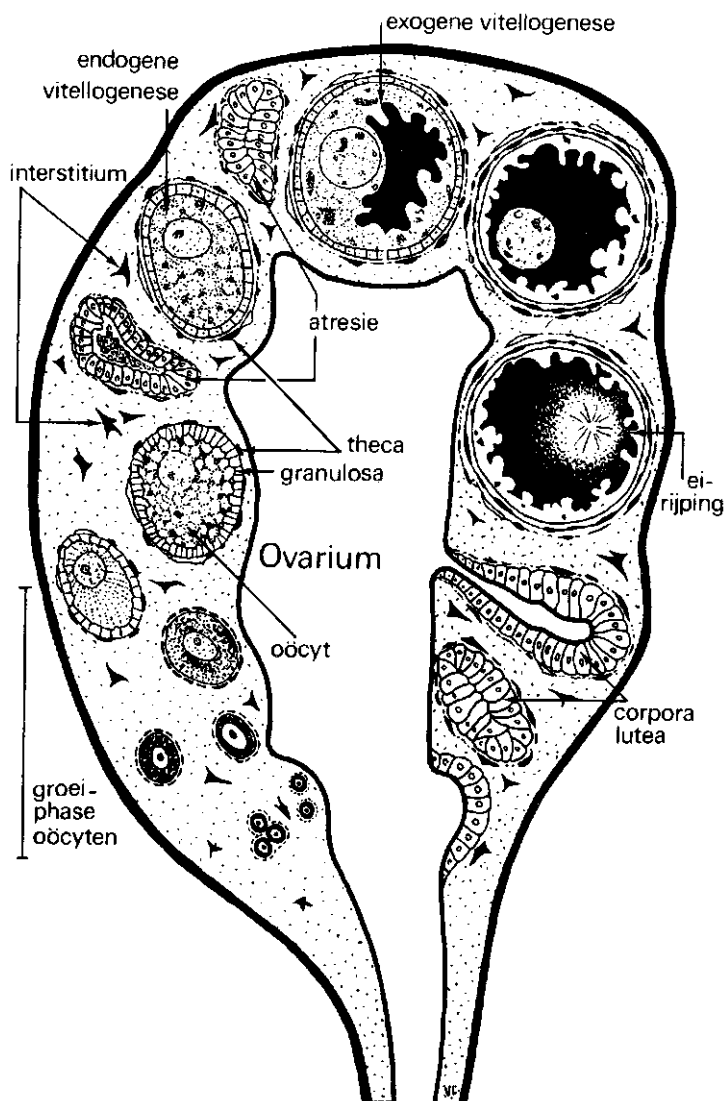


Fig. 5. Schematische overlangse doorsnede door het ovarium van een ovipare beenvis.

geplooid structuur, vooral bestaande uit vergrote follikelcellen. In analogie met de situatie bij de zoogdieren wordt zo'n follikelrest een corpus luteum genoemd.

Van alle ontwikkelingsfasen die de follikels doorlopen: groei, vitellogenese, rijping van de oöcyt, ovulatie, ovipositie en corpus luteumvorming, blijkt alleen de eerste, de primaire groei van de oöcyt, te kunnen optreden in afwezigheid van de hypofyse. Voor de andere is dus een gonadotroop hormoon nodig. Een aantal argumenten voor deze stelling is al genoemd bij het bespreken van de vraag of bij beenvissen de adeno-hypofyse één of twee gonadotrope hormonen vormt. Daaraan kan worden toegevoegd, dat bij de karper, de pacifische zalm (*Oncorhynchus tshawytscha*) en de forel de gonadotropineproductie het hoogst is tijdens de voortplantingsperiode, dus tijdens de ovulatie en de ovipositie. Voorts kon men bij de meerval (*Heteropneustes fossilis*) na wegnemen van de hypofyse vitellogenese en ovulatie opwekken door zalmegonadotropine in te spuiten. Bovendien kon Van Ree (1976) in gekweekte ovaria van de zebravis vitellogenese handhaven en follikelatresie voorkomen door aan het kweekmedium karpergonadotropine toe te voegen. Tenslotte kon Jalabert (1976) bij de forel eirijping en ovulatie induceren met behulp van zalme- en forelgonadotropine.

Verwijdering van de granulosa laag zowel als eiwitsyntheseremmers verhinderen deze werking van vissegonadotropine (Jalabert, 1976). Dat wijst er op, dat het gonadotroop hormoon in eerste instantie eiwitsynthese bevordert in de follikelcellen. Heel waarschijnlijk gaat het daarbij om enzymen die verantwoordelijk zijn voor de aanmaak van een steroïdhormoon, verwant aan het vooral uit onderzoek van zoogdieren en mens bekende zwangerschapshormoon, progesteron. Dit hormoon, het 17α -hydroxy- 20β -dihydroprogesteron is namelijk niet alleen uiterst effectief in het opwekken van eirijping bij de forel, de snoek (*Esox lucius*) en de goudvis, maar komt ook in verhoogde concentratie voor in het plasma tijdens de voortplantingsperiode. Dat laatste is althans voor de pacifische zalm *Oncorhynchus nerka* aangetoond.

Bij de meerval (*Heteropneustes fossilis*, Sundararaj & Goswani, 1971) en de zebravis (*Brachydanio rerio*; Van Ree, 1976) is het vooral het desoxycorticosteron dat de eirijping bevordert. Dit hormoon is bij de meerval ook uiterst effectief in het bevorderen van de ovulatie en bij de zebravis in het voorkomen van atresie van dooierrijke oöcyten onder in vitro omstandigheden (Van Ree, 1976). Desoxycorticosteron is een be-

kend bijnierschorshormoon, en het is daarom niet onmogelijk, dat de bijnier van belang is voor de processen die zich in de ovariumfollikels afspelen. Het is echter ook denkbaar, dat dit hormoon door het visseovarium zelf gevormd kan worden, zoals door Colombo (1973) gesuggereerd is. Lambert & van Oordt (1974) hebben dat overigens voor de zebravis niet kunnen bevestigen.

Een derde steroïdhormoon, dat in verband met de ontwikkeling van de oöcyten genoemd moet worden, is het oestradiol-17 β , een van de meest bekende vrouwelijke geslachtshormonen. Dit hormoon blijkt bij een aantal soorten, waaronder de kabeljauw (*Gadus morhua*; Plack et al., 1968, 1971), de vorming van dooierewitten in de lever te bevorderen. Of dat een algemene regel is, is nog de vraag, want hoewel bij heel wat soorten aangetoond is dat het ovarium kleine hoeveelheden oestradiol-17 β kan produceren, is het Eckstein (1975) niet gelukt om in ovariummateriaal van in zoetwater opgegroeide harders dit hormoon te identificeren. Wel blijken deze ovaria relatief grote hoeveelheden 11-ketotestosteron te produceren, een typisch mannelijk geslachtshormoon van beenvissen. Dat zou wel eens kunnen samenhangen met het feit, dat de oöcyten in zoetwaterharders nooit helemaal tot ontwikkeling komen. De dieren hebben — zoals in de inleiding opgemerkt — een zeewatermilieu nodig voor het produceren van rijpe eieren (Abraham et al., 1966).

Met het bovenstaande zijn we midden in de vraag naar de aard en de wijze van synthese van de steroïden in de ovaria van beenvissen terechtgekomen. Door verschillende auteurs is er op gewezen, dat in de ovaria van vissen bekende vrouwelijke geslachtshormonen als oestradiol-17 β , oestron en progesteron gevormd worden (o.a. Lambert & Pot, 1975). Daarbij blijkt het, net als bij andere vertebraten, te gaan om synthese via cholesterol en pregnenolon. Progesteron, maar meer nog 17 α -hydroxypregnenolon en dehydro-epiandrosteron dienen bij de vorming van oestrogenen als intermediair. Het zijn overigens niet alleen de genoemde, overbekende vrouwelijke geslachtshormonen, die in het ovarium van beenvissen gevormd kunnen worden. Integendeel, wordt een ovariumhomogenaat geïncubeerd met radioactief gelabeld pregnenolon, progesteron of dehydro-epiandrosteron, dan blijken er naast sporen van oestrogenen vooral androgenen, zoals androsteendiol, androsteendion en testosteron gevormd te worden, alsmede nog heel wat niet nader geïdentificeerde steroïden (zie o.a. Reinboth, 1972; Lambert et al., 1974, 1975).

Over de fysiologische betekenis van al deze ovariumsteroiden is nog bitter weinig bekend. Wel weten we waar ze in het ovarium gevormd worden. Het is namelijk mogelijk met enzymcytochemische methoden aan te tonen in welke cellen en weefsels steroidsynthese kan plaats hebben. Daarvoor blijkt dan vooral de granulosa van vitellogene oöcyten in aanmerking te komen (o.a. bij de gup; Lambert, 1969). In het ovarium van sommige soorten reageren ook interstitiële cellen, vaak tussen de thecacellen gelegen, positief (o.a. bij de zwaarddrager; Lambert & van Oordt, 1974), terwijl bij andere niet alleen de granulosa en de interstitiële cellen, maar ook de corpora lutea enzymen kunnen bevatten, die voor de steroidsynthese essentieel zijn (o.a. de zebravis; Lambert & van Oordt, 1974).

Zojuist is opgemerkt, dat over de fysiologische betekenis van de ovariumsteroiden bij beenvissen nog weinig bekend is. Dat is waar voor zover het nader aangeduide steroiden betreft. Over de functie van de ovariumhormonen gezamenlijk is echter al heel wat gewerkt en geschreven. Niet alleen blijken deze hormonen de bovengenoemde invloed te hebben op de ontwikkeling van de follikels en de vorming van rijpe eieren; ze zijn ook onmisbaar bij de ontplooiing en handhaving van vrouwelijke secundaire geslachtskenmerken en voortplantingsgedrag, al is voor dit laatste naar het schijnt vooral het gonadotrope hormoon van belang (Liley, 1969).

Trouwens, de bijna algemene regel in de endocrinologie, dat een proces door meer dan één hormoon gereguleerd wordt, gaat op voor ieder onderdeel van de regulatie van de voortplanting bij beenvissen. Zo is gewezen (Watts et al., 1975) op een mogelijke invloed van calcitonine, het hormoon uit de ultimobranchiale lichaampjes, op de voortplanting bij de pacifische zalm *Oncorhynchus nerka*. Andere auteurs hebben argumenten aangevoerd, die er voor pleiten dat het epifysehormoon melatonine de ontwikkeling van de gonaden remt bij *Oryzias latipes* en *Fundulus similis*. Sage (1973) heeft de aandacht gevestigd op het belang van de schildklierhormonen, met name voor de secretie van GTH door de hypofyse. Stacey & Pandey (1975) hebben aangetoond dat prostaglandinen een rol spelen bij het tot stand komen van ovulatie bij de goudvis. Tenslotte heeft Jalabert (1976) argumenten aangevoerd, die er voor pleiten dat bij de forel adrenaline in de follikelcellen het prostaglandine F2 α doet ontstaan, dat op zijn beurt gladde spiervezels die rond de rijpe follikel liggen zou doen contraheren, en zo zou zorgen voor het vrijkomen van de eicellen uit de ovariumwand.

Slotopmerkingen

Daarmee is over de regulatie van de voortplanting bij beenvissen nog lang niet alles gezegd. Met name de betekenis van geurstoffen, feromonen genaamd, en van ecologische factoren zoals de aard van de bodem, de begroeiing, de hoeveelheid en de aard van het voedsel, de temperatuur en de daglengte zijn onbesproken gebleven. Over een aantal van deze factoren, vooral in verband met hun invloed op het in oorsprong genetisch bepaalde voortplantingsrythme en op het voortplantingsgedrag, zal in het hoofdstuk van Baggerman worden geschreven.

Uit het voorgaande moge u reeds duidelijk zijn, dat de regulatie van de voortplanting bij beenvissen een uiterst complex gebeuren is, waard nader te worden onderzocht, en dat uiteraard met het puur wetenschappelijk oogmerk van de zich verbazende en vragende mens. Maar ook, en dat niet in de laatste plaats omwille van de belangrijke mogelijkheid om door het zelf kweken van vis, de natuur te sparen en hongerigen van eiwitrijk voedsel te voorzien. Pure wetenschap en techniek horen daarbij bij elkaar. Los van elkaar kan het biologisch onderzoek naar de regulatie van de voortplanting van beenvissen vervallen tot een etaleren van interessante zeldzaamheden, en dreigt de techniek van de aquacultuur te blijven steken in de buitenkant van de problemen. Dan is van toepassing de 'sinnepop' van Roemer Visscher: 'Het is te verwonderen, datter treffelijcke lieden zijn, die groot gelt besteedden aan Kinckhorens en Mosselschelpen daar niet fraeys aan is als de seldsaemheidt. ... Ey, Heeren Apen, Ghy verstaet het binnen spel niet.' Ook hier geldt, dat door samenwerking iets goeds kan worden bereikt.

Woord van dank

Deze voor publikatie uitgewerkte voordracht is een resultante van de samenwerking en gedachtenwisseling binnen het team van vergelijkend endocrinologen, verbonden aan de Vakgroep Algemene Dierkunde van de Rijksuniversiteit te Utrecht en werkzaam aan een project over de endocriene regulatie van de voortplanting bij beenvissen. Voor hun stimulerende invloed, hun leerzame kritiek en daadwerkelijke hulp is de auteur zijn collegae dr. H.J.Th. Goos, dr. R. van den Hurk, dr. J.G.D. Lambert, dr. J. Peute, dr. Goverdien E. van Ree en dr. M. Terlouw veel dank verschuldigd.

Het endocriene systeem en aanpassingen van stekelbaarzen aan hun milieu

B. Baggerman

Inleiding

De aanpassingen waarover in dit hoofdstuk gesproken wordt, hangen samen met trek en voortplanting. Trek is een verschijnsel dat bij veel diersoorten voorkomt en gedefinieerd wordt als periodiek weerkerende, doelgerichte reizen, tussen (meestal) twee meer of minder ver uiteengelegen gebieden. Die gebieden worden in verschillende seizoenen bewoond en de trek naar en van deze gebieden hangt nauw samen met onder meer het optreden van periodiek weerkerende veranderingen in het milieu, zoals veranderingen in de weersgesteldheid en in de hoeveelheid voedsel.

Vaak hangt trek samen met een ander, eveneens periodiek optredend gedrag, namelijk de seizoengebonden voortplanting. Deze begint altijd op een zodanig tijdstip, dat de jongen in de gunstigste periode van het jaar ter wereld komen, speciaal met betrekking tot de hoeveelheid beschikbaar voedsel. Daardoor kunnen ze zo voorspoedig mogelijk opgroeien, waardoor ze de beste kansen hebben om het daarop volgende ongunstige jaargetijde te overleven.

Ofschoon heel veel onderzoek is en wordt gedaan, zowel over trek als over seizoengebonden voortplanting, zijn veel vragen die hieromtrent gesteld kunnen worden nog niet, of slechts ten dele te beantwoorden. Wel is het duidelijk dat het endocriene systeem zowel bij de regulatie van de trek, als bij die van de seizoengebonden voortplanting nauw betrokken is. Bovendien speelt dit systeem een zeer belangrijke rol bij aanpassingen van dieren aan hun milieu.

Trek en seizoengebonden voortplanting zijn echter zulke complexe verschijnselen, dat alle aspecten ervan onmogelijk in één voordracht behandeld kunnen worden. Daarom zullen slechts twee ervan wat uitvoeriger aan de orde komen. Het eerste aspect betreft de rol die hor-

monen spelen bij de aanpassing van trekkende vissen aan zoet water, respectievelijk zeewater, waarin zij als gevolg van hun trek terecht komen. Het tweede betreft de wijze waarop het endocriene voortplantingssysteem in staat is elk jaar op de juiste tijd actief te worden. Beide onderwerpen wil ik bespreken aan de hand van de resultaten van onderzoek dat door leden van onze werkgroep 'Gedragsendocrinologie' in Groningen wordt uitgevoerd aan de driedoornige stekelbaars (*Gasterosteus aculeatus*). De lezer die wat meer wil weten over trek, trekwegen, oriëntatie, navigatie en voortplantingsseizoenen in het algemeen, wordt verwezen naar het rijk geïllustreerde boek van Jarmán (1972) en naar Grzimek (1976).

Aanpassingen aan het milieu als gevolg van trek

Levenswijze van de stekelbaars Driedoornige stekelbaarzen, of 'rood-kaakjes' (*Gasterosteus aculeatus*) komen in grote aantallen in onze kustgebieden voor. Indien ze niet door barrières worden tegengehouden brengen ze de nazomer, herfst en winter door in zee of in brak water en beginnen ze tegen eind januari het zoete water binnen te trekken. Het is nog niet duidelijk welke de voordelen zijn voor de stekelbaarzen die in onze kuststreken leven, om de winter in de zee door te brengen. Dit temeer niet, omdat er in het binnenland populaties voorkomen die nooit naar zee trekken. De dieren planten zich voort tussen ongeveer half april en half juli, waarna de jongen en overlevende oude dieren van de kustpopulaties (weer) naar zee trekken. In het voorjaar bakent het mannetje eerst een territorium af, dat hij vooral verdedigt tegen soortgenoten. In dat territorium wordt een nest gebouwd, waartoe eerst een kuiltje wordt gegraven. Daarin worden kleine stukjes plantenmateriaal gebracht, die aan elkaar gelijmd worden m.b.v. slijm, dat in de nieren wordt gevormd. Komt er een kuitrijp vrouwtje in de buurt, dan gaat het mannetje voor haar baltsen en haar naar het nest leiden. Wanneer het vrouwtje in het nest gekropen is, stimuleert het mannetje haar om de eieren af te zetten, waarna ze het nest verlaat. Direct hierna kruipt het mannetje achter haar aan door het nest om de eieren te bevruchten. Het vrouwtje wordt daarna door het mannetje weggejaagd en verlaat het nest voorgoed. Het mannetje daarentegen blijft bij het nest en gaat voor de eieren en de jongen zorgen. Daarbij 'waaiert' hij regelmatig met zijn borstvinnen een stroom zuurstofrijk water door het nest. Wanneer het

legsel na een dag of 7 uitgekomen is en de jongen uit de buurt van het nest zijn verdwenen, kan het mannetje weer een nieuw nest bouwen en een nieuw legsel grootbrengen. Veel meer bijzonderheden over stekelbaarzen zijn te vinden in het onlangs verschenen boek van Wootton (1976).

Veroorzaking van de trek en wijze van oriëntering Over de veroorzaking van trek is nog maar weinig met zekerheid te zeggen. Wel is iets meer bekend geworden over de factoren die betrokken zijn bij het tot stand komen van trekdispositie. Hieronder wordt een speciale fysiologische conditie verstaan, die noodzakelijk is wil een dier ook werkelijk gaan trekken. Bij vogels wordt de aanleg van grote hoeveelheden vet (tot 50% of meer van het lichaamsgewicht) gezien als een uiting van trekdispositie en gebleken is dat de hormonen prolactine en cortisol hierbij betrokken zijn. Stekelbaarzen vertonen in het vroege voorjaar een voorkeur voor zoet water, terwijl deze in de herfst omslaat in een voorkeur voor zout water. Deze tweemaal per jaar optredende verandering in saliniteitsvoorkeur wordt ook gezien als een uiting van trekdispositie. Onderzocht werd welke invloed de daglengte, het schildklierhormoon en het gonadenhormoon hebben op deze saliniteitsvoorkeur. Gevonden werd dat (a) een lange daglengte en (b) een hoge spiegel van schildklierhormoon (thyroxine), zowel bij intacte dieren als bij castraten een voorkeur voor zoet water veroorzaakten. Omgekeerd bleven dieren met een voorkeur voor zout water deze voorkeur zeer lange tijd behouden, wanneer ze vanaf de herfst continu aan een korte daglengte werden blootgesteld. Bovendien bleek het toedienen van schildklierremstoffen bij dieren met een voorkeur voor zoet water, een voorkeur voor zout water op te wekken, zowel bij intacte dieren als bij castraten. Deze resultaten leidden tot de hypothese, dat in het voorjaar trekdispositie veroorzaakt wordt door het langer worden van de dagen, hetgeen de schildklier zou aanzetten tot verhoogde secretie van thyroxine; de gonaden zouden hierbij slechts een ondergeschikte rol spelen. Trekdispositie in het najaar zou daarentegen veroorzaakt worden door een verlaagde productie van thyroxine (al of niet o.i.v. het korter worden van de dagen).

Overeenkomstige proeven met jonge pacifische zalmen leidden tot een vergelijkbare hypothese. Bij deze dieren echter bleek dat een lange daglengte, evenals een hoge thyroxine-spiegel, juist een voorkeur voor

zout water veroorzaakten, terwijl een korte daglengte, evenals een lage thyroxine-spiegel, een voorkeur voor zoet water teweegbrachten. Dit verschil met de stekelbaars is echter in overeenstemming met het feit, dat jonge zalmen in het voorjaar juist naar zee trekken. Het is niet mogelijk in dit bestek nader op dit onderzoek in te gaan; de geïnteresseerde lezer wordt verwezen naar een overzichtsartikel van Baggerman (1961) en naar Koch (1968) en Hasler (1971).

Vogels en vissen kunnen zich tijdens de trek oriënteren met behulp van de stand van de zon. Vissen, zoals zalmen vertonen deze wijze van oriëntatie waarschijnlijk tijdens hun leven in de open zeeën. In de kustwateren en kleinere wateren in het binnenland, oriënteren vissen zich echter waarschijnlijk meer m.b.v. geurprikkels. Vooral bij zalmen heeft men gegevens verkregen die wijzen op een welhaast onvoorstelbare gevoeligheid voor geurstoffen, met behulp waarvan de dieren hun geboortevier kunnen terugvinden (Grzimek, 1976; Hasler, 1971).

Hydrominerale aanpassingen en de invloed daarop van prolactine Het bloed van in zoet water levende beenvissen heeft een hogere osmotische waarde dan het milieu en is dus hypertonisch. Als gevolg daarvan moeten deze dieren (a) veel water uitscheiden, (b) geen water drinken en (c) zoveel mogelijk zouten opnemen en zo weinig mogelijk verliezen. Daarentegen is bij de meeste in zee levende beenvissen het bloed hypotonisch t.o.v. het milieu. Deze dieren moeten dus (a) zo min mogelijk water uitscheiden, (b) veel zeewater drinken en (c) het teveel aan binnengekregen zouten weer kwijt zien te raken. Vissen in zoet water moeten dus precies andersom met hun water en zouten omgaan dan vissen in zout water. Opvallend is verder, dat bij de meeste tussen de zee en zoet water heen en weer trekkende vissen de concentratie van zouten in het lichaam van dieren in zeewater, maar betrekkelijk weinig hoger is dan van dieren in zoet water. Dit is des te opmerkelijker, wanneer men bedenkt dat zeewater op enige afstand van de kust al gauw 25-35 gr. NaCl per liter bevat, terwijl er naar verhouding in zoet water nauwelijks enig zout voorkomt. Dergelijke vissen moeten dus niet alleen een groot, maar bovendien ook nog een zeer flexibel osmoregulatorisch vermogen hebben.

De zojuist beschreven verschillen zijn het gevolg van een aantal actieve en/of passieve processen, die zich voornamelijk in de nieren, kieuwen, darmen en mogelijk ook in de urineblaas afspelen; de passieve

uitwisseling van water en ionen door de huid speelt een betrekkelijk ondergeschikte rol. In zeewater treedt osmotisch waterverlies op in de kieuwen, maar dit wordt gecompenseerd door het drinken van zeewater. Het teveel aan binnengekregen zouten moet weer worden uitgescheiden. Dit gebeurt voor wat betreft de bivalente ionen via de darm en de nieren; de monovalente ionen worden actief uitgescheiden door de zogenaamde chloridecellen in de kieuwen. In zoet water komt osmotisch teveel water binnen via de kieuwen, maar dit wordt weggevoerd door uitscheiding van veel (isotonische) urine. Verder gaan er zouten verloren via de kieuwen en darmen en ook in de nieren; dit laatste verlies wordt echter sterk beperkt, doordat veel zouten weer worden geresorbeerd. Compensatie van het ionenverlies wordt bereikt door actieve resorptie van ionen uit het milieu door de kieuwen en door het opnemen van voedsel. Bij veel van deze processen spelen hormonen een essentiële rol. Binnen dit hoofdstuk kan echter alleen wat dieper worden ingegaan op de invloed van het hormoon prolactine op osmoregulatorische processen in de nieren van in zoet water levende stekelbaazen.

Prolactine is een hormoon dat in de hypofyse wordt gevormd en zeer uiteenlopende processen kan beïnvloeden, afhankelijk van de diersoort. Het heeft zijn naam te danken aan zijn stimulerende invloed op de vorming van melk in de melkklieren van zoogdieren. Bij duiven stimuleert het de vorming van de zogenaamde kropmelk, waarmee de ouders de jongen voeren (deze melk bestaat uit afgestoten epitheelcellen). Bij trekvogels is prolactine (samen met corticosteroiden uit de bijnierschors) betrokken bij de aanleg van grote hoeveelheden vet kort voor het begin van de trek. Bij terrestrische salamanders veroorzaakt prolactine de trek naar water (water-drive effect). Bij een aantal beenvissen heeft het hormoon een stimulerende invloed op de slijmvorming in de huid. Zo wordt bij de discusvis die slijmproductie tijdens de broedzorgfase zo groot, dat de jongen dit slijm van de ouders afhappen en er zich gedurende hun eerste levensdagen mee voeden. Verder is ontdekt, dat een aantal vissoorten zonder prolactine niet kan leven in zoet water, terwijl ze dat in zeewater wel kunnen. Dit heeft men kunnen constateren bij dieren waarbij de hypofyse was verwijderd; gaf men aan zulke dieren weer injecties met prolactine, dan bleken zij wel lange tijd in zoet water te kunnen blijven leven. Toen men trachtte de doodsoorzaak te vinden van die prolactineloze vissen, bleek o.m. dat ze vooral

een groot tekort aan Na^+ en Cl^- vertoonden; na injecties met prolactine keerde de hoeveelheid van deze ionen weer tot het normale peil terug. Verder onderzoek wees uit, dat prolactine bij vissen vooral inwerkt op twee plaatsen, namelijk de nieren en de kieuwen; in de volgende paragraaf zullen we speciaal de invloed op de nieren bespreken.

Bouw en functie van de nieren van vissen Evenals bij hogere vertebraten zijn de nieren van vissen opgebouwd uit nefronen. Bij veel beenvissen bestaat een nefron uit een kapsel van Bowman (waarin het ultrafiltraat uit de glomerulus wordt opgevangen), een proximaal en een distaal gedeelte van de tubulus en een verzamelbuisje (dit laatste al of niet van het voorgaande deel gescheiden door een tussensegment). Het verzamelbuisje mondt uit in de ureter. Figuur 1 laat zeer schematisch de bouw zien van een nefron van een beenvis (zonder distale tubulus en tussensegment, zoals bij de stekelbaars het geval is), alsmede de actieve resorptie- en secretie-processen die zich in de verschillende onderdelen ervan afspelen. De werking van de nier is bij beenvissen fysiologisch goed onderzocht. Samenvattend kan men zeggen dat bij vissen in zoet water de hoeveelheid geproduceerde urine veel groter is dan bij dieren in

glomerulus		ZOET WATER	ZEEWATER
	filtratie snelheid	hoog	laag
eerste proximale segment	organische zuren	←	←
	macromoleculen	→	→
	Na ⁺ , Cl ⁻	→	→
	Mg ⁺⁺ , SO ₄ ⁻	→	←
tweede proximale segment	N-katabolieten	←	←
	Na ⁺ , Cl ⁻	→	→
	Mg ⁺⁺ , SO ₄ ⁻	→	←
verzamelbuisje	Na ⁺ , Cl ⁻	→	→
ureter	Na ⁺ , Cl ⁻	→	→
	urine	hypotonisch	isotonisch

Fig. 1. Schema van de voornaamste functies van de epithelia van de verschillende onderdelen van het nefron en de ureter van beenvissen, die zowel in zoet als in zout water kunnen leven. De zwarte pijlen duiden op terugwinning en de witte op secretie. De dikte van de pijlen is een maat voor de intensiteit van de processen. (Naar Wendelaar Bonga, 1973.)

zeewater. Bovendien is de urine van zoetwatervissen hypotoon t.o.v. het bloed, als gevolg van de zeer intensieve terugwinning van monovalente ionen (speciaal Na^+ en Cl^-) in de nieren. In zeewater daarentegen, bevat de urine veel ionen, vooral bivalente (Mg^{2+} en SO_4^{2-}), waardoor deze praktisch isotoon is met het bloed. Bij een aantal vissoorten is verder ook de invloed van prolactine op de fysiologische processen in de nier bestudeerd. Gevonden is o.m. dat bij vissen in zoet water injecties met prolactine een stimulerende werking hebben op (a) de hoeveelheid geproduceerde urine en (b) de terugwinning van zouten. Dit is in overeenstemming met de eerder vermelde positieve invloed van prolactine op de overlevingsduur van hypofysoelose vissen in zoet water.

Structurele verschillen tussen ionentransporterende niercellen van stekelbaarzen in zoet en zout water Wendelaar Bonga veronderstelde dat de fysiologische verschillen tussen vissen die leven in zoet of in zout water zich ook zouden moeten uiten op structureel niveau in de ionentransporterende cellen, die de wand van de nefronen en ureter vormen. Zijn onderzoek, waaraan de nu volgende bijzonderheden werden ontleend, is gepubliceerd tussen 1973 en 1976. Uit de literatuur was reeds bekend, dat bij vertebraten voornoemde cellen in de wand van de nefronen overeenkomstige ultrastructurele kenmerken bezitten als andere ionentransporterende cellen. Deze kenmerken zijn (a) een basaal labrynt, (b) veel mitochondriën in dat labrynt en (c) een relatief grote kern met veel kernporiën. Het basale labrynt wordt gevormd door een systeem van membranen waar doorheen het ionentransport plaatsvindt en gebleken is dat er een positieve correlatie bestaat tussen de uitgebreidheid van dit labrynt en de ionentransporterende activiteit van een cel. Eveneens is bekend dat de bij het ionentransport betrokken enzymen, o.a. de zogenaamde Na^+/K^+ afhankelijke ATPasen en de Mg^{2+} afhankelijke ATPasen, speciaal in het basale gedeelte van de cel aanwezig zijn en men veronderstelt dat ze zich in de membranen van het labrynt bevinden. Deze enzymen breken ATP af en maken zodoende energie vrij voor het ionentransport. Ook hier is een positieve correlatie gevonden tussen de activiteit van deze enzymen en de mate van ionentransport. Het ATP wordt in de mitochondriën gevormd en daardoor zijn deze organellen eveneens betrokken bij de levering van de voor het ionentransport benodigde energie. Kenmerkend voor ionentransporterende cellen is verder nog, dat de mitochondriën zich speciaal tussen de membranen van het

labyrint bevinden. Ook de kern is actief, gezien zijn grote afmetingen en vele poriën. Deze activiteit wordt in verband gebracht met de grote behoefte aan enzymen die betrokken zijn bij het ionentransport en met het hoge metabolisme van een dergelijke actieve cel. Immers, de kern dirigeert de aanmaak van enzymen in het cytoplasma, via de vorming van verschillende typen RNA, die dan door de poriën in het cytoplasma terecht komen.

Bovengenoemde kenmerken werden nu door Wendelaar Bonga m.b.v. kwantitatieve elektronenmicroscopie onderzocht in de cellen van de nefronen en ureters van stekelbaarzen die hetzij in zeewater leefden, hetzij in zoet water. Bij deze vissen bestaat het basale labyrint uit diepe plooien in de basale celmembraan. De nauwe ruimten die door de plooien omsloten worden staan in direct contact met de extracellulaire ruimte. De meest opvallende verschillen die Wendelaar Bonga vond zijn in figuur 2 schematisch weergegeven. Het veel uitgebreidere labyrint,

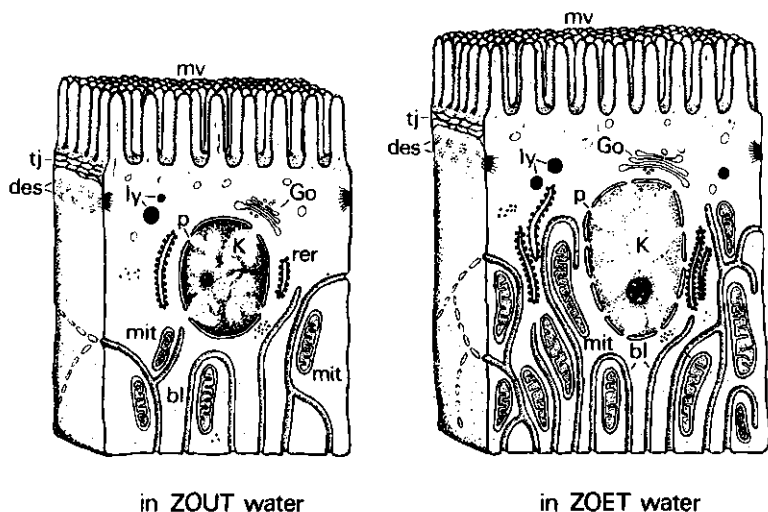


Fig. 2. Schematische weergave van doorsneden door cellen uit de wand van een nefronbuisje, of ureter van stekelbaarzen. De hier getekende bovenzijde met de microvilli (mv) is naar het lumen gericht. Bij dieren in zoet water bezitten deze cellen een uitgebreider basaal labyrint (bl), veel meer mitochondriën (mit) en een grotere kern (k) met meer poriën (p), dan de cellen van dieren in zout water. des = desmosomen, Go = Golgi apparaat, ly = lysosomen, rer = ruw endoplasmatisch reticulum, tj = tight junction.

het veel grotere aantal mitochondriën en de grote kern met de vele poriën bij de zoetwaterdieren duiden allemaal op een veel sterkere ionentransporterende activiteit in deze cellen dan in die van de zeewaterdieren en zijn geheel in overeenstemming met de fysiologische verschillen die reeds eerder werden vermeld. Bovendien vond Wendelaar Bonga veel meer partikeltjes per oppervlakte-eenheid op de membranen van het labyrint bij zoetwaterdieren, dan bij zeewaterdieren. Hij veronderstelt dat dit multi-enzym-complexen zijn en dat ze waarschijnlijk o.m. de eerder genoemde Na^+/K^+ -ATPasen en Mg^{2+} -ATPasen bevatten. Bij de stekelbaars is echter nog niet (biochemisch) aangetoond, dat de nieren van dieren in zoet water ook inderdaad een hogere ATPase activiteit vertonen dan die van dieren in zout water. Bekend is echter dat dit bij een andere vis (*Fundulus heteroclitus*) inderdaad het geval is.

Figuur 2 laat tevens zien, dat tijdens de trek van de stekelbaars vanuit de zee naar het zoete water, ingrijpende veranderingen in de nier moeten plaatsvinden. Wendelaar Bonga onderzocht daarom, hoe lang het duurde voordat de nier van een aan zeewater aangepast dier zich na overplaatsing in zoet water structureel aan het leven in zoet water had aangepast. Hij vond, dat alle hierboven genoemde veranderingen zich binnen 6-9 dagen voltrokken hadden. Een tweetal kenmerken echter had zich al veel eerder aangepast. Dit was in de eerste plaats de hoeveelheid partikeltjes op de membranen van het basale labyrint, die reeds binnen 20 uur de waarde van die van zoetwaterdieren had bereikt. Nog sneller was dit het geval bij het aantal kernporiën, dat reeds binnen 10 uur de waarde van zoetwaterdieren had bereikt. Zoals reeds werd vermeld, zouden deze beide parameters kunnen samenhangen met de grote enzymbehoefte van cellen die bezig zijn met ionentransport. Een snelle activering van het ionentransporterende mechanisme is immers noodzakelijk om de gevolgen van de overgang van zout naar zoet water osmoregulatorisch op te vangen. De gevonden duur van 6-9 dagen, die nodig is voor volledige structurele aanpassing aan zoet water, blijkt vrij goed overeen te komen met de snelheid van de fysiologische aanpassingen, zoals die uit de literatuur bekend is.

Invloed van prolactine op de structurele aanpassingen van niercellen
Tenslotte ging Wendelaar Bonga nog na wat de invloed van prolactine was op de snelheid waarmee de structurele aanpassing aan zoet water plaatsvindt. Hij bracht daartoe stekelbaarzen over van zeewater in

zoet water. Daarbij gaf hij aan de ene helft van de dieren elke dag een prolactine-injectie (beginnende op de dag van overzetting), terwijl de andere helft elke dag een injectie met het oplosmiddel van het hormoon kreeg (fysiologisch zout); deze laatste dieren dienden dus als controles. Het resultaat van deze proef was, dat de structurele aanpassingen bij de controledieren weer binnen 6-9 dagen voltooid waren, maar dat deze bij de prolactinedieren reeds binnen 3 dagen hadden plaatsgevonden. Prolactine doet dus het structurele aanpassingsproces sneller verlopen. Dit alles is geheel in overeenstemming met de reeds eerder genoemde stimulerende invloed van prolactine op de resorptie van ionen door de nieren bij zoetwatervissen.

Om deze hypothese sluitend te krijgen zou nog moeten worden aangetoond, dat bij stekelbaarzen die overgezet worden van zout in zoet water, of die in het voorjaar het zoete water binnentrekken, de prolactinecellen ook inderdaad actiever worden. Hiervoor zijn duidelijke aanwijzingen verkregen door Leatherland (1970), die vond dat de prolactinecellen van stekelbaarzen die in de winter in zee gevangen werden veel minder actief waren (volgens licht- en elektronenmicroscopische criteria) dan die van dieren die in het voorjaar in zoet water waren gevangen. Deze waarnemingen worden gesteund door onderzoek van Slijkhuis. Hij bracht mannelijke stekelbaarzen tot nestbouw (criterium voor geslachtsrijpheid) zowel in zeewater als in zoet water, door de dieren in het voorjaar bloot te stellen aan een lange daglengte (16 uur licht en 8 uur donker) en een hoge temperatuur (20°C). De prolactinecellen van de dieren in zoet water bleken veel actiever te zijn, dan die van de overeenkomstige dieren in zeewater (eveneens volgens elektronenmicroscopische criteria). Het lijkt er dus sterk op dat de prolactinecellen actief gaan worden als reactie op het in aanraking komen van de dieren met minder zout water.

Dit actiever worden van de prolactinecellen zou langs twee verschillende wegen bereikt kunnen worden. In de eerste plaats is het mogelijk, dat de samenstelling van het milieu wordt waargenomen door de smaak- en/of reukzintuigen, die hun informatie doorgeven aan de hypothalamus. Het is bekend dat bij veel beenvissen de hypothalamus de activiteit van de prolactinecellen onderdrukt en dit zou dus het geval kunnen zijn zolang de stekelbaars in zeewater leeft. Bij de overgang naar zoet water zou deze remming dan worden opgeheven. In de tweede plaats is het mogelijk, dat de prolactinecellen zelf reageren op eventuele verande-

ringen in het zoutgehalte van het bloedplasma. Dit zoutgehalte is bij zeewaterdieren wat hoger dan bij zoetwaterdieren, met als mogelijk gevolg dat de activiteit van de prolactinecellen wordt onderdrukt. Bij de overgang naar zoet water wordt de ionenconcentratie in het plasma echter wat lager, waardoor de activiteit van die cellen zou kunnen toenemen.

Bij de trek in het voorjaar zouden we ons de volgende gang van zaken kunnen voorstellen. Door nog onbekende factoren wordt de trek in gang gezet en komen de dieren in aanraking met een zich geleidelijk wijzigend milieu. Als gevolg hiervan gaan de prolactinecellen meer hormoon afgeven, waardoor de stekelbaars in staat wordt gesteld zich aan zijn nieuwe (zoet water) milieu aan te passen. Er is nog niet onderzocht wat er gebeurt bij stekelbaarzen die in de herfst vanuit het zoete water naar de zee trekken, maar het ligt voor de hand aan te nemen dat de prolactinecellen dan, o.i.v. het zich wijzigende milieu, minder hormoon zullen gaan afscheiden.

Verlies van nierfuncties bij geslachtsrijpe mannelijke stekelbaarzen
Alsof dit alles nog niet ingewikkeld genoeg is, doet zich in het voorjaar bij geslachtsrijpe mannelijke stekelbaarzen nog een extra complicatie voor. Zoals reeds is vermeld, bouwt dit dier een nest van kleine stukjes plantaardig materiaal, die hij aan elkaar lijmt met slijm dat in de nieren wordt gevormd. De nieren gaan dit slijm produceren wanneer zij onder de invloed komen te staan van mannelijk geslachtshormoon (testosteron), dat bij rijpe dieren in grote hoeveelheid in de testis wordt gevormd. De Ruiter onderzocht wat er in de nier gebeurt wanneer deze onder invloed van testosteron komt te staan. Hij vond dat deze voor 90% omgevormd wordt tot een orgaan dat eigenlijk alleen nog maar slijm produceert ten behoeve van de nestbouw. De bouw van de epithelcellen van de nefronen en ureters lijkt dan ook helemaal niet meer op die van ionentransporterende cellen. Zo hebben ze geen basaal labirint meer, bezitten ze een uitgebreid ruw endoplasmatisch reticulum (kenmerkend voor eiwitsynthese) en zitten ze vol met granula, waarin zich het slijm bevindt. Bovendien vond De Ruiter een veel geringere Na^+/K^+ -ATPase activiteit in de nieren. Dit alles betekent dat de nieren van rijpe mannelijke stekelbaarzen niet meer in staat geacht moeten worden om hun normale functies in zoet water uit te oefenen. De vraag rijst dan natuurlijk op welke wijze deze dieren dan de overmaat water

die zij binnenkrijgen kwijt raken en hoe ze de zo noodzakelijke ionen kunnen terugwinnen. De Ruiter (1976) heeft nu sterke aanwijzingen gevonden dat cellen in de wand van de darm een rol gaan spelen bij de hydrominerale regulatie. Zo kon hij aantonen, dat de darm van geslachtsrijpe mannelijke stekelbaarzen in zoet water veel meer water uitscheidt dan die van niet-rijpe mannelijke stekelbaarzen in dat milieu. Verder vond hij in de darmen van de rijpe dieren een hogere Na^+/K^+ -ATPase activiteit dan in die van de niet-rijpe dieren. De darmcellen moeten structureel nog beter onderzocht worden, maar zeker is al wel, dat ze een basaal labirint bezitten, dat vergelijkbaar is met dat van cellen die ionen transporteren. Er is nog niet aangetoond, of de structurele aanpassing van de darmcellen tot zouttransporterende cellen eveneens onder invloed staat van prolactine, zoals bij de niercellen het geval is, maar dit lijkt niet onwaarschijnlijk.

Hormonen en osmoregulatie bij beenvissen Hoe komen nu de gegevens over de invloed van prolactine op de aanpassing van de stekelbaars aan zoet water overeen met die van andere vissen? Jammer genoeg zijn bij veel soorten de structurele aanpassingen in de nieren niet, of nauwelijks bestudeerd. Maar wanneer alle beschikbare gegevens over fysiologische en structurele aanpassingen aan zoet en zout water bij verschillende soorten beenvissen met elkaar worden vergeleken, dan blijken deze voor een groot gedeelte met elkaar in overeenstemming te zijn. Uitzonderingen komen echter voor en zo heeft men gevonden, dat de goudvis, paling en forel lange tijd kunnen blijven leven in zoet water na het wegnemen van de hypofyse; mogelijk echter is dit alleen maar het gevolg van een kwantitatief verschil in de werking van prolactine. Dergelijke waarnemingen voorkomen, dat we al te snel zouden gaan generaliseren. Bovendien is het goed erop te wijzen, dat de gehele hydrominerale regulatie bij vissen en de invloed daarop van hormonen bijzonder ingewikkeld is en op veel punten nog duister, terwijl er ook veel modificaties voorkomen, afhankelijk van de soort.

Bij zoetwater-beenvissen bijvoorbeeld stimuleert prolactine niet alleen de cellen in de nieren tot resorptie van ionen, maar gaat het bovendien het verlies van Na^+ en Cl^- door de kieuwen tegen, terwijl het daar misschien ook actieve opname van zouten uit het milieu stimuleert. Zoals al eerder werd vermeld, moeten in zee levende beenvissen zeewater drinken en opnemen via de darm, terwijl ze de overmaat aan binnen-

gekregen zouten weer moeten uitscheiden door de chloridecellen in de kieuwen. Onderzoek heeft aangetoond dat voor een goed verloop van deze processen het hormoon cortisol noodzakelijk is. Dit hormoon wordt in de zogenaamde interrenale cellen in de nieren gevormd (deze cellen zijn vergelijkbaar met die van de bijnierschors bij zoogdieren) en de afscheiding ervan staat onder de regulerende invloed van ACTH uit de hypofyse. Ook mag niet onvermeld blijven dat bij veel beenvissen twee speciale orgaantjes voorkomen, die eveneens een rol lijken te spelen bij de osmoregulatie, namelijk de urofyse en de lichaampjes van Stannius. De urofyse lijkt bij een aantal soorten betrokken te zijn bij de aanpassing aan zeewater. In de lichaampjes van Stannius produceert een bepaald celtype een hormoon (hypocalcine), dat betrokken is bij de calciumregulatie, terwijl een tweede celtype (dat niet bij alle beenvissen, maar wel bij de stekelbaars voorkomt) betrokken lijkt te zijn bij de natrium- en kaliumregulatie (Wendelaar Bonga et al., 1976). Tenslotte kan nog vermeld worden dat, min of meer in tegenstelling tot de verwachting, het anti-diuretische effect van vasotocine, zoals dat bekend is van tetrapoden, bij een aantal beenvissen lijkt te ontbreken, terwijl het hormoon bij andere soorten juist een diuretisch effect lijkt te hebben. Voor nadere bijzonderheden kan verwezen worden naar Bentley (1971) en het hoofdstuk over hormonen en osmoregulatie in Bentley (1976).

Aanpassing van de voortplanting aan de wisselende seizoenen

Zoals reeds in de inleiding werd gezegd, is het voor dieren van essentieel belang dat ze hun jongen voortbrengen in de juiste periode van het jaar. Hierbij moeten we ons realiseren dat (op hogere breedtegraden) de geslachtsorganen van in het wild levende dieren slechts eenmaal per jaar gedurende een betrekkelijk korte periode volledig ontwikkeld zijn (morfologisch, zowel als endocrinologisch), terwijl ze de rest van het jaar in een niet-reproductieve toestand verkeren. Dit betekent, dat er weken en meestal zelfs maanden nodig zijn voor de ontwikkeling vanuit de niet-reproductieve naar de reproductieve toestand. Deze ontwikkeling moet dus beginnen lang voordat het voortplantingsseizoen aanbreekt; m.a.w. het endocriene systeem moet in staat zijn op dat komende seizoen te anticiperen. Aan de hand van het voorbeeld van de stekelbaars zal worden gedemonstreerd op welke ingewikkelde wijze het begin en het einde van de voortplantingsperiode wordt bepaald.

De jaarlijkse gonadencyclus van de stekelbaars De stekelbaars plant zich voort tussen ongeveer half april en half juli. In die periode bevatten de gonaden dus rijpe gameten en produceren ze de hormonen, die noodzakelijk zijn voor de juiste ontwikkeling van het gehele geslachtsapparaat en het optreden van voortplantingsgedrag (Baggerman, 1968). Het mannelijk hormoon wordt in de interstitiële cellen (Leydig-cellen) van de testis gevormd. De plaats waar het vrouwelijk hormoon gevormd wordt is minder duidelijk, maar zeer waarschijnlijk gebeurt dit in de granulocellen die dicht om de eicel liggen en in de interstitiële cellen in het stroma van het ovarium. Na de voortplantingsperiode keren de gonaden snel terug tot het niet-reproductieve stadium en bevatten ze eigenlijk alleen nog maar spermatogonia en oögonia. Ook de hormoonvormende cellen staken hun activiteit. Echter, reeds aan het begin van de herfst – dus wanneer de dieren nog in zee vertoeven – kunnen bij beide geslachten weer tekenen van hernieuwde ontwikkeling worden waargenomen. Deze ontwikkeling verloopt in twee fasen (figuur 3).

Bij het mannetje bestaat fase 1 uit de spermatogenese, die in november/december eindigt met de vorming van rijpe spermïën. De Leydig-cellen worden in deze periode echter niet actief. Dit kan men aflezen aan de geringe diameter van de kern (ca. 2 μm) en aan de geringe hoogte van het nierepithel in die tijd (ca. 14 μm). Dit laatste hangt samen met de positieve correlatie die er bestaat tussen de hoogte van het nierepithel en de hoeveelheid mannelijk hormoon in het bloed, hetgeen weer verband houdt met de reeds eerder vermelde omvorming tot cellen die slijm produceren t.b.v. de nestbouw. Figuur 3 laat ook zien, dat na afloop van fase 1 de situatie enige tijd onveranderd blijft, waarna in januari/februari fase 2 begint. Deze uit zich in het actiever worden van de Leydig-cellen (de kerndiameter wordt ongeveer tweemaal zo groot), terwijl de hoogte van het nierepithel toeneemt tot ca. 32 μm bij volledig rijpe dieren. Bij de vrouwtjes bestaat fase 1 uit een groei van de (grootste) eieren tot een diameter van ca. 350 μm . Dergelijke eieren vertonen een groot aantal vacuolen in het cytoplasma, hetgeen gezien wordt als een uiting van beginnende dooivorming. Ook bij deze dieren treedt in november/december een periode van stilstand in, waarna fase 2 begint met een hernieuwde groei van de eieren. Tegelijkertijd vindt nu een sterke dooierafzetting plaats in de vorm van eosinofiel materiaal, terwijl de granulocellen, die in fase 1 niet erg opvallend waren, duidelijk zichtbaar worden. Volledig rijpe, niet geövuleerde eieren hebben een

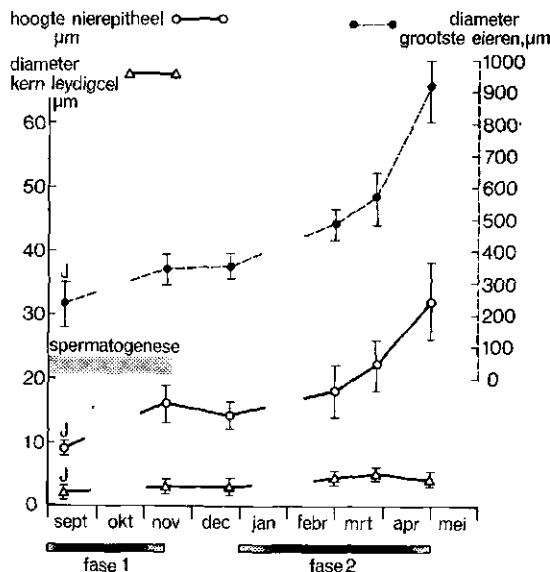


Fig. 3. Jaarlijkse gonadencyclus van de stekelbaars; voor verklaring zie tekst. Het begin en einde van fase 1 en fase 2 liggen niet geheel vast en zijn afhankelijk van o.m. de temperatuur van het water. J = gegevens van juveniele dieren (minder dan één jaar oud); overige gegevens afkomstig van dieren die ouder zijn dan één jaar.

diameter van ca. 900 µm. Voor nadere bijzonderheden en literatuur over de gonadenontwikkeling bij de stekelbaars, wordt verwezen naar Wootton (1976) en naar het hoofdstuk van Van Oordt in deze uitgave.

In het onderzoek waarover het nu volgende gedeelte zal gaan, wordt het geslachtsrijp worden van de gonaden als één geheel beschouwd en wordt voorts nog weinig aandacht besteed aan de deelprocessen. Het eerste doel van het onderzoek is na te gaan wat er de oorzaak van is dat de geslachtsorganen elk jaar op de juiste tijd volledig functioneel worden. De methode bestaat uit het variëren van de input (daglengte, temperatuur) en het bestuderen van de output (het al of niet geslachtsrijp worden) om op die manier op het spoor te komen van eigenschappen van het endocriene voortplantingssysteem (Baggerman, 1957, 1972). Wanneer op deze manier inzicht is verkregen in het functioneren van dit systeem als geheel zal, als tweede doel, getracht worden de ontwikkeling van de diverse deelprocessen te analyseren.

Invloed van de daglengte op de gonadenrijping Toen ik met dit soort onderzoek begon, kon voortgebouwd worden op de resultaten van onderzoek dat vooral veel was gedaan aan vogels. Reeds in 1926 had de Canadees Rowan vastgesteld, dat het mogelijk was zangvogels in het hartje van de winter, bij de heersende lage temperaturen, tot voortplanting te brengen door ze aan een kunstmatige lange daglengte bloot te stellen, bijvoorbeeld 16 uur licht gevolgd door 8 uur donker (16L/8D). Het lag dus voor de hand dat ik begon met stekelbaarzen die in de herfst en winter gevangen waren, bloot te stellen aan daglengten van verschillende duur, al of niet gecombineerd met verschillende temperaturen. Daartoe werden de dieren in groepjes van 15-20, in aquaria van ca. 60 liter gehouden, die in ruimten stonden waar de temperatuur constant kon worden gehouden en de daglengte gereguleerd m.b.v. elektrische schakelklokken. De aquaria bevatten zand, planten en nestbouw-materiaal, terwijl de dieren goed gevoerd werden met *Daphnia*'s en/of *Tubifex*. Dagelijks werd gecontroleerd of er dieren geslachtsrijp waren geworden. Bij de mannetjes was dit het geval wanneer ze een nest gebouwd hadden en bij de wijfjes wanneer het mogelijk was d.m.v. een lichte druk op de buik eieren af te strijken. Deze criteria werden gebruikt, omdat ze de garantie inhouden, dat de gametogenese voltooid is en de endocriene weefsels optimaal functioneren. Steeds werd genoteerd, op welke dag na het begin van de proef het dier geslachtsrijp was geworden, waarna het uit het aquarium werd verwijderd. Elke proef duurde minstens 65 dagen en bij het beëindigen ervan werd genoteerd welk percentage van de dieren in elk aquarium binnen die tijd geslachtsrijp geworden was.

Figuur 4 laat het resultaat zien van twee van dit soort proeven. De eerste werd gedaan met dieren die op 16 november in een grote vijver buiten waren gevangen en de tweede met dieren die daar op 25 januari waren gevangen. In beide gevallen werden dieren blootgesteld aan drie verschillende daglengten, namelijk 16L/8D, 12L/12D en 8L/16D, steeds bij 20°C.

Wanneer we eerst het resultaat bekijken van de proef van 16 november, dan zien we dat de dieren bij 16L/8D (in het vervolg 16L genoemd) allemaal snel geslachtsrijp werden, namelijk binnen 24-39 dagen. Dat wil zeggen dat deze dieren tussen 10 en 29 december in voortplantingsconditie verkeerden, dus ruim drie maanden eerder dan onder natuurlijke omstandigheden. Nu was in deze proef niet alleen de daglengte

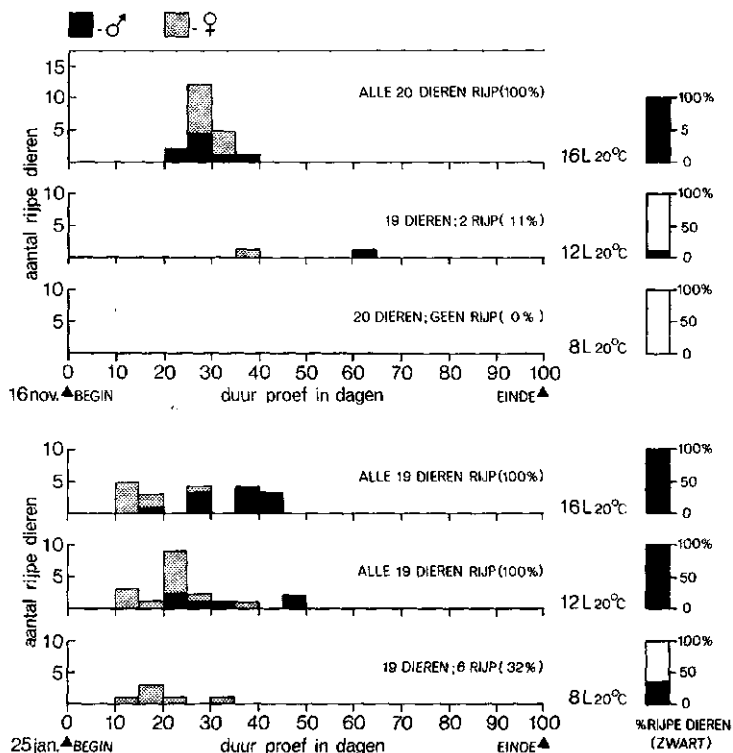


Fig. 4. Het resultaat van twee proeven (die respectievelijk begonnen op 16 november en 25 januari), waarbij groepjes stekelbaazren, die op die data buiten gevangen waren, gedurende 100 dagen werden blootgesteld aan drie verschillende daglengten, 16L, 12L en 8L (steeds bij 20°C). Weergegeven is het aantal dieren dat na verloop van een kleiner of groter aantal dagen geslachtsrijp werd. Aan de rechterzijde staat, in de vertikale kolommetjes, met zwart weergegeven het percentage dieren uit elk groepje dat geslachtsrijp werd bij de betreffende daglengte.

lang (16L), maar ook de temperatuur hoog (20°C). Deze hoge temperatuur had echter veel minder invloed dan de lange daglengte, want figuur 4 laat zien, dat geen enkel dier rijp werd bij 8L/16D (kortweg 8L genoemd), ofschoon de temperatuur hier eveneens 20°C was. Verder toont figuur 4 dat van de 19 dieren die bij 12L zaten, er slechts 2 rijp werden binnen de 100 dagen dat de proef duurde. Hierbij was iets

opmerkelijks aan de hand. Nadat op dag 64 het tweede dier rijp was geworden, werd er gedurende de daarop volgende 36 dagen geen enkel dier meer geslachtsrijp van de 17 die nog overgebleven waren. Hierop kom ik nog terug.

Ook bij de proef van 25 januari werden alle dieren bij 16L snel rijp (binnen 11-42 dagen). In tegenstelling tot de vorige proef werden nu ook alle dieren rijp die bij 12L waren gehouden (binnen 14-31 dagen), terwijl bij 8L er 6 van de 19 geslachtsrijp werden. Ook hier is weer opmerkelijk (net zoals bij 12L in de vorige proef) dat, nadat op de 31ste dag het zesde dier rijp was geworden, er gedurende de daarop volgende 69 dagen geen enkele van de overgebleven 13 dieren meer geslachtsrijp werd.

Dit is een zeer opmerkelijk punt en het lijkt erop alsof we hier te maken hebben met een soort van 'alles-of-niets'-principe, dat van meer fysiologische processen bekend is. We zouden immers uit deze proeven kunnen concluderen, dat de dieren hetzij op een bepaalde daglengte reageren en dat dan betrekkelijk snel doen, hetzij hierop niet reageren zelfs niet wanneer de proef heel lang wordt voortgezet. Zo heeft de ervaring geleerd, dat wanneer dieren in de herfst aan 8L (20°C) worden blootgesteld, het overgrote deel ervan niet geslachtsrijp zal worden, ook niet wanneer men ze een jaar of langer onder die omstandigheden laat zitten.

Bij een 'alles-of-niets'-reactie wordt verondersteld dat deze ontstaat doordat de reactie a.h.w. een ingebouwde 'drempel' heeft. Wil een prikkel een bepaalde reactie teweegbrengen, dan moet hij sterk genoeg zijn om die drempel te overschrijden. Is de prikkel inderdaad sterk genoeg, dan volgt een volledige reactie; is de prikkel niet sterk genoeg, dan volgt geen reactie. Mijn interpretatie van de reacties op 12L van de novembergroep en op 8L van de januari-groep is, dat in beide proeven de drempel voor de reactie op de daglengte slechts bij een deel der dieren laag genoeg was om door de prikkel, uitgaande van 12L, respectievelijk 8L te kunnen worden overschreden. Bij deze dieren liep de reactie dus volledig af, m.a.w. ze werden snel geslachtsrijp. Bij alle overige dieren was de drempel kennelijk te hoog om overwonnen te worden en werden de dieren niet rijp, ook niet toen ze heel lang aan de betreffende daglengten werden blootgesteld. Dat dieren die oorspronkelijk uit eenzelfde populatie (uit de vijver) afkomstig waren, verschillend kunnen reageren op eenzelfde daglengte is niet verwonderlijk, omdat er altijd indivi-

duale verschillen bestaan tussen dieren binnen eenzelfde populatie.

Indien deze interpretatie juist is, dan laat figuur 4 nog meer opmerkelijke dingen zien. In de eerste plaats dat in beide proefseries alle dieren reageerden op 16L, maar dat een veel geringer aantal (of geen) dieren reageerde op 8L, terwijl het aantal reagerende dieren bij 12L daar ongeveer tussenin lag. Hieruit kan men de conclusie trekken dat 16L een sterkere prikkel vormt voor het overwinnen van de drempel dan 12L, en deze weer een sterkere dan 8L. Figuur 4 laat in de tweede plaats zien, dat in november slechts twee van de 19 dieren reageerden op 12L, terwijl in januari alle dieren erop reageerden. Iets dergelijks zien we bij 8L: in november reageerde geen enkel dier op deze daglengte, maar in januari reageerden er 6 van de 19. Hieruit zou men dus kunnen concluderen, dat tussen november en januari de drempel voor de inwerking van licht lager geworden is.

Daling van de drempelwaarde tussen nazomer en voorjaar Om deze conclusies nader te toetsen, werd in de loop van een aantal jaren nagegaan wat de reacties waren van dieren die op verschillende tijden van het jaar buiten werden gevangen en vanaf die momenten blootgesteld werden aan verschillende daglengten, variërende van 8L tot 16L (steeds bij 20°C). Figuur 5 laat zien dat bovenstaande gedachtengang inderdaad juist is. Midden in de zomer is de drempelwaarde zo hoog, dat zelfs geen enkel dier in staat is om op 16L te reageren. Dit betreft dan zowel de jonge dieren van datzelfde jaar, als de oude dieren na het einde van hun voortplantingsperiode. Tegen eind augustus echter zijn enkele dieren reeds in staat om op 16L te reageren en tegen eind september is dit bij allemaal het geval. Op een daglengte van 14L beginnen de dieren later te reageren, namelijk pas tegen eind september, op 12L tegen eind november en op 8L tegen eind december. In figuur 5 is nu een lijn getrokken, die de maanden verbindt, waarop voor het eerst enkele dieren uit een groep op een bepaalde daglengte reageerden. Deze lijn geeft dus in feite het verloop weer van de daling van de drempel voor de inwerking van licht, zoals die bij stekelbaarzen onder natuurlijke omstandigheden plaatsvindt tussen de nazomer en het vroege voorjaar.

Het verloop van deze drempelwaarde-curve blijkt nu van grote betekenis te zijn voor het verkrijgen van meer inzicht in de wijze waarop het voortplantingsseizoen van de stekelbaars wordt gereguleerd. Dit komt tot uiting wanneer we het verloop van deze curve vergelijken met die

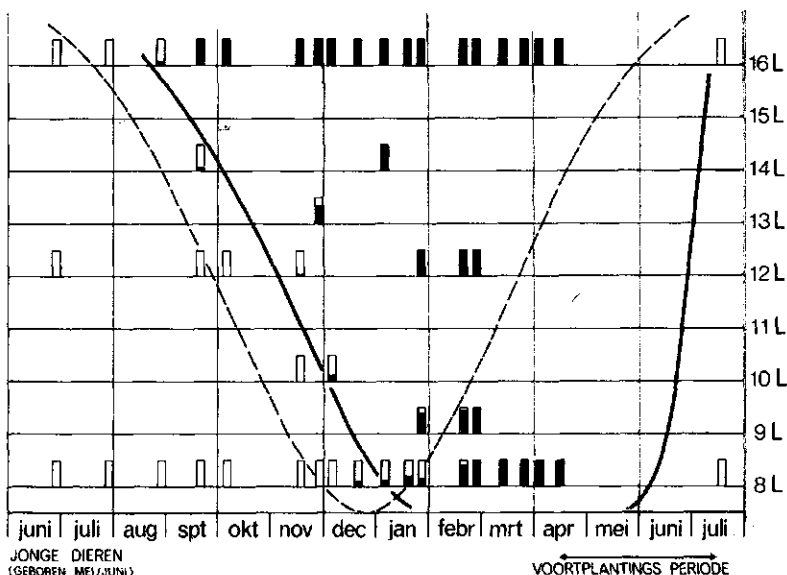


Fig. 5. De percentages stekelbaarzen die binnen 65 dagen geslachtsrijp werden (zwart, vergelijk overeenkomstige kolommetjes in figuur 4) van groepjes dieren die in verschillende maanden van het jaar buiten gevangen waren en toen werden blootgesteld aan daglengten, variërend van 8L tot 16L (steeds bij 20°C). Voorbeeld: eind september (onderste horizontale as) werden stekelbaarzen blootgesteld aan respectievelijk 16L, 14L, 12L en 8L. Dit is aangeduid door de kolommetjes die (hoven die datum) op de horizontale lijnen staan die de betreffende fotoperioden weergeven. Het zwart in deze kolommetjes geeft aan dat 100% van de dieren rijp werd bij 16L; 15% bij 14L en 0% bij 12L en 8L.

De getrokken curve geeft de hoogte weer van de drempelwaarde voor de inwerking van licht in de loop van het jaar en de gestippelde curve het aantal uren dat het per dag licht is op onze breedtegraad in de loop van het jaar (variërend van meer dan 16 uur (16L) in de zomer tot minder dan 8 uur (8L) in de winter).

van de gestippelde curve in figuur 5. Deze laatste geeft weer het aantal uren dat het licht is op onze breedtegraad in de verschillende maanden. Op 21 juni is het 16 uur licht per dag, op 23 september 12 uur en op 21 december 8 uur; op 21 maart is het weer 12 uur licht per dag en op 21 juni weer 16 uur. Omstreeks eind september zijn de dagen dus nog relatief lang en zijn ook de temperaturen nog niet al te laag. Wat dit betreft lijkt de situatie erg op die van eind maart. Toch komen in de herfst nooit stekelbaarzen tot voortplanting, terwijl dit in het voorjaar

wel het geval is. Figuur 5 laat zien op welke wijze dit te verklaren is. Volgens de drempelwaarde-curve hebben de dieren omstreeks september minstens 14 uur licht per dag nodig om geslachtsrijp te kunnen worden (immers in die tijd reageert nog maar een gedeelte van de dieren op 14L). De natuurlijke daglengte omstreeks die tijd is echter nog maar 12 uur, zodat de drempel niet overwonnen kan worden en geen rijping kan optreden. Dit is evenmin het geval in oktober, november en december, omdat in die periode de natuurlijke daglengten steeds korter zijn dan die welke de dieren nodig hebben om geslachtsrijp te kunnen worden. Daarin begint echter na december verandering te komen. De drempelwaarde is dan al zóver gedaald, dat de dieren zelfs al geslachtsrijp kunnen worden bij daglengten, die korter zijn dan de natuurlijke daglengten in die periode van het jaar. Figuur 5 laat zien dat stekelbaarzen zelfs indien de daglengte na december niet zou toenemen, toch geslachtsrijp zouden worden!

De betekenis van de hoge drempel voor de inwerking van licht bij stekelbaarzen in de nazomer en herfst is dus duidelijk: hij belet dat ze zich in dat jaargetijde zouden voortplanten, hetgeen nadelig zou zijn voor de overlevingskansen van de jongen en daarmee voor het voortbestaan van de soort! Verder toont figuur 5 aan, dat het niet langer juist is te zeggen, zoals ik zelf vele jaren heb gedaan (Baggerman, 1957), dat de stekelbaars in het voorjaar tot voortplanting komt als reactie op het langer worden van de dagen. Wat we zullen moeten zeggen is, dat hij in die tijd geslachtsrijp wordt, omdat zijn neuro-endocriene systeem vanaf december/januari gevoelig geworden is voor de dan heersende (korte) daglengten; het langer worden van de dagen is daarbij niet essentieel! Het zou erg de moeite waard zijn om na te gaan, of dit ook zou opgaan voor de vele vogelsoorten, waarvan steeds gezegd wordt dat ze in het voorjaar tot voortplanting komen onder invloed van het langer worden van de dagen. Tot nu toe is echter, merkwaardigerwijze, bij deze dieren geen onderzoek gedaan, dat vergelijkbaar is met datgene wat in figuur 5 staat afgebeeld.

Invloed van de temperatuur In het bovenstaande is de invloed van de temperatuur van het milieu nog maar even ter sprake geweest. Dit was het geval bij de bespreking van figuur 4, waaruit geconcludeerd werd dat een hoge temperatuur op zich (d.w.z. in combinatie met 8L) bij dieren in de herfst geen rijping kan induceren. Voor het overwinnen van

de drempel is dus alleen de duur van de fotoperiode van beslissende betekenis. Dit betekent echter niet dat de temperatuur bij het geslachtsrijp worden van de stekelbaars helemaal geen rol zou spelen. Zo werd gevonden dat het rijpingsproces, dat plaatsvindt nadat de drempel is overschreden, bij 20°C bijna tweeëneenhalf maal zo snel verloopt als bij 9°C. Dit alles betekent, dat onder natuurlijke omstandigheden het begin van het voortplantingsseizoen wordt bepaald door (1) de drempel voor licht, die in december/januari voor het eerst door de natuurlijke daglengte kan worden overschreden, tezamen met (2) de temperatuur van het milieu gedurende de eerste maanden van het jaar.

De wijze waarop de fotoperiode het endocriene systeem beïnvloedt
Over de wijze waarop de daglengte het endocriene systeem beïnvloedt kan het volgende worden gezegd. Bij vogels is aangetoond dat de receptoren die het licht ontvangen, zich niet alleen in de ogen bevinden, maar ook verspreid in de hersenen; mogelijk is dit bij de stekelbaars eveneens het geval. De door de lichtreceptoren opgevangen informatie wordt vervolgens doorgegeven naar speciale neuro-secretorische cellen in de hypothalamus. Indien de activiteit van deze cellen wordt gestimuleerd, zijn zij in staat om op hun beurt cellen in de hypofyse te stimuleren tot verhoogde produktie van gonadotroop hormoon (of hormonen). Voor nadere bijzonderheden wordt verwezen naar het hoofdstuk van Van Oordt in deze uitgave. De drempel voor de inwerking van licht ligt mogelijkwerwijs in de genoemde neuro-secretorische cellen zelf, of anders in nog onbekende 'voorgeschakelde' cellen en moet beschouwd worden als een gevoeligheid van deze cellen voor de informatie die van de lichtreceptoren komt.

Bij hogere vertebraten bezit de hypofyse twee verschillende typen gonadotrope cellen, een FSH-cel en een LH-cel. In het kort zou men kunnen stellen dat het hormoon FSH bij deze dieren speciaal betrokken is bij de spermatogenese en groei van de follikels, terwijl het hormoon LH vooral een rol speelt bij de stimulering van de hormoonproduktie in de Leydig-cellen en follikels. Het is echter bij beenvissen nog steeds een omstreden punt, of zij één dan wel twee gonadotrope cellen bezitten, maar het is mogelijk dat dit afhankelijk is van de soort (zie verder het hoofdstuk van Van Oordt in deze uitgave). Bij de stekelbaars heeft onderzoek van Slijkhuis aanwijzingen opgeleverd dat bij deze soort twee typen gonadotrope cellen voorkomen. Dit onderzoek lijkt bovendien

aan te tonen, dat het ene (lichte) celtype relatief inactief is in fase 1 van de gonadenontwikkeling en steeds actiever wordt tijdens fase 2. Het tweede (donkere) celtype is (in tegenstelling tot het eerste type) erg actief in fase 1 en blijft dit ook gedurende fase 2. Op grond van hetgeen hierboven is gezegd over de situatie bij de hogere vertebraten, is het erg verleidelijk om te veronderstellen dat het eerste celtype een LH-achtig hormoon zal vormen en het tweede een FSH-achtig hormoon. Wij realiseren ons echter goed dat de genoemde waarnemingen nog een erg zwakke basis vormen voor zo'n hypothese en er zal dus veel aanvullend onderzoek moeten worden gedaan.

Ervan uitgaande dat de gonadenontwikkeling in twee fasen plaatsvindt (figuur 3) zijn er verder ook nog aanwijzingen dat de eerder besproken drempel voor de inwerking van licht alleen betrekking heeft op fase 2. Reeds werd vermeld dat het overgrote deel van dieren die vóór december aan 8L en 20°C worden blootgesteld, onder deze omstandigheden niet geslachtrijp wordt, zelfs niet wanneer men ze daar langer dan een jaar laat zitten. Zodra men echter — op welk tijdstip dan ook — deze dieren blootstelt aan 16L (bij 20°C), dan worden ze geslachtsrijp binnen 20-50 dagen. Figuur 3 laat zien dat in november/december fase 1 is afgelopen en fase 2 nog moet beginnen. Histologisch onderzoek (op vier verschillende tijdstippen binnen 13 maanden) van dieren die vanaf november aan 8L en 20°C waren blootgesteld geweest zonder rijp te worden, liet zien dat fase 1 altijd voltooid was (of bezig was zich te ontwikkelen), maar dat er zeer zelden tekenen waren van ontwikkeling van fase 2. De drempel voor de inwerking van licht moet dus zeer waarschijnlijk in de keten van processen gezocht worden die verantwoordelijk is voor de ontwikkeling van fase 2. Voor wat betreft fase 1, lijken alle gegevens erop te duiden dat deze zich onder de meest uiteenlopende condities kan ontwikkelen en praktisch onafhankelijk is van de daglengte. Wel is het zo, dat volgens de literatuur de snelheid waarmee fase 1 verloopt gestimuleerd wordt door hogere temperaturen. Al eerder zagen we dat dit ook het geval was bij het rijpingsproces dat plaatsvindt nadat de drempel is overschreden, dus van fase 2.

Einde van de voortplantingsperiode Tot dusver hebben we ons alleen bezig gehouden met factoren, die het begin van de voortplantingsperiode bepalen. Even belangrijk echter zijn de factoren die hieraan op het juiste moment een einde maken. Hierover is echter veel minder

bekend. Bij de stekelbaars heb ik gevonden, dat wanneer de dieren vanaf het voorjaar continu onder gelijkblijvende omstandigheden worden gehouden, de duur van de voortplantingsperiode onder 16L en 20°C ongeveer tweemaal zolang is als onder 8L en 20°C. Hieruit kan men twee conclusies trekken. In de eerste plaats, dat de lengte van de fotoperiode van grote invloed is op de duur van de voortplantingsperiode. In de tweede plaats dat ook een endogene factor hierbij betrokken moet zijn omdat de voortplanting ten einde komt, terwijl toch de uitwendige omstandigheden steeds gelijk bleven (namelijk 16L en 20°C, of 8L en 20°C). Onder natuurlijke omstandigheden duurt de voortplantingsperiode ca. drie maanden (half april tot half juli); de daglengten zijn dan relatief lang (13-16 uur) en de temperatuur hoog (14-20°C). Deze duur komt aardig overeen met die van dieren die continu aan 16L en 20°C waren blootgesteld en die bij de mannetjes ca. drie maanden en bij de vrouwtjes ca. twee maanden bedroeg. In figuur 5 wordt het einde van de voortplantingsperiode bepaald door de snelle stijging van de drempelwaarde in de voorzomer.

Een dagelijks ritme in gevoeligheid voor licht als basis voor de fotoperiodische reactie Tenslotte moeten we nog ingaan op een vraag, die rijst wanneer we zien dat stekelbaarzen in staat zijn verschillend te reageren op fotoperioden van verschillende lengte (figuren 4 en 5). Dit betekent immers dat de dieren op één of andere manier de duur van de fotoperiode kunnen meten en we zouden dus willen weten op welke manier ze daartoe in staat zijn. Dank zij onderzoek dat de Amerikaan Hamner als eerste deed (in 1963/64) kunnen we deze vraag tegenwoordig min of meer beantwoorden. Op grond van hetgeen toentertijd bekend werd over dagelijkse ritmen (die bij vrijwel alle biologische processen voorkomen) stelde Hamner de hypothese op dat een dier in de loop van een etmaal niet steeds even gevoelig zou zijn voor de inwerking van licht. Hierin zou dan de oorzaak kunnen liggen van zijn vermogen om verschillend te reageren op fotoperioden van verschillende duur. (Reeds in 1936 had Bünning een dergelijke hypothese opgesteld ter verklaring van de bloei van lange- en korte-dag planten; zie Bünning, 1963).

Hamner (1964), die met vogels werkte, trachtte zijn hypothese te bewijzen door gebruik te maken van een serie zogenaamde skelet-fotoperioden. Dergelijke fotoperioden zijn bij het onderzoek van vogels en insecten zeer veel gebruikt en ik heb ze ook bij de stekelbaars toege-

past. Een voorbeeld ervan is in figuur 6 weergegeven. Het principe is, dat men de dieren aan het begin van elk etmaal blootstelt aan een bepaald aantal uren licht, bijvoorbeeld 6 uur, en dat men ze daarna nog eens bijvoorbeeld 2 uur extra licht geeft op verschillende momenten gedurende de rest van het etmaal. Deze 2 uur licht onderbreekt dan dus op verschillende tijden de periode dat het elke dag donker is, zoals figuur 6 laat zien. In alle gevallen worden de dieren echter in totaal aan precies hetzelfde aantal uren licht per etmaal blootgesteld, namelijk 8 uur. Bij dit soort van proeven moet altijd van te voren vastgesteld zijn, dat de dieren niet zullen reageren op de totale duur van deze fotoperiode, in dit geval dus 8L. Bij de stekelbaars weten we dat dit het geval is bij dieren die in de herfst worden gevangen (figuren 4 en 5). De experimenten, waarvan de gemiddelde resultaten in figuur 6 zijn weergegeven, zijn dan ook in november gedaan.

Om de resultaten te begrijpen moeten we ons voorstellen, dat indien de dieren wel op elk moment van het etmaal even gevoelig zouden zijn voor de inwerking van die 2 uur extra licht, ze op alle skelet-fotoperioden op dezelfde wijze zouden moeten reageren. Figuur 6 laat echter zien dat dit beslist niet het geval was. De dieren reageerden niet op een aaneengesloten periode van 8 uur licht (zoals verwacht), maar wel op 6 uur licht plus 2 uur, wanneer deze 2 uur licht later in het etmaal werd gegeven. Zo reageerde 8% van de dieren wanneer die 2 uur licht werd gegeven tussen uur 10 en 12 (uur 0 is het begin van het etmaal, zie figuur 6). Wanneer die 2 uur werd gegeven tussen uur 12 en 14 reageerde 52% en wanneer die werd gegeven tussen uur 14 en 16 reageerde 78%. Werd de 2 uur licht echter nog later in het etmaal gegeven, dan reageerden weer minder dieren daarop, namelijk 41%. Figuur 6 laat dus zien dat stekelbaarzen inderdaad niet op elk moment van het etmaal even gevoelig zijn voor de inwerking van licht, maar dat die gevoeligheid weergegeven kan worden in een optimumcurve, waarvan het maximum ongeveer tussen uur 14 en 16 na het begin van de dag ligt. Dergelijke curven zijn ook voor veel vogelsoorten en enkele soorten insecten gemaakt en weerspiegelen dus een dagelijks weerkerend ritme in de gevoeligheid van het neuro-endocriene systeem voor de inwerking van licht.

Het in figuur 6 weergegeven dagelijks ritme in gevoeligheid voor licht kan nu tevens verklaren, waarom stekelbaarzen in de herfst niet kunnen reageren op 8L en wel op 16L (figuren 4 en 5). Immers, die 8 uur licht

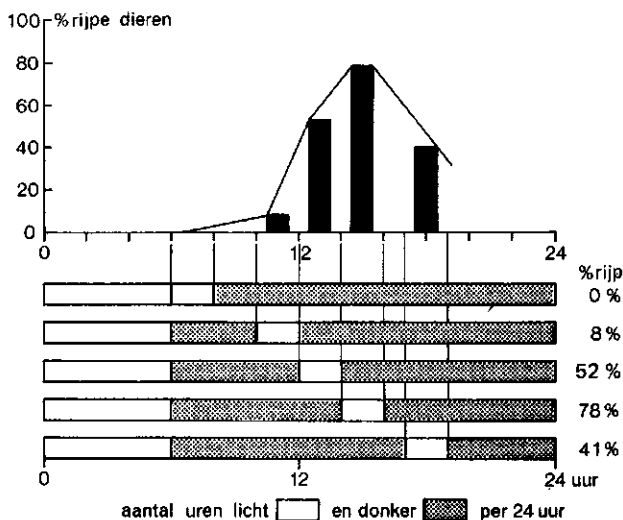


Fig. 6. Het gemiddelde percentage dieren dat binnen 65 dagen rijp werd, in 4 experimenten met stekelbaarzen, die op verschillende tijdstippen in november buiten waren gevangen en toen werden blootgesteld aan een serie skelet-fotoperioden. In elk experiment werden 5 groepjes blootgesteld aan 6 uur licht aan het begin van elk etmaal, en daarna nog eens aan 2 uur licht, die echter voor elk groepje op een ander tijdstip gegeven werd (zie horizontale balken). Het essentiële punt is, dat de dieren anders reageren, naarmate de twee uur extra licht later in het etmaal wordt gegeven, terwijl de totale hoeveelheid licht per dag voor alle groepjes gelijk is, namelijk 8 uur.

treft hen in een periode van het etmaal, waarin ze er niet of nauwelijks gevoelig voor zijn, namelijk tussen uur 0 en 8. Daarentegen staan de dieren die bij 16L gehouden worden, ook aan de inwerking van licht bloot gedurende een periode van het etmaal, waarin ze daar wel gevoelig voor zijn, namelijk tussen uur 8 en 16; vandaar dat deze dieren dus wel op 16L reageren. Op dezelfde wijze kan men verklaren, waarom in de herfst slechts een klein gedeelte van de dieren reageert op 12L (figuur 3).

Het is interessant te weten, dat men bij bepaalde vogelsoorten heeft kunnen aantonen, dat hun dagelijkse ritme in gevoeligheid voor licht een endogene oorsprong heeft en dus niet veroorzaakt wordt door de dag/nacht wisselingen (voor overzicht zie Farner, 1975). Er zijn aanwij-

zingen dat dit ook bij de stekelbaars het geval is. Een kenmerk van endogene dagelijkse ritmen is, dat hun periode niet precies 24 uur is, maar daarvan enigszins afwijkt. Daarom noemt men dergelijke ritmen ook wel 'circadiane ritmen' (circa = ongeveer; dies = dag). Onder normale omstandigheden wordt de periode van een circadiaan ritme met die van de buitenwereld (precies 24 uur) gesynchroniseerd door 'Zeitgebers', dat zijn periodieke dagelijkse wisselingen in het milieu. Heel vaak is dit de overgang van licht naar donker, of omgekeerd. Het dagelijkse ritme in de gevoeligheid voor licht fungeert dus bij vogels, maar ook bij de stekelbaars als inwendige klok, waarmee de dieren in staat zijn de tijd te meten. Voor literatuur over dagelijkse ritmen wordt verwezen naar Bünning (1963), Beck (1963), Brown et al. (1970) en Palmer (1976).

Jaarlijkse cyclus van het dagelijkse ritme in lichtgevoeligheid Als laatste onderdeel van deze bespreking van het dagelijks ritme in gevoeligheid voor licht moet nu nog ingegaan worden op een schijnbare tegenstrijdigheid tussen de gegevens van figuur 5 en figuur 6. In figuur 6 wordt immers aangetoond dat de dieren weinig of niet gevoelig zijn voor licht dan hen treft gedurende de eerste 12 uren van de dag. Figuur 5 laat daarentegen zien, dat naarmate het voorjaar nadert, de dieren ook gaan reageren op daglengten korter dan 12 uur. Een mogelijke verklaring hiervoor kan zijn dat de dieren, naarmate het voorjaar nadert, steeds gevoeliger gaan worden voor licht dat hen vroeg in de dag treft. Deze veronderstelling heb ik getoetst door op regelmatige tijden tussen september en april, dieren buiten te vangen en bloot te stellen aan de serie skelet-fotoperioden zoals die is weergegeven in figuur 6. De resultaten staan in tabel 1. De middelste kolom hiervan geeft, ter vergelijking, nogmaals de percentages rijpe dieren weer die ook in figuur 6 staan afgebeeld. Deze tabel laat zien, dat vóór november het percentage reacties over de gehele linie veel lager is, terwijl dit na die tijd steeds toeneemt, totdat begin maart alle dieren reageren op alle skelet-fotoperioden. Dit alles blijkt geheel in overeenstemming te zijn met het verloop van de drempelwaarde, zoals die in figuur 5 is weergegeven. Het is dus erg waarschijnlijk dat de daling in de drempelwaarde enerzijds en de verandering in het dagelijks ritme in gevoeligheid voor licht anderzijds, een gemeenschappelijke basis hebben en mogelijk zelfs op eenzelfde proces berusten. Waar de oorsprong van deze wijziging in de gevoelig-

Tabel 1. De gemiddelde percentages dieren die geslachtsrijp werden, van groepen stekelbaarzen die op diverse tijdstippen van het jaar buiten waren gevangen en toen werden blootgesteld aan verschillende skelet-fotoperioden. De kolom 'nov. '67' geeft nogmaals de gemiddelde percentages die ook in figuur 6 zijn weergegeven. Alle overige percentages zijn gemiddelden van twee proeven, die in verschillende jaren zijn gedaan.

Fotoperiode	21 sept. '73/24 sept. '74	29 okt. '73/4 nov. '74	nov. '67 (fig. 6)	18 dec. '73/23 dec. '74	18 jan. '74/23 jan. '75	5 mrt. '74/8 mrt. '75
8L - 16D	0	0	0	19	57	100
6L - 2D - 2L - 14D	0	0	—	14	57	100
6L - 4D - 2L - 12D	0	0	8	25	100	100
6L - 6D - 2L - 10D	18	44	52	94	100	100
6L - 8D - 2L - 8D	17	67	78	100	100	100
6L - 11D - 2L - 5D	—	—	41	—	—	—

heid voor licht gezocht moet worden en wat de aard ervan is, is op dit moment nog duister.

Het zou zeer interessant zijn om na te gaan, of deze jaarlijkse verandering berust op een endogeen ritme; een dergelijk ritme wordt tegenwoordig aangeduid met 'circannueel ritme'. Voorbeelden daarvan zijn bij trekvogels de rui en trekonrust (Gwinner, 1972) en bij bepaalde zoogdieren verschijnselen samenhangende met de winterslaap (Pengelley & Asmundson, 1971).

Besluit

De conclusies die uit de proeven met stekelbaarzen kunnen worden getrokken, mogen niet zonder meer worden toegepast op de regulatie van de voortplanting bij andere diersoorten. Wel lijkt het erop dat vergelijkbare principes voorkomen bij althans een deel van de soorten die eveneens gebruik maken van de fotoperiode bij de regulatie van hun voortplantingsseizoen. Beck (1963) geeft in een aardig boekje een beeld van de verschillende manieren waarop dieren gebruik maken van de fotoperiode. Tenslotte wil ik er nog op wijzen, dat er ook diersoorten zijn die bij de regulatie van hun voortplantingsseizoen geen, of nauwelijks gebruik maken van de fotoperiode. Dit betreft vaak dieren die in streken leven met afwisselend droge en natte seizoenen en die lijken te reageren op de regenval, hetzij direct, hetzij indirect via een reactie op wijzigingen die de regen in het milieu teweeg brengt.

Het is te hopen, dat dit hoofdstuk enig inzicht heeft gegeven in de ingewikkelde wijze waarop het endocriene systeem betrokken is bij de aanpassingen van een dier aan zijn milieu. Mogelijk echter zijn er bij de lezer meer vragen gerezen dan er beantwoord zijn. Indien dit zo is, dan heeft het verhaal, ook wat dit betreft, zijn doel bereikt.

Woord van dank

De auteur is veel dank verschuldigd aan alle tijdelijke en permanente medewerkers van haar werkgroep, m.n. aan drs. A.J.H. de Ruiter, drs. H. Slijkhuis en aan dr. S.E. Wendelaar Bonga voor hun stimulerende invloed op het onderzoek, voor hun eigen bijdrage daaraan en voor het kritisch lezen van het manuscript van deze voordracht.

Het werkingsmechanisme van peptidehormonen

J.W. Hekkelman

Inleiding

In de inleiding van Lever is reeds aangegeven tot welke typen van stoffen hormonen behoren. In dit hoofdstuk zullen we ons beperken tot de peptidehormonen die opgebouwd zijn uit ketens van aminozuren. Het is gebleken dat deze peptidehormonen in staat zijn fundamentele stofwisselingsprocessen te reguleren, maar ook bijvoorbeeld het leergedrag te beïnvloeden (zie daarvoor het hoofdstuk van Van Wimersma Greidanus). Een bekend voorbeeld van een peptidehormoon vormt het insuline, dat o.a. een belangrijke rol speelt bij de glucosestofwisseling. Dit hormoon bestaat in feite uit twee peptideketens die met zwavelbruggen aan elkaar verbonden zijn (figuur 1). Een ander voorbeeld vormt het bij schildklierhormoon of parathyreoïdhormoon (PTH) dat een belangrijke rol speelt in de calciumhuishouding en de stofwisseling van het botweefsel. Dit peptide is opgebouwd uit één enkele keten van 84 aminozuren (figuur 2). Het blijkt dat ook bepaalde fragmenten van dit molecuul als hormoon actief kunnen zijn. Vooral het fragment bestaande uit de aminozuren 1-34 gerekend vanaf de amino-kant blijkt interessante eigenschappen te bezitten waarop we later nog zullen terugko-

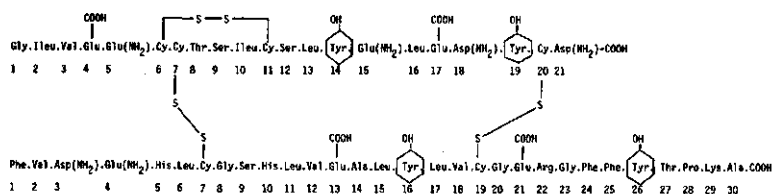


Fig. 1. Het insulinemolecuul opgebouwd uit twee aminozuurketens die verbonden zijn door zwavelbruggen.

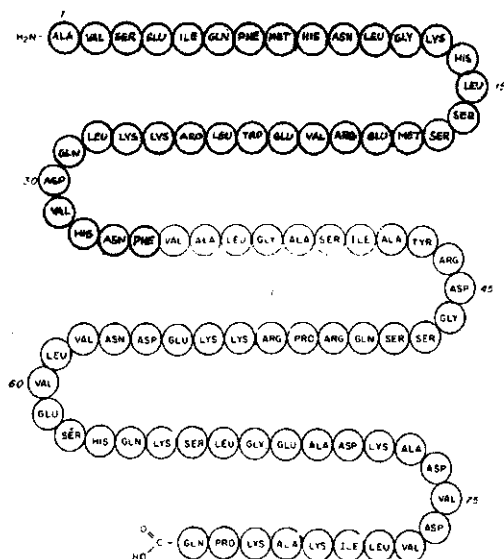


Fig. 2. Het molecuul van het runder parathyreoïdhormoon (PTH) bestaande uit één rechte keten van 84 aminozuren. Het donkere deel geeft het 1-34-fragment aan.

men. Een belangrijke groep peptidehormonen beïnvloedt de productie en uitscheiding van hormonen door endocriene klieren. Deze activiteiten zullen we hier buiten beschouwing laten en ons beperken tot de hormoonwerkingen waarbij een direct effect op de celstofwisseling wordt uitgeoefend.

Bij de synthese van de peptidehormonen ontstaat vaak in eerste instantie een langere peptideketen dan het uiteindelijk hormoon. Voor of tijdens de uitscheiding door de endocriene klier cel wordt dit voorstadium, aangeduid als prohormoon, gesplitst door een peptidase waarbij het eigenlijke hormoon gevormd wordt. Deze peptidasen zijn eiwit-splitsende enzymen met de bijzondere eigenschap dat zij slechts een bepaald gedeelte van het prohormoonmolecuul afsplitsen en het gevormde hormoon niet verder af breken. Via de bloedbaan wordt het hormoon door het organisme verspreid. De concentratie van een bepaald hormoon kan dus zowel via synthese als uitscheiding en transport worden gereguleerd. Deze besturing van de celstofwisseling zullen we

hier buiten beschouwing laten en ons beperken tot de effecten van hormonen op de hiervoor gevoelige cellen en weefsels. Deze laatste worden aangeduid als doelwit-weefsels en de hierin voorkomende gevoelige cellen als doelwit-cellten.

De vraag hoe het komt dat bepaalde celsoorten wel gevoelig zijn voor een hormoon en andere niet wordt verklaard door de aanwezigheid van receptoren voor dat hormoon in de gevoelige cel. Deze receptoren bestaan uit eiwitmoleculen of complexen die in staat zijn het hormoonmolecuul specifiek te binden. De reden waarom deze receptoren niet in alle celtypen voorkomen is nog onduidelijk, ons inzicht in het differentiatieproces van eicel tot de verschillende gespecialiseerde celtypen is ook hiervoor nog te beperkt.

Het eerste directe contact tussen hormoon en cel zal vanzelfsprekend plaatsvinden aan het celoppervlak, de receptor waaraan het hormoonmolecuul wordt gebonden zal dus vermoedelijk aan het celoppervlak zijn gelokaliseerd. In dit verband is het wellicht nodig er op te wijzen dat met de term hormoonreceptor niet altijd een bindingsplaats aan het oppervlak bedoeld wordt. Zo wordt bijvoorbeeld het in het cytoplasma voorkomende eiwit dat steroïdhormonen specifiek kan binden en een rol speelt bij het vervoer van het steroïd naar de celkern ook aangeduid met de term receptor. Met betrekking tot peptidehormonen beschikken we niet over aanwijzingen dat het hormoon in het inwendige van de cel wordt opgenomen. Momenteel wordt algemeen aangenomen dat de receptoren voor peptidehormonen altijd gelokaliseerd zijn aan het celoppervlak en op de een of andere wijze aan de celmembraan zijn gebonden.

Het effect van het hormoon komt tot stand doordat de binding van hormoon en receptor een verandering in de celmembraan teweegbrengt waardoor één of meer in de membraan gelokaliseerde enzymen worden geactiveerd. Het best bekende enzym in dit verband is het adenylcyclase dat de omzetting van ATP (adenosinetrifosfaat) in cAMP (cyclisch adenosinemonofosfaat) – ook aangeduid als 3', 5'-AMP – katalyseert (Robison et al., 1971). Een belangrijke rol van het cAMP is de activatie van proteïnekinases. Dit zijn enzymen die eiwitten fosforyleren en daardoor op hun beurt bepaalde enzymen activeren (Langan, 1973). Naast de activering van een membraangebonden enzym is het waarschijnlijk dat de hormoon-receptor-interactie tevens de permeabiliteit van de membraan verandert (Rasmussen et al., 1972). De gevolgen hiervan

voor de intracellulaire concentratie van ionen en voor de cel noodzakelijke verbindingen speelt eveneens een belangrijke rol in het werkingsmechanisme van het hormoon. De door de verschillende initiërende effecten veroorzaakte keten van interacties leidt tot het uiteindelijke hormooneffect. De verschillende fasen in het tot-stand-komen van dit effect op de celstofwisseling zullen achtereenvolgens worden besproken.

Hormoon-receptor-interactie

Celmembranen In 'Biomembranen' (Biologische Raad Reeks; Booy & Daems, 1976) wordt uitvoerig ingegaan op de huidige opvattingen over de structuur van de aan de buitenzijde van de cel gelegen membraan, de plasmamembraan. Om enigszins een beeld te kunnen krijgen van de structurele relatie tussen receptor en celmembraan is het nodig hier nog even kort op in te gaan. Volgens de in hoofdlijnen algemeen aanvaarde opvatting van Singer & Nicolson (1972) kan de uit een lipidedubbellaaag bestaande plasmamembraan opgevat worden als tweedimensionale vloeistof (figuur 3) waarin eiwitpartikels als het ware 'drijven'. Deze eiwitpartikels kunnen de kanalen bevatten voor het transport van stoffen en

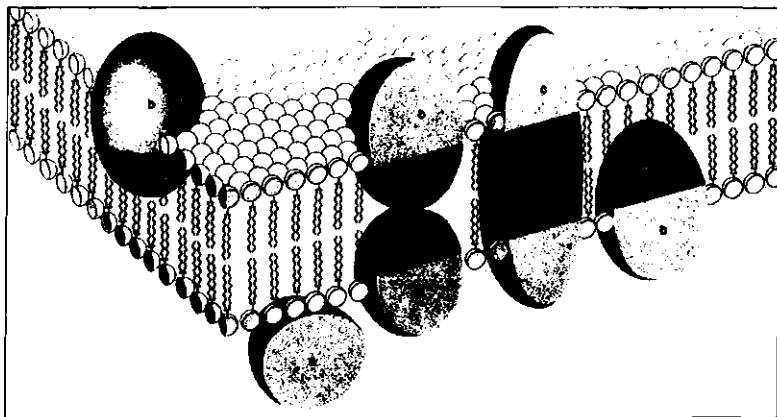


Fig. 3. Het dynamisch model van celmembranen. Eiwitpartikels kunnen op of bij het oppervlak liggen (a), gedeeltelijk in het membraan zijn opgenomen (b) of aan weerszijden naar buiten steken (c). (Uit: Capaldi, 1974.)

ionen door de membraan. Dit transport kan zowel passief, al of niet via een uitwisselingsmechanisme, als via een energie behoevend mechanisme verlopen. Deze laatste vorm wordt aangeduid als actief transport. Ook de receptoren van peptidehormonen worden gedacht op dergelijke partikels te zijn gelokaliseerd. Volgens dit beeld is het dus mogelijk dat zowel de receptoren als transportsystemen min of meer vrij beweeglijk in de celmembraan voorkomen.

Receptor-activatie Zoals in de inleiding van het hoofdstuk reeds is opgemerkt wordt thans algemeen aangenomen dat de receptoren voor peptidehormonen in de plasmamembraan zijn gelokaliseerd en dat voor het tot-stand-komen van het effect het hormoon niet in de cel behoeft te worden opgenomen. Deze opvatting steunt onder meer op bindingsstudies met radioactief gemerkte analoga, waaruit bleek dat de binding inderdaad aan het celoppervlak plaatsvindt. Een fraaie bevestiging van deze gedachtengang werd geleverd door de experimenten van Johnson et al. (1972), waarbij een peptidehormoon gebonden werd aan agarose, een onoplosbaar materiaal gebruikt in de chromatografie. Dit aan een onoplosbare drager gebonden hormoon bleek desalniettemin in staat te zijn een effect te induceren in intacte cellen. Dit kan alleen als de geactiveerde receptor aan het oppervlak van de cel is gelokaliseerd.

Uitgaande van het bovenbeschreven model van de celmembraan heeft Cuatrecasas (1974) een hypothese geformuleerd over de activatie van membraangebonden enzymen door de binding van het hormoon aan de receptor. Hierin wordt verondersteld dat de vrij in de membraan voorkomende receptor- en enzympartikels door de binding van het hormoon aan de receptor en de daarmee gepaard gaande structuurverandering zich tot een soort aggregaten verenigen waarbij een activatie van het enzym optreedt (figuur 4). Dit mechanisme houdt de mogelijkheid in dat verschillende receptoren, ieder specifiek voor een bepaald hormoon, toch hetzelfde enzym activeren. Volgens een dergelijk model behoeft een hormoon dat het adenylcyclase activeert niet over een specifiek bij zijn receptor behorend enzymesysteem te beschikken.

In het door Cuatrecasas gesuggereerde interactiesysteem wordt geen rekening gehouden met het optreden van een direct geïnduceerde verandering in de permeabiliteit van de celmembraan. Daar volgens het membraanmodel van Singer en Nicolson de permeabiliteit bepaald wordt door eiwitpartikels is het goed voorstelbaar dat een interactie optreedt

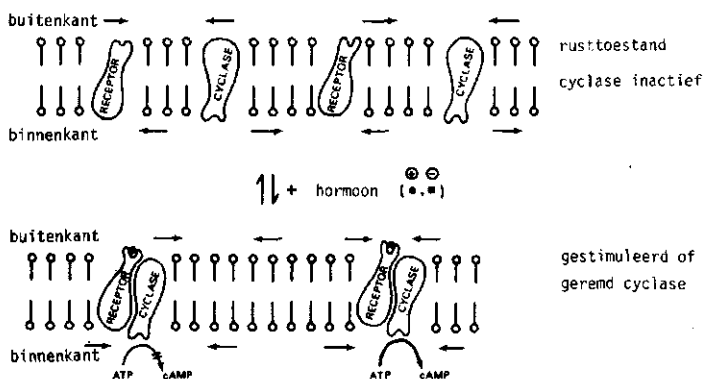


Fig. 4. Model voor de activatie van adenylyl cyclase door een hormoon-receptor-complex. (Uit Cuatrecasas, 1974.)

tussen deze transporteenheden en de geactiveerde receptor zoals dit ook voor de enzympartikels wordt verondersteld. De verandering in permeabiliteit die zowel betrekking kan hebben op passief als actief transport kan misschien veroorzaakt worden door een structuurverandering in het transportpartikel ontstaan door de binding met andere typen partikels.

Met de hier geschetste uitbreiding van het model van Cuatrecasas is het mogelijk een oppervlakkige verklaring te geven voor de door verschillende hormonen veroorzaakte activatie van één membraangebonden enzym en de min of meer gelijktijdig optredende veranderingen in de permeabiliteit van de celmembranen. Een probleem, bij deze interpretatie van de primair optredende hormooneffecten ligt nog in het feit dat niet uitgesloten kan worden dat beide typen effecten causaal zijn verbonden. Met andere woorden, het cAMP zou de permeabiliteitsverandering kunnen veroorzaken, of de veranderde ionensamenstelling zou juist de activatie van het adenylyl cyclase bewerkstelligen. Op grond van de gevonden geringe effecten van kationen op de genoemde enzymactivatie is de laatste mogelijkheid zeer onwaarschijnlijk. Wel is gebleken dat PTH een verlagend effect heeft op de membraanpotentialiaal (Mears, 1971) en dit elektrische verschijnsel kan heel goed de oorzaak zijn van de gestimuleerde productie van cAMP (Hekkelman et al., 1975). Een dergelijk verband hoeft echter niet in strijd te zijn met het geschetste model.

Cyclische nucleotiden als boodschappers

cAMP Zoals reeds in het voorgaande ter sprake is gekomen speelt het cAMP een belangrijke rol bij het tot-stand-komen van vele hormoneffecten. De ontdekking van deze verbinding en de waarneming dat de vorming hiervan het onmiddellijke resultaat is van de binding van sommige peptide- en andere hormonen aan hun receptoren is van doorslaggevende betekenis geweest voor de ontwikkeling van het huidige endocrinologisch onderzoek. Uitgaande van de gedachte dat een hormoon informatie overbrengt die moet leiden tot een verandering in de celstofwisseling beschouwden Sutherland en medewerkers (o.a. Robison et al., 1971) het hormoon als een eerste boodschapper van de noodzakelijke informatie. Het als een direct gevolg gevormde cAMP werd daarbij als de tweede boodschapper opgevat. Dit 'second messenger concept' werd gedacht van toepassing te zijn op een groot aantal hormonen en bijbehorende doelwit-weefsels. De stijging in de concentratie van het cAMP kan zeer aanzienlijk zijn, zo kan onder invloed van het PTH in vitro op een bepaald moment de concentratie in embryonaal botweefsel globaal toenemen van ca. 10 pmol mg^{-1} tot 80 of meer pmol mg^{-1} . Uit de rol bij de hormonale regulatie mag niet de conclusie worden getrokken dat dit de typische functie van het cAMP zou zijn. Deze verbinding komt behalve in zoogdieren, ook voor in lagere organismen zoals bacteriën en slijmschimmels en heeft daar duidelijk niet de functie van boodschapper in het tot-stand-komen van een hormoon effect (Konijn, 1974)!

De vorming van het cAMP wordt gekatalyseerd door het adenylcyclase via de reactie als weergegeven in figuur 5. Deze reactie is in principe omkeerbaar, maar gezien de ligging van het evenwicht heeft de terugreactie geen betekenis. Bovendien is de concentratie van het ATP in de cel minstens een factor 1000 hoger dan die voor het cAMP.

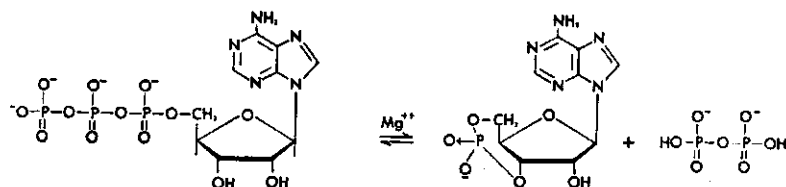


Fig. 5. De vorming van cAMP uit ATP door middel van het enzym adenylcyclase.

Magnesiumionen zijn noodzakelijk bij de reactie daar het substraat voor het enzym bestaat uit het Mg-ATP complex. In veel gevallen blijken calciumionen remmend te werken.

Hoewel het adenylcyclase door vele peptidehormonen wordt geactiveerd heeft bijvoorbeeld het insuline niet een dergelijk effect, dit hormoon lijkt juist het gehalte aan cAMP van zijn doelwit-weefsel te verlagen. Een mogelijke verklaring van een en ander zal in de volgende sectie worden besproken. Bij de activering van de productie van cAMP door hormonen blijkt ook het GTP (guanosinetrifosfaat) een rol te spelen (Bilezikian & Aurbach, 1974). Het door een hormoon geactiveerde enzym blijkt door de binding van GTP aan een bepaalde plaats op het enzym nog belangrijk in activiteit toe te nemen. Hierdoor is het ook omgekeerd mogelijk dat de vorming van cAMP vermindert doordat de toch al lage GTP concentratie in de cel afneemt. Dit kan het gevolg zijn van een stimulatie van de omzetting van GTP in cGMP (cyclisch-guansinemonofosfaat), een verbinding die veel lijkt op het cAMP. In figuur 6 is dit schematisch weergegeven.

De afbraak van het cAMP in de cel vindt plaats door enzymen aangeduid als cyclisch-nucleotidefosfodiesterasen. Hierdoor wordt de ringstructuur op de 3'-plaats gehydrolyseerd zodat 5'-AMP ontstaat (5'-adenosinemonofosfaat). De substraatspecificiteit is een kenmerkende eigenschap van sommige van deze enzymen, zo zijn er fosfodiesterasen met

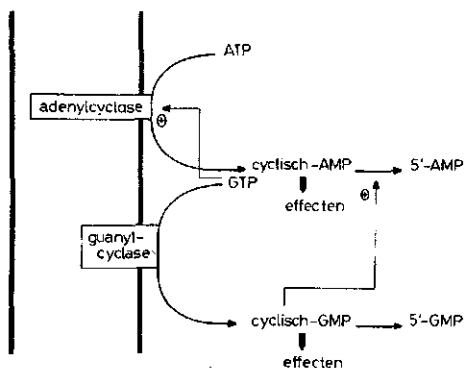


Fig. 6. De relatie van de concentraties van cAMP en cGMP via effecten op het adenylyl cyclase en het cyclisch-nucleotidefosfodiesterase.

een overwegende specificiteit voor cAMP terwijl andere juist de grootste activiteit vertonen met cGMP.

De cAMP fosfodiesterase-activiteit komt in vele celsoorten voor met twee verschillende affiniteiten voor het cAMP. De hieruit voortvloeiende verschillen in enzymactiviteit kunnen het best worden uitgedrukt in de concentratie van het substraat waarbij de helft van de maximale activiteit optreedt. Deze concentratie wordt de Michaelis-constante (K_m) genoemd. Naast deze verschillen in affiniteit wordt de enzymactiviteit vooral bepaald door het aantal katalytische eenheden, of wel de hoeveelheid enzymen. Beide factoren behoeven geenszins samen te gaan. Zo treedt in ons geval vaak een hoge activiteit op met een hoge K_m (ca. 10^{-4} mol l^{-1} , dus lage affiniteit) en een wat lagere activiteit met een kleine K_m (ca. 10^{-6} mol l^{-1} , dus hoge affiniteit). Ter verklaring van deze verschillen in activiteit wordt gedacht (Appleman et al., 1973) aan een regulatiemechanisme, waarbij door de binding van een cAMP-molecuul aan een plaats op het enzym, de affiniteit van een of meer andere bindingsplaatsen wordt veranderd. Op deze wijze is de afbraakcapaciteit aangepast aan de concentratie van het aanwezige cAMP. Bovendien is gevonden dat de activiteit met lage K_m uit hersenen (Kakiuchi et al., 1971) sterk gestimuleerd wordt door calciumionen met een maximum effect bij een concentratie van $10 \mu\text{mol } l^{-1}$. Het totale beeld van de activiteit van deze fosfodiesterasen wordt nog ingewikkelder doordat endogene activerende factoren eveneens een rol spelen. Ook de onderlinge relatie van cAMP en cGMP speelt hierbij waarschijnlijk een rol. Volgens Beavo et al. (1971) bevordert cGMP de hydrolyse van cAMP door een fosfodiesterase. Een duidelijk inzicht in de verschillende interacties en het tot-stand-komen van de uiteindelijke activiteit van het cyclisch-nucleotidfosfodiesterase ontbreekt echter nog.

cGMP Zoals reeds in de vorige sectie is aangeduid is het vooral het cGMP dat naast het cAMP de aandacht heeft getrokken als boodschapper of regulator bij de hormonale beïnvloeding van de celstofwisseling. Een overzicht van de rol van deze verbinding is gegeven door Goldberg et al. (1973). De concentratie van het cGMP verschilt sterk van celtype tot celtype en bedraagt in de orde van grootte van $0.3-0.03$ pmol mg^{-1} . Dit is aanzienlijk lager dan de concentratie van het cAMP (ca. 10 pmol mg^{-1}) hetgeen aanvankelijk bij de analyse grote moeilijkheden heeft opgeleverd.

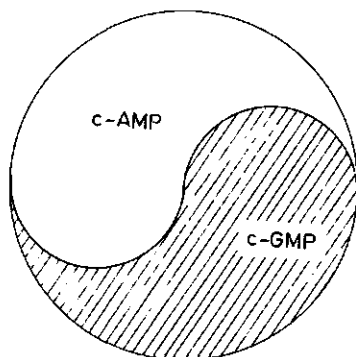


Fig. 7. Symbolische voorstelling van het door Goldberg gesuggereerde Yin Yang-principe met betrekking tot het dualisme tussen cAMP en cGMP.

Het is gebleken dat die peptidehormonen die in staat zijn het adenylcyclase te stimuleren geen effect hebben op het niveau van het cGMP. Omgekeerd heeft het insuline een verhogend effect op de concentratie van deze verbinding, terwijl dit hormoon juist geen, of een verlagend effect heeft op het cAMP. Deze en andere verschijnselen hebben Goldberg ertoe gebracht een dualisme te veronderstellen tussen beide cyclische nucleotiden. Hormonale antagonisten, zoals glucagon dat de afbraak van glucogeen (glycogenolyse) stimuleert en insuline dat juist de glycogeensynthese bevordert, zijn in deze gedachtengang werkzaam via respectievelijk het cAMP en het cGMP. Het dualisme in de werking van beide verbindingen zou dan de tegengestelde effecten van beide hormonen op de celstofwisseling veroorzaken. In bepaalde gevallen kunnen ze echter ook hetzelfde effect bewerkstelligen. Deze hypothese (Goldberg et al., 1975) die wordt aangeduid als het Yin Yang-principe (figuur 7), ontleend aan het Koreaanse dualisme van goed en kwaad, blijkt echter geen algemeen geldende regel te zijn. Desalniettemin is Goldberg's hypothese een belangrijke bijdrage aan het onderzoek naar het mechanisme van de hormonale regulatie die heeft geleid tot een helderder beeld van de verschillende interacties die een rol spelen bij de regulatieprocessen.

Proteïnekinasen

De vraag naar de functie van de cyclische nucleotiden in het hormonale regulatieproces is nog nauwelijks ter sprake gekomen. Zoals in de inleiding van het hoofdstuk al even is aangestipt, bestaat veruit de belangrijkste rol die momenteel bekend is uit de activatie van proteïnekinasen. Dit is een groep van enzymen die met behulp van ATP een fosfaat-groep bindt (fosforylatie) aan eiwitten, waaronder andere enzymen en daardoor activeert. Ook zijn gevallen bekend dat fosforylatie van een enzym juist leidt tot inactivatie. Het blijkt dat de van ATP afkomstige fosfaat-groep door het proteïnekinase in veruit de meeste gevallen gebonden wordt aan de OH-groep van serine uit het eiwitmolecuul. Hoewel proteïnekinasen bekend zijn die min of meer specifiek worden geactiveerd door cGMP of andere cyclische nucleotiden is veruit het meeste bekend van de door cAMP geactiveerde enzymen (Langan, 1973; Goldberg et al., 1973). Deze enzymen zijn in alle onderzochte dierlijke cellen aangetroffen. Het grootste deel van de activiteit wordt vrij in het cytoplasma gevonden, terwijl ook aan deeltjes en membranen gebonden proteïnekinase voorkomt.

In het bijzonder door het onderzoek van Krebs en medewerkers (o.a. Krebs, 1973) is komen vast te staan dat het door cAMP geactiveerde proteïnekinase een vrijwel algemeen voorkomend enzym is dat geen grote mate van substraat specificiteit vertoont. Zo is gebleken dat dit enzym in staat is histonen, basische eiwitten uit de celkern, te fosforyleren. Hoewel hierover nog geen duidelijk beeld bestaat lijkt het mogelijk dat langs deze weg het cAMP invloed kan hebben op de processen in de celkern, zoals de RNA-synthese. Het meest bekende en klassieke voorbeeld van de werking van het proteïnekinase is de stimulatie van de glycogenolyse door bepaalde hormonen waaronder het peptidehormoon glucagon.

Na de eerste stap, de door het hormoon geïnduceerde stijging van het cAMP-gehalte, treedt een activatie op van het proteïnekinase. Door Brostrom et al. (1970) is een mechanisme voor deze activatie voorgesteld dat toegepast kon worden op resultaten van een aantal andere onderzoekers. Hierbij wordt verondersteld dat het proteïnekinase bestaat uit twee sub-eenheden, een regulerend (R) en een katalytisch (C) deel. Door de binding van het regulerende deel aan cAMP komt het katalytische deel vrij waardoor het geactiveerd wordt. In formule:

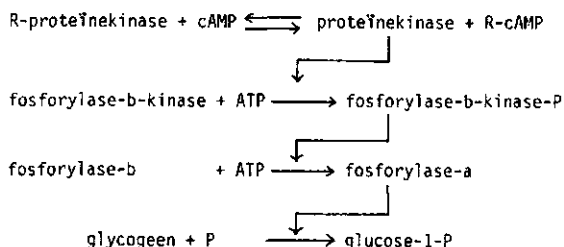
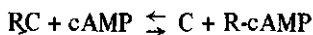


Fig. 8. De cascade van reacties die leidt tot de stimulatie van de glycogenolyse via een indirecte activatie van het fosforylase door cAMP.



waarbij RC het inactieve, en C het actieve enzym voorstelt.

Uit een uitgebreid onderzoek dat in eerste instantie is uitgevoerd met extracten van spierweefsel bleek dat het geactiveerde proteïnekinase — ook wel fosforylasekinase-kinase genoemd — het fosforylase-kinase fosforyleert en hiermee dit enzym activeert (figuur 8). Het fosforylasekinase is nu in staat het inactieve fosforylase b te fosforyleren tot het actieve fosforylase a dat in staat is de omzetting van glycogeen met fosfaat in glucose-1-P te bewerkstelligen.

De stimulatie van de glycogeenaafbraak langs deze weg wordt nog versterkt doordat het geactiveerde proteïnekinase bovendien een enzym fosforyleert dat betrokken is bij de synthese van het glycogeen, het glycogeensynthetase (figuur 9). Het merkwaardige is nu dat dit enzym juist in de gefosforyleerde vorm inactief is en actief in de niet-gefosforyleerde vorm! Naast de stimulatie van de glycogeenaafbraak treedt dus ook een remming van de glycogeensynthese op, en wel dank zij hetzelfde type mechanisme. Er bestaan sterke aanwijzingen (Krebs, 1973) dat

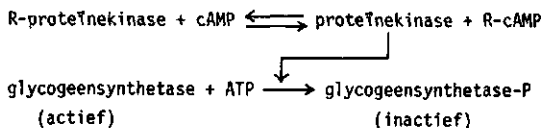


Fig. 9. De remming van de glycogeenvorming als gevolg van inactivatie van het glycogeensynthetase door cAMP.

in beide gevallen sprake is van hetzelfde proteïnekinase.

De door cGMP geactiveerde proteïnekinase wordt gezien als activator van proteïnefosfatasen (Goldberg et al., 1973) waardoor gefosforyleerde enzymen kunnen worden gedefosforyleerd. De consequentie hiervan kan zijn een afname van activiteit, zoals bij de glycogenolyse, of juist een activering zoals bij de glycogeen synthese. Er wordt echter sterk getwijfeld aan de veronderstelling dat alle effecten van het cGMP tot stand zouden komen via de activatie van een proteïnekinase. In celvrije systemen is namelijk aangetoond dat cGMP het cyclisch-nucleotidofosfodiesterase stimuleert (Beavo et al., 1971) zonder dat hierbij ATP als fosfaatdonor nodig is.

Het probleem van de specificiteit van de proteïnekinasen voor bepaalde substraten is nog niet opgelost. De in de nabijheid van het te fosforyleren serine aanwezige aminozuren blijken niet van belang te zijn voor de activiteit, het enzym herkent dus de primaire structuur van het proteïnesubstraat niet. Mogelijk wordt een bepaalde driedimensionale configuratie wel herkend. Dit zou bovendien het ontbreken van specificiteit in vitro kunnen verklaren daar onder deze omstandigheden de eiwitmoleculen veel flexibeler zullen zijn dan in de intacte cel.

In de synaptische membraanfractie bereid uit hersenweefsel blijkt een eiwit voor te komen dat, in tegenstelling tot de grote hoeveelheid andere eiwitten die in deze fractie aanwezig zijn, door het cAMP afhankelijke proteïnekinase wordt gefosforyleerd. De fosforylatie van lever-plasmamembraaneiwwitten echter lijkt onafhankelijk van het cAMP te verlopen. Het is daarom nog een open vraag of de door peptidehormonen geïnduceerde permeabiliteitsveranderingen van de plasmamembraan in het algemeen tot stand komen via een fosforylatie door een cAMP-afhankelijk proteïnekinase.

Calciumionen als boodschapper

De intracellulaire calciumionen-concentratie blijkt een belangrijke rol te spelen in de regulatie van de celstofwisseling (Rasmussen et al., 1975). De concentratie van calciumionen in het vrije cytoplasma bedraagt 10^{-7} à 10^{-6} mol l^{-1} , terwijl de concentratie in de extracellulaire vloeistof in de orde van 10^{-3} mol l^{-1} is. Een kleine wijziging in het calciumtransport in en uit de cel zal dus reeds een belangrijke procentuele wijziging in de intracellulaire concentratie kunnen veroorzaken. Hierbij moeten we wel

bedenken dat de mitochondriën als een soort calciumopslagplaats fungeren, zodat ook het transport naar en van deze subcellulaire deeltjes een rol speelt in het evenwicht dat de cytoplasmatische calciumconcentratie bepaalt. Vrij algemeen wordt aangenomen dat bepaalde peptidehormonen zoals het PTH en het calcitonine een effect hebben op de calciumconcentratie in de cel via een effect op het transport van calcium in en uit de cel. Hoe deze effecten op het calciumtransport tot stand komen is nog geheel onduidelijk. De stijging van het intracellulaire calcium onder invloed van PTH wordt waarschijnlijk veroorzaakt door een toename van het passieve transport naar binnen van calciumionen. Mogelijk komt dit effect tot stand door een configuratieverandering door een aggregatie van de in de celmembraan aanwezige transportpartikels en receptorpartikels zoals in het voorgaande is besproken. Effecten van peptidehormonen op transportsystemen via een fosforylatie door een cAMP afhankelijk proteïnekinase zijn nog niet aangetoond hoewel een dergelijk mechanisme niet onwaarschijnlijk lijkt.

Uit het aangehaalde overzicht van Rasmussen blijkt dat vele effecten op de celstofwisseling tot stand komen via een verhoogde intracellulaire calciumconcentratie. Deze en andere auteurs zijn daarom van mening dat de calciumconcentratie evenals het cAMP als een soort tweede boodschapper beschouwd moet worden. De calciumionenconcentratie blijkt een direct effect op de cAMP stofwisseling te hebben doordat het adenylcyclase in veel gevallen geremd wordt door calciumionen, terwijl sommige cyclisch-nucleotidefosfodiesterasen juist door calciumionen worden geactiveerd. De voor deze effecten benodigde calciumconcentraties liggen juist in het gebied van $10^{-6} - 10^{-7}$ mol l^{-1} waarbinnen de hormonaal-geïnduceerde stijgingen van de intracellulaire concentraties plaatsvinden. Ook de effecten van het cGMP blijken in belangrijke mate afhankelijk te zijn van de calciumconcentratie. De verschillende interacties zijn nog dermate onoverzichtelijk dat nog geen kwalitatief overzicht mogelijk is, laat staan een kwantitatieve analyse van de onderlinge beïnvloeding van cAMP, cGMP en de calciumionenconcentratie. Toch is de ontrafeling van dit uiterst complexe geheel een voorwaarde om het tot-stand-komen van hormooneffecten te kunnen begrijpen.

Een probleem bij de bestudering van het mechanisme van de hormonale regulatie wordt gevormd door het ontbreken van gegevens over de werkelijke calciumconcentratie in het cytoplasma en subcellulaire deeltjes. Naast het feit dat een onbekend groot deel van het calcium gebon-

den zal zijn aan celbestanddelen, ontbreken gegevens over de fysisch-chemische activiteitscoëfficiënt van het calcium binnen de cel.

Een benadering van het probleem van de invloed van de calciumconcentratie op de stofwisselingsprocessen is mogelijk door langs kunstmatige weg de intracellulaire concentratie te variëren en na te gaan tot welke effecten dit aanleiding geeft. Een mogelijkheid hiertoe is het gebruik van remmers van het calciumtransport zoals lanthaanionen en het verapamil, ook wel isoptin genoemd. Een probleem hierbij is de niet geheel specifieke werking van deze stoffen, het is zeer waarschijnlijk dat behalve de blokkering van de permeabiliteit van de celmembraan voor calcium ook nog andere effecten optreden. Een andere aanpak van het probleem is het gebruik van stoffen die min of meer specifiek de celmembraan doorlaatbaar maken voor calciumionen. Een dergelijke stof wordt aangeduid als een calciumionofoor.

Voor het inzicht in het werkingsmechanisme van een hormoon is het van belang te weten via welke 'tweede boodschapper' een bepaald effect tot stand komt. Een voorbeeld van een dergelijk probleem vormde de vraag of de door PTH geïnduceerde stijging van de lactaatproductie van embryonaal botweefsel veroorzaakt wordt door de gestegen intracellulaire concentraties van cAMP, van calcium, of van beide (Hekkelman & Herrmann-Erlee, 1976). Door gebruik te maken van een remstof voor het cyclisch-nucleotidefosfodiesterase bleek het mogelijk het cAMP-gehalte te verhogen, hetgeen inderdaad aanleiding gaf tot een verhoogde lactaatproductie. Een verhoging van de intracellulaire calciumconcentratie door een calciumionofoor gaf echter aanleiding tot eenzelfde soort effect. Beide effecten bleken min of meer additief te zijn, zodat geconcludeerd moet worden dat het betrokken effect van het PTH tot stand komt via beide 'tweede boodschappers'.

Hormoonfragmenten

De peptidehormonen onderscheiden zich van andere hormonen doordat het molecuul bestaat uit een keten van aminozuren, terwijl andere groepen van hormonen in het algemeen kleiner zijn en niet zijn opgebouwd uit duidelijk onderscheidbare bouwstenen. Dit heeft tot gevolg dat bij de peptidehormonen zich de vraag voordoet of het hele hormoon noodzakelijk is voor de biologische activiteit of dat dit slechts met bepaalde gedeelten van het molecuul het geval is. Het is niet goed voor te stellen

dat een keten van bijvoorbeeld 84 aminozuren in zijn geheel aan een receptor gebonden zou worden. De huidige mogelijkheden om langs synthetische weg vrijwel ieder gewenst fragment van een peptidehormoon-molecuul te verkrijgen hebben een doorbraak betekend voor het onderzoek in deze richting. Uit onderzoek met op deze wijze verkregen gedeelten van hormoonmoleculen is gebleken dat niet alleen bepaalde fragmenten fysiologische activiteit bezitten, maar bovendien dat het effect van een fragment enigszins anders kan zijn dan van het intacte molecuul. In het hoofdstuk van Van Wimersma Greidanus zijn verschillende voorbeelden te vinden van dergelijke brokstukken waarbij in een enkel geval een keten van slechts vier aminozuren reeds activiteit vertoont.

Het bovenstaande wordt geïllustreerd aan de hand van werk uit ons laboratorium met betrekking tot het PTH. Het blijkt dat van dit uit 84 aminozuren bestaande hormoon het fragment bestaande uit de aminozuren 1-34, gerekend vanaf het vrije amino-uiteinde van de keten, ongeveer dezelfde effecten heeft als het intacte molecuul op de stofwisseling van embryonaal botweefsel (Herrmann-Erlee et al., 1976). Uit kweekexperimenten van Gaillard et al. (1977) met spaakbeentjes van 15-dagen-oude muize-embryo's bleek (figuur 10) dat PTH 1-34 in een concentratie van $5 \times 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ na 48 uur een resorptie van de been-

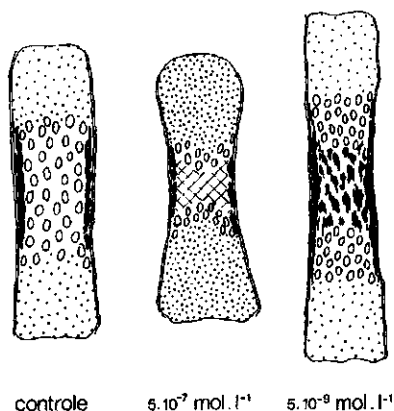


Fig. 10. Schematische voorstelling van spaakbeentjes van 15-dagen-oude muize-embryonen die gedurende 48 uur zijn gekweekt met de aangegeven concentraties PTH 1-34. (Uit Gaillard et al., 1977.)

koker veroorzaakt. Het histologisch beeld lijkt sprekend op het effect van het intacte PTH-molecuul na dezelfde kweekduur. Indien echter een concentratie van het 1-34-fragment van 5×10^{-9} mol l⁻¹ wordt gebruikt, blijkt o.a. botnieuwvorming op te treden, terwijl in plaats van remming van de ontwikkeling van het pijpbeentje juist stimulatie lijkt plaats te vinden. Het blijft een open vraag hoe het mogelijk is dat een 100 maal lagere concentratie van het 1-34-fragment een omgekeerd effect bewerkstelligt.

De hier vermelde resultaten van experimenten in vitro kunnen van grote betekenis zijn voor ons inzicht in de regulatie bij het intacte organisme. Het is namelijk zeer waarschijnlijk dat in de bloedbaan ook verschillende hormoonfragmenten voorkomen, terwijl de gebruikte lage concentratie niet veel verschilt van de vermoedelijke fysiologische concentratie. Dit leidt tot de veronderstelling dat het PTH via een actief fragment, in tegenstelling tot de gangbare opvatting, juist een bevorderend effect op de ontwikkeling van het pijpbeentje heeft (Parsons, 1976).

Deze nieuwe zienswijze kan van grote betekenis zijn voor de behandeling van bepaalde botziekten. Vele van deze aandoeningen gaan gepaard met een voortschrijdende ontkalking en structuurverlies van het beenweefsel. Momenteel wordt naarstig gezocht naar goede behandelingsmethoden waarbij ook aandacht wordt besteed aan een mogelijk gebruik voor dit doel van synthetische fragmenten van het PTH.

Een vergelijkbaar onderzoek aan hormoonfragmenten wordt beschreven in het hoofdstuk van Van Wimersma Greidanus. In het hoofdstuk van Gaillard wordt hier nog op teruggekomen.

Werkingsmechanisme van peptidehormonen

In het voorgaande zijn verschillende aspecten van het werkingsmechanisme van peptidehormonen ter sprake gekomen waarbij op vele vragen nog geen antwoord mogelijk bleek te zijn. In deze sectie zal een overzicht van de verschillende problemen worden gegeven terwijl we op enkele aspecten nog nader zullen ingaan.

Een van de onduidelijkheden is de vraag of er eigenlijk een kenmerkend verschil in werking bestaat tussen de peptidehormonen en andere hormonen. Zo hebben we gezien dat het peptidehormoon glucagon via het cAMP in staat is de glycolyse te activeren. Op dezelfde wijze is

echter ook het adrenaline in staat dit proces te activeren. Dit brengt ons tot de voorzichtige conclusie dat (1) de specificiteit niet zit in het mechnisme van het regulatieproces, maar (2) in de al of niet aanwezigheid en de aard van de receptor. Waarschijnlijk zullen de configuratieveranderingen in de celmembraan en dus de effecten op transportsystemen veel meer op specifieke wijze van het betrokken hormoon-receptor-complex afhangen dan de door cAMP, cGMP of de veranderde intracellulaire calciumconcentratie veroorzaakte secundaire effecten (3). Deze zijn vooral bepaald door het metabole apparaat dat in de cel beschikbaar is en dus door type en toestand van de cel.

De wijze waarop de uiteindelijke hormoneffecten tot stand komen en de vraag of dit al of niet via het cAMP, het cGMP of de intracellulaire calciumconcentratie plaatsvindt is voor het grootste deel nog onbekend. Een schema van de eerste fasen van het regulatiemechanisme is weergegeven in figuur 11. Het gearceerde driehoekje hierin geeft de interacties aan van het intracellulaire cAMP, cGMP en calcium die voor een belangrijk deel bepalend zijn voor het uiteindelijke effect. Het relatieve belang van ieder van deze 'tweede boodschappers' wordt uiteraard bepaald door het hormoon, de eigenschappen van de receptor en het

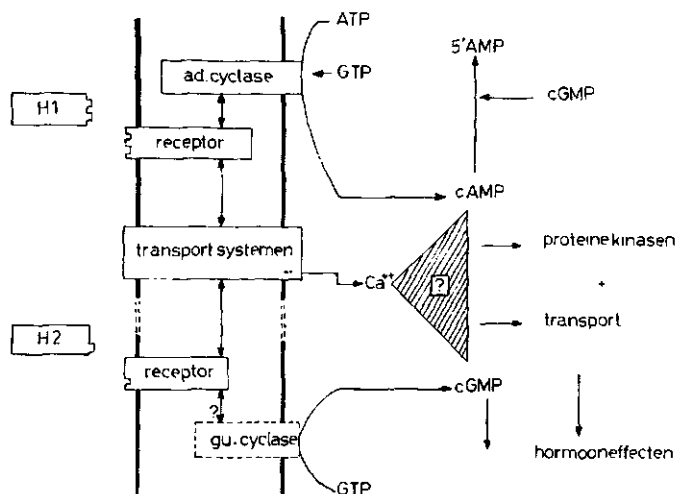


Fig. 11. Schematisch overzicht van het werkingsmechanisme van de hormonen aangeduid met H1 en H2 op een doelwit-cel.

type cel. De vraag of de veranderingen in het membraantransport ook van de genoemde drie factoren afhangen is nog open, een onafhankelijk effect via configuratieveranderingen in de membraan moet zeker niet uitgesloten worden geacht.

De later optredende effecten als gevolg van de activatie van proteïnekinasen en de veranderde calciumionen- en metabolietenconcentratie zullen voor een belangrijk deel veroorzaakt worden door de hierdoor teweeggebrachte veranderingen in RNA- en eiwitsynthese. De veelvuldig waargenomen fosforylatie van histonen uit de kern door een cAMP afhankelijk proteïnekinase wijst duidelijk in deze richting.

Tenslotte moeten we vaststellen dat, alhoewel verschillende hormonaal beïnvloedbare regulerende factoren van de celstofwisseling bekend zijn, nog vrijwel geen gegevens beschikbaar zijn over de kwantitatieve aspecten van de variaties van de diverse parameters. Vooral met betrekking tot de gedeelten van de regulatieketen tussen 'tweede boodschappers' en het morfologisch waarneembare resultaat is nog weinig bekend. Toch is het juist deze fase in het werkingsmechanisme die bepalend is voor de typische eind-effecten van de interactie van hormonen en cellen. De opheldering van deze problemen kan op velerlei gebied en niveau van doorslaggevende betekenis zijn.

Het werkingsmechanisme van steroidhormonen

H.J. van der Molen, W.M.O. van Beurden, W. de Boer en E. Mulder

Inleiding

Het onderzoek naar het biochemisch mechanisme van de werking van hormonen probeert in moleculaire termen een verklaring te geven voor de fysiologisch en klinisch waargenomen effecten van hormonen. Voor wat betreft de steroidhormonen leidt dit tot de intrigerende vraag hoe een klein aantal, relatief eenvoudige en structureel verwante verbindingen (zoals testosteron, progesteron, oestradiol, ecdyson, aldosteron, cortisol) een groot aantal uiteenlopende effecten kan veroorzaken of processen beïnvloeden.

Oestradiol beïnvloedt o.a.:

- ontwikkeling van vrouwelijke geslachtsorganen en mammae
- oestrus en menstruele cyclus
- gonadotrofine secretie
- lipiden, lipoproteïnen in bloed
- eiwitsynthese in de lever
- botresorptie
- vloeistofretentie

Testosteron beïnvloedt o.a.:

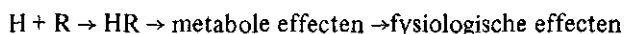
- differentiatie van mannelijke geslachtsorganen
- ontwikkeling van secundaire geslachtskenmerken
- spermatogenese
- stikstofretentie (anabole werking)

Welke factoren of mechanismen zijn verantwoordelijk voor de specifieke werking van een steroidhormoon en waarom veroorzaken steroidhormonen slechts een specifiek effect in enkele organen ('doelwit-organen'), terwijl ze algemeen in de circulatie aanwezig zijn?

De ontwikkeling van het inzicht in de moleculaire aspecten van het werkingsmechanisme van steroidhormonen op subcellulair niveau is in

belangrijke mate gestimuleerd door de waarnemingen van Karlson over het ontstaan van 'puffs' (lokale verdikkingen) in reuzechromosomen van insektelarven onder invloed van ecdyson, door de theorie van Jacob & Monod (1961) over de genetische regulatie van de eiwitsynthese en door de waarnemingen van Jensen (Jensen & Jacobsen, 1962; Jensen & DeSombre, 1972) over de specifieke retentie van (radioactieve) oestrogenen in oestrogeen-gevoelige cellen. Karlson (1963) postuleerde dat het ecdyson – en andere hormonen met een vergelijkbaar werkingsmechanisme – in eerste instantie een effect hebben op het genoom (chromosomaal DNA) en via de synthese van mRNA (messenger-RNA of boodschapper-RNA) de synthese van eiwitten (onder andere enzymeiwitten) stimuleert, terwijl Jensen postuleerde dat de biologisch actieve steroïden specifiek gebonden werden door steroïd-gevoelige cellen of organen. Op grond van deze waarnemingen is sinds de zestiger jaren voor alle steroïdhormonen naarstig gezocht naar subcellulaire bindingsplaatsen ('receptoren') en naar effecten op transcriptie- en translatiemechanismen bij de regulatie van eiwitsynthese.

Als werkhypothese bij het onderzoek naar een mogelijke verklaring voor de uiteenlopende specifieke effecten van hormonen is dan ook dikwijls verondersteld – en in een groot aantal gevallen bewezen – dat een hormoon (H) in het doelwit-orgaan een 'hormoon-receptor-complex' (HR) vormt dat verantwoordelijk is voor de reacties (R) op intracellulair niveau (bijvoorbeeld de eiwitsynthese), die uiteindelijk resulteren in de waargenomen fysiologische effecten (bijvoorbeeld van verandering in weefselgroei of baardgroei):



Naast inzicht in de moleculaire processen die verantwoordelijk zijn voor het effect van een hormoon in de hormoongevoelige cellen en organen (de doelwit-organen), is voor een goed begrip van de werking van hormonen in het intacte organisme informatie nodig over processen die het hormoon beïnvloeden, alvorens het de hormoongevoelige cel bewerkt. Dit betreft met name de produktie en secretie van het hormoon (of eventuele pro-hormonen) door de endocriene organen, het transport in lichaamsvloeistoffen (al of niet gebonden aan transporteiwitten) en het metabolisme van het biologisch actieve hormoon.

Voor diverse steroïdhormonen (oestrogenen, testosteron, corticosteroïden, progesteron) is gebleken, dat het fysiologisch effect in een

doelwit-orgaan (zoals uterus, prostaat, oviduct) correleert met een specifieke openvolging van gebeurtenissen in de cel, waarbij:

- het steroïd wordt gebonden aan een specifiek receptoreiwit in het cytoplasma van de doelwit-cel, gevolgd door
- transport van het steroïd-receptor-complex naar de celkern, waarbij
- een getransformeerd steroïd-receptor-complex wordt gebonden door acceptorplaatsen op het genoom, hetgeen resulteert in
- de activering van de DNA → RNA-transcriptie waarbij in de celkern onder andere specifieke mRNA's worden gesynthetiseerd, welke
- getransporteerd worden naar de ribosomen in het cytoplasma en via translatie de synthese van nieuwe eiwitten veroorzaken, waarbij tenslotte
- deze eiwitten (als enzymen of structureel eiwit) de karakteristieke respons van het doelwit-orgaan vormen (o.a. O'Malley & Means, 1974; Tata, 1976).

Uit de beschikbare informatie is gebleken, dat specifieke effecten van steroïdhormonen afhankelijk zijn van de synthese van specifieke RNA's in de kern. De specificiteit van de interactie van steroïden wordt waarschijnlijk in belangrijke mate bepaald door de specificiteit van de intracellulaire receptoren welke slechts met één (of enkele) steroïd(en) een complex kunnen vormen en door de specificiteit van de interactie tussen het steroïd-receptor-complex en het genoom. Hoofdzakelijk op grond van de aanwezigheid van specifieke receptoren in cytoplasma en kernen en door de stimulatie van de synthese van specifiek mRNA onder invloed van de steroïden of de steroïd-receptor-complexen, bestaan voor diverse steroïdhormonen aanwijzingen dat hun fysiologische werking volgens het beschreven model kan worden verklaard. Slechts voor een zeer beperkt aantal, voor het merendeel niet-fysiologische modelsystemen zijn meer gegevens bekend over de details van de verschillende processen. Speciaal de informatie over de aard en de specificiteit van de interacties tussen steroïden en/of receptoren en het genoom is nog zeer beperkt.

De effecten van ecdyson op de activiteit van het genoom heeft weliswaar belangrijk bijgedragen aan het doorgronden van het moleculaire werkingsmechanisme van steroïdhormonen, maar het inzicht in het moleculaire mechanisme van dit effect is nog zeer beperkt. De moleculaire interacties bij het werkingsmechanisme van hormonen zijn uitvoerig bestudeerd. Dit zijn o.a. het effect van oestradiol op de inductie van een

specifiek eiwit (ovalbumine) in de eileider van vogels (Schimke et al., 1975), het effect van oestradiol op de inductie van het eiwit vitellogeneine in de eileider of lever van vogels (Gruber et al., 1976) of in *Xenopus* (Tata, 1976), het effect van progesteron op de synthese van het eiwit avidine in de eileider van vogels (O'Malley et al., 1969), het effect van androgenen op de prostaat (Davies & Griffiths, 1976) en de effecten van corticosteroiden op de inductie van diverse enzymen in lever en hepatomacellen (Baxter & Tomkins, 1971; Feigelson et al., 1975). De interesse in deze effecten is ten dele te verklaren doordat in diverse van deze systemen steroiden kwantitatief belangrijke effecten veroorzaken, die goede mogelijkheden bieden voor een experimentele benadering.

Bij het onderzoek over moleculaire mechanismen die verantwoordelijk zouden kunnen zijn voor de uiteindelijke effecten van hormonen, heeft men meestal eerst gezocht naar correlaties tussen de na toediening van hormoon in vivo waargenomen effecten en de aanwezigheid of verandering van specifieke verbindingen (zoals receptoren, specifieke mRNA's en eiwitten) en/of enzymactiviteiten (bijvoorbeeld RNA-polymerasen en enzymactiviteiten betrokken bij de eiwitsynthese). Na het aantonen van bepaalde correlaties heeft men aansluitend meestal geprobeerd om onder omstandigheden in vitro met behulp van de geïsoleerde componenten het effect van het hormoon na te bootsen.

In het navolgende zal nader worden ingegaan op een aantal van de bovenbeschreven, algemeen belangrijke, met de effecten van steroidhormonen gecorreleerde parameters. Hierbij wordt zoveel mogelijk naar overzichtsartikelen verwezen. Meer gedetailleerde toelichtingen zijn hoofdzakelijk ontleend aan de resultaten van de groep van O'Malley over de inductie van eiwitten in de oviduct van kippen onder invloed van oestradiol en/of progesteron. Belangrijke parameters bij het werkingsmechanisme van steroidhormonen op moleculair niveau zijn:

- steroiden
- receptoren
- steroid-receptor-complex in cytoplasma
- steroid-receptor-complex in celkernen
- effecten op DNA en/of chromatine
- effecten op RNA polymerase
- inductie van specifieke mRNA
- inductie van specifiek eiwit
- fysiologisch effect

Receptoren

De in een organisme aanwezige steroidhormonen zijn buiten de specifieke doelwit-organen (zoals in het bloed) meestal gebonden aan eiwitten. Deze binding is dikwijls niet erg specifiek, d.w.z. verscheidene steroiden met een verschillende structuur kunnen door eenzelfde eiwit, zoals albumine, gebonden worden (King & Mainwaring, 1974). Tevens is de affiniteit van deze eiwitten voor steroiden niet erg hoog (associatieconstante $K_a = \text{ca. } 10^5 \text{ mol l}^{-1}$). Naast deze aspecifieke binding door extracellulaire eiwitten komen bij de meeste diersoorten in de bloedcirculatie ook meer specifieke steroid-bindende eiwitten voor. Dit zijn meestal globulines, zoals het corticosteroid-bindend globuline (CBG) en het sexhormoon-bindend globuline (SHBG) dat oestrogenen en androgenen kan binden, die beide door hun grote affiniteit ($K_a = \text{ca. } 10^8 \text{ mol l}^{-1}$) een belangrijk deel van de circulerende steroidhormonen kunnen binden.

Intracellulaire binding van steroiden kan ook voor een belangrijk deel verklaard worden op grond van binding aan aspecifieke eiwitten. Uit diverse experimenten is echter gebleken, dat steroiden in organen waarop ze een specifieke hormoonwerking uitoefenen, tevens met een grote affiniteit ($K_a = \text{ca. } 10^9\text{-}10^{10} \text{ mol l}^{-1}$) gebonden kunnen worden aan specifiek bindende eiwitten, de receptoren. Deze receptoren voor steroiden zijn aangetoond in en geïsoleerd uit zowel het cytoplasma als de celkernen; dit in tegenstelling tot de receptoren voor eiwithormonen, die hoofdzakelijk gelokaliseerd zijn in de celmembraan aan de buitenkant van de cellen.

De eerste aanwijzingen voor het bestaan van intracellulaire receptoren werden verkregen door Jensen, die waarnam dat na injectie van radioactief oestradiol de retentie van radioactiviteit in doelwit-organen van oestradiol, zoals uterus en vagina, veel groter was dan in andere organen. Na incubatie van de cytosolfractie van oestrogeen-gevoelige organen met radioactief oestradiol kon na ultracentrifugatie met behulp van sucrosegradiënten een oestradiol-eiwit (receptor)-complex aangetoond worden met een sedimentatiecoëfficiënt van 9,5 S (Toft & Gorski, 1966) ($1 \text{ S (Svedberg)} = 10^{-13} \text{ s}$). In aansluiting op het aantonen van een oestradiolreceptor uit het cytoplasma van diverse oestradiolgevoelige weefsels zijn ook voor diverse andere steroiden soortgelijke receptoren gevonden (Baxter & Tomkins, 1971). 'Receptoren' onder-

scheiden zich o.a. door de volgende karakteristieke eigenschappen van andere niet-specifieke steroid-bindende eiwitten (Baulieu et al., 1971):

- Receptoren hebben een hoge affiniteit voor steroiden (associatie-constanten liggen in de orde van 10^9 - 10^{10} mol l^{-1}).

- Receptoren tonen een hoge specificiteit voor binding van steroiden. Slechts een enkel of een klein aantal steroiden met vergelijkbare biologische activiteiten wordt door eenzelfde receptor gebonden.

- Receptoren komen (nagenoeg) uitsluitend voor in steroid-gevoelige weefsels, terwijl zij meestal ontbreken in weefsels die niet beïnvloed worden door steroiden.

- Er is slechts een beperkt aantal receptormoleculen aanwezig per cel.

Op grond van deze criteria zijn bijvoorbeeld oestradiolreceptoren bij de rat aangetoond in de uterus, vagina, borstklier, hypothalamus en hypofyse (Baulieu et al., 1971), maar niet in longweefsel of in de milt.

Indien de endogene oestradiolconcentratie laag is, kunnen (onbezette) oestradiolreceptoren eenvoudig worden aangetoond in het cytoplasma van de uterus. Met behulp van autoradiografie heeft men na injectie van radioactieve steroiden echter gevonden, dat diverse steroiden preferent gelokaliseerd zijn in de celkernen. Na injectie van oestradiol of na incubatie van uterusweefsel met oestradiol blijkt een ophoping van receptoren plaats te vinden in de celkernen, terwijl gelijktijdig het aantal receptorplaatsen in het cytoplasma daalt (Jensen & DeSombre, 1972; Williams & Gorski, 1972). Op grond van dergelijke waarnemingen heeft men verondersteld dat binding van steroiden door celkernen slechts kan plaatsvinden nadat het steroid eerst is gebonden aan een receptor in het cytoplasma. Deze hypothese werd gesteund door de waarneming dat na incubatie van geïsoleerde kernen met 3H -oestradiol geen steroid-receptor-complex in de kernen kon worden aangetoond, terwijl dit wel het geval was, indien het steroid en de kernfractie werden geïncubeerd in aanwezigheid van een cytosolfraction. Het mogelijke belang van het aan kernen gebonden steroid-receptor-complex wordt geïllustreerd door de recente resultaten van Clark & Peck (1976) en Gswendt (1976). Na extractie van de aan kernen gebonden steroid-receptor-complexen met behulp van $0,4$ mol l^{-1} KCl bleek de niet-extraheerbare fractie van het steroid-receptor-complex welke in de kernen achterbleef goed te correleren met het fysiologisch effect van het steroid.

De rol van RNA-synthese

In nagenoeg alle bestudeerde modelsystemen blijken de effecten van steroïdhormonen gepaard te gaan met een toename van de RNA synthese in de celkern (Feigelson et al., 1975). Na injectie van oestrogenen wordt bijvoorbeeld de synthese van RNA in de celkernen van de ratte-uterus reeds binnen 2 minuten gestimuleerd. Deze stimulatie van RNA-synthese kan (ten dele) worden geremd door zowel remmers van de RNA-synthese als remmers van de eiwitsynthese. Ook blijkt de snelheid waarmee het effect van het oestrogeen op verschillende soorten RNA wordt bereikt verschillend te zijn. De synthese van het mRNA wordt reeds snel gestimuleerd. Een stimulatie van tRNA-synthese (tRNA is transfer RNA of transport-RNA) kon 1 uur na toediening van oestradiol worden aangetoond, terwijl het 2-4 uren duurde alvorens een effect kon worden waargenomen op de synthese van 45S- en 32S-RNA, welke als precursors voor ribosomaal RNA fungeren. De effecten op de precursors van de mRNA's bleken niet afhankelijk van eiwitsynthese, terwijl de stijging van de snelheid van de synthese van tRNA en rRNA kon worden geremd door remmers van de eiwitsynthese. Op grond van deze waarnemingen is verondersteld, dat in de uterus het eerste effect van oestrogenen op RNA-synthese een stimulatie van mRNA-moleculen tot gevolg heeft, waardoor na translatie van deze mRNA-moleculen de gevormde eiwitten een rol zouden spelen bij de stimulatie van de rRNA-synthese. In dit verband is bijvoorbeeld in uterusweefsel binnen 15-30 minuten na toediening van oestrogenen een inductie van de synthese van een specifiek eiwit (IP, 'induced protein') aangetoond. De vorming van IP kan worden geremd door gelijktijdige toediening van bijvoorbeeld actinomycine D en α -amanitine, welke verbindingen de mRNA-synthese kunnen remmen.

De rol van RNA-synthese als intermediair bij de moleculaire expressie van effecten van steroïdhormonen wordt tevens gesteund door de waargenomen stimulatie van RNA-polymerase-activiteiten na toediening van steroïdhormonen (O'Malley & Means, 1974). Na toediening van oestradiol heeft men in celkernen van ratte-uterusweefsel een stijging waargenomen van de activiteiten van zowel RNA-polymerase-I- als RNA-polymerase-II-enzymen, die betrokken zijn bij de synthese van respectievelijk rRNA en mRNA. De waargenomen stijging van RNA-polymerase-activiteiten zou verklaard kunnen worden door zowel een

activering van reeds aanwezige polymerase-moleculen als door een activering van DNA en/of chromatine, resulterend in de synthese van nieuwe polymerase-moleculen. Na scheiding van de aan chromatine gebonden polymerasefractie en een oplosbare polymerasefractie bleek na toediening van oestrogenen de chromatine-gebonden activiteit reeds na 1-2 uur verhoogd te zijn, terwijl de activiteit van het oplosbare enzym na 6 uren nog niet veranderd was. Het lijkt dus waarschijnlijk dat in de ratte-uterus na toediening van oestradiol in eerste instantie de transcriptieactiviteit van het chromatine gestimuleerd wordt. Als gevolg hiervan wordt met behulp van RNA-polymerase de synthese van specifieke mRNA-moleculen gestimuleerd, hetgeen resulteert in een verhoogde synthese van specifieke eiwitten. Deze eiwitten beïnvloeden de synthese van polymerasemoleculen, die via een stimulatie van de RNA-productie resulteren in de waargenomen verhoging van eiwitsynthese en groei van de uterus. Soortgelijke waarnemingen, die tot vergelijkbare conclusies leiden, zijn gedaan voor onderzoek naar het effect van oestrogenen en progesteron op de oviduct (zie o.a.: O'Malley & Means, 1974) en het effect van androgenen op prostaatweefsel (Davies & Griffiths, 1974).

Interactie tussen steroïden en het genoom

Eén van de momenteel nog niet opgehelderde problemen vormt de aard en structuur van acceptorplaatsen voor het steroïd-receptor-complex in de kernen. De aard en functie van deze acceptorplaatsen immers zouden een verklaring moeten kunnen geven voor zowel de binding van het steroïd-receptor-complex als voor de mogelijke effecten van het hormoon in de kern. Eén van de in dit verband meest uitvoerig bestudeerde modelsystemen bij het onderzoek naar het mechanisme van de werking van steroïden betreft het effect van oestrogenen op de synthese van het eiwit ovalbumine in de oviduct van kippen. Door de grote hoeveelheid beschikbaar materiaal en de grote stijging van de ovalbuminesynthese na oestrogeenbehandeling (O'Malley et al., 1969; O'Malley & Means, 1974) is het gelukt het mRNA voor ovalbumine in zuivere toestand te isoleren (Monahan et al., 1976; Palmiter et al., 1976). Met behulp van dit mRNA en 'reversed transcriptase' zijn radioactieve DNA-kopieën gesynthetiseerd, waarna dit radioactieve ovalbumine-DNA gebruikt is om met behulp van hybridisatie het aantal nieuw gesynthetiseerde ovalbumine-mRNA-moleculen te bepalen (McKnight et al., 1975; Harris et al.,

1975). Uit deze onderzoeken is gebleken, dat na toediening van oestrogenen aan kippen in oviductweefsel een goede correlatie bestaat tussen de hoeveelheid via hernieuwde synthese gevormd ovalbumine-mRNA en de stijging van de ovalbumineproductie. Tevens is gebleken dat na toediening van oestrogenen de transcriptie-activiteit van het DNA in het chromatine steeg alvorens een stijging van de hoeveelheid ovalbumine-mRNA plaatsvond.

Hoewel onder invloed van steroïden een stijging van het aantal RNA-polymerase-moleculen kan worden waargenomen, verklaart deze stijging niet de effecten van steroïdhormonen op RNA en eiwitsynthese. De hoeveelheid RNA-polymerase in kernen is meestal voldoende om de synthese van grote hoeveelheden RNA te katalyseren, terwijl het tevens meer voor de hand ligt om de stimulatie van de synthese van specifieke mRNA-structuren te verklaren via de specifieke structuur van het bij de transcriptie betrokken DNA. Op grond van deze overwegingen is (en wordt) dan ook veel onderzoek verricht naar de mogelijke invloed van steroïden op het voor de transcriptie noodzakelijke DNA. Er is een groot aantal potentieel belangrijke parameters welke de transcriptie theoretisch kunnen beïnvloeden, zoals:

- binding van RNA-polymerase aan chromatine
- translokatie van RNA-polymerase naar specifieke initiatieplaatsen op het DNA
- vorming van stabiel complex tussen RNA-polymerase en DNA
- initiatie van synthese van RNA-keten
- groeisnelheid van RNA-keten
- lengte van de RNA-keten
- terminatie van synthese van RNA-keten
- reïnitiatie van transcriptie

Er bestaan o.a. aanwijzingen dat steroïden een effect zouden kunnen hebben op de snelheid van de synthese van specifieke RNA-ketens. Uit de resultaten van O'Malley et al. (Schwartz et al., 1975; Tsai et al., 1975, 1976) blijkt, dat in de oviduct onder invloed van oestrogenen de stimulatie van de ovalbumine-mRNA-synthese verklaard kan worden door een toename van het aantal bindingsplaatsen voor polymerase op het chromatine met als gevolg een stijging van het aantal plaatsen voor de initiatie van de RNA-synthese; er werd geen significant effect gevonden op de snelheid van de RNA-synthese. Deze conclusie is gebaseerd

op experimenten waarbij gebruik werd gemaakt van de bijzondere eigenschap van het antibioticum rifampicine, dat de RNA-synthese van bacteriën kan remmen door binding met de β -keten van het bacteriële RNA-polymerase, voordat de RNA-synthese begint. Chromatine uit kip-ovoiducten werd geïncubeerd met *E. coli*-RNA-polymerase en ribonucleoside trifosfaten (UTP, ATP, CTP en GTP), al of niet in aanwezigheid van rifampicine. Onder de condities van deze experimenten remde het rifampicine alleen de activiteit van het RNA-polymerase dat niet gebonden was aan initiatieplaatsen op het chromatine. Het bleek (tabel 1), dat de hoeveelheid RNA waarvan de synthese niet geremd kon worden door rifampicine, evenredig was met het aantal nieuw gesynthetiseerde RNA-ketens en dus een indruk gaf over het aantal RNA-initiatieplaatsen, ofwel de hoeveelheid gebonden RNA-polymerasen op het chromatine. Bij vergelijking van RNA-synthese met behulp van chromatinepreparaten uit de oviducten van normale en met oestrogeen behandelde kippen, bleek dat de synthesesnelheid van de RNA-ketens en de lengte van de nieuw gesynthetiseerde RNA-ketens niet verschilde. Na toediening van oestrogenen bleek, dat de hoeveelheid RNA-polymerase welke gebonden kon worden door het chromatine, sterk verhoogd was.

Soortgelijke waarnemingen zijn beschreven door Palmiter et al. (1976) en Yamamoto & Alberts (1975). Op grond van de tijdsduur (enkele uren) tussen de opname van het steroïd-receptor-complex in de kern en de toename van de productie van mRNA en eiwitsynthese (zoals voor ovalbumine), hebben Palmiter et al. (1976) een model gefor-

Tabel 1. Effect van oestrogenen (DES = diethylstilboestrol) op binding van RNA-polymerase, het aantal RNA-initiatieplaatsen en het aantal ovalbumine-mRNA-moleculen in de oviduct van kippen (op grond van de resultaten van Rosen & O'Malley, 1975).

	RNA initiatie plaatsen per pg DNA ($\times 10^4$)	Aantal gebonden RNA-polymerase- moleculen per pg DNA ($\times 10^5$)	Aantal moleculen ovalbumine-mRNA per cel
Controle	1,06	3,38	0
8 uur DES	1,68	4,86	—
4 dagen DES	7,20	10,96	19.600

muleerd dat berust op translokatie van de steroid-receptor-complexen in het genoom. In dit 'translokatie-model' wordt, vergelijkbaar met O'Malley et al., verondersteld, dat alle voor de mRNA noodzakelijke componenten in de cel aanwezig zijn en dat het steroid uitsluitend nodig is voor de activering van mRNA-synthese. Binding van het steroid-receptor-complex in de kern vindt volgens Palmiter et al. (1976) plaats op zowel 'niet-produktieve' als 'produktieve' bindingsplaatsen. Binding aan de niet-produktieve bindingsplaatsen verklaart de grote bindingscapaciteit van kernen, zonder dat dit in effecten hoeft te resulteren. Binding aan produktieve plaatsen wordt gevolgd door een enkele uren durende translokatie van het steroid-receptor-complex naar een andere bindingsplaats op het genoom; daar wordt de productie van mRNA gereguleerd.

Een ander probleem bij de interactie tussen steroiden en het genoom vormt de kennis van de precieze structuur van de steroidreceptoren. Diverse onderzoekers hebben geprobeerd, hoofdzakelijk met behulp van affiniteitschromatografie, steroidreceptoren in zuivere toestand te isoleren. De progesteronreceptor uit de oviduct van kippen is door Kuhn et al. (1975) in hooggezuiverde toestand bestudeerd en blijkt twee (eiwit)-subeenheden te bevatten, waarvan één component (subeenheid A) aan het DNA zou kunnen binden en de andere (subeenheid B) aan de non-histon-eiwitfractie AP₃ in het chromatine. Elk van de subeenheden heeft een molecuulgewicht van ca. 100 000 en bezit één bindingsplaats voor één molecuul progesteron.

Met behulp van experimenten zowel in vivo als in vitro is aangetoond, dat na binding van het steroid-receptor-complex aan het chromatine in de kern het aantal initiatieplaatsen voor RNA-polymerase toenam, voordat er een stijging optrad in de synthese van ovalbumine (Schwartz et al., 1975). Alleen de intacte receptor, dus de combinatie van de subeenheden A en B, veroorzaakt een stijging van het aantal initiatieplaatsen voor RNA-synthese; de geïsoleerde subeenheid B had geen enkel effect en van de geïsoleerde subeenheid A, die aan het DNA gebonden kan worden, was een tien keer grotere hoeveelheid nodig in vergelijking met de intacte receptor, alvorens een effect op het aantal initiatieplaatsen kon worden aangetoond (Buller et al., 1976). Op grond van deze resultaten is het volgende model opgesteld. Na de binding van progesteron aan de receptor in het cytoplasma verandert de conformatie van de receptor, waardoor via één van de subeenheden (de B-ke-

ten) een binding plaatsvindt met het chromatine. Dit is geen rechtstreekse binding met het DNA in het chromatine, maar aan een acceptor in de nonhiston-eiwitten van het chromatine. Daar de structuur van het DNA in alle cellen van eenzelfde organisme hetzelfde is, zou een interactie van de receptor met het DNA ook geen verklaring kunnen geven voor de specificiteit van de interactie in een doelwit-cel. Het cytoplasmatische steroid-receptor-complex wordt via subeenheid B in de kern gebonden door acceptorplaatsen in een nonhiston-eiwit van het chromatine. Na deze binding wordt de subeenheid A afgesplitst en de A-keten 'zoekt' op het genoom specifieke effectorplaatsen met een hoge affiniteit voor de A-keten. Door de binding van de A-keten aan de 'effectorplaats' op het DNA zou een destabilisatie van het dubbelstrengs DNA plaatsvinden, waardoor nieuwe bindingsplaatsen voor RNA-polymerase — en dus initiatieplaatsen voor RNA-synthese — beschikbaar komen.

De onderzoeken die tot nu toe in dit verband zijn verricht, betreffen nagenoeg alle experimenten in vitro met uit kippeoviduut geïsoleerd chromatine en gezuiverde *E. coli*-RNA-polymerase. Er zal nog aangevoerd moeten worden dat endogene RNA-polymerasen bij eukaryoten in vivo op dezelfde manier gebonden worden door initiatieplaatsen als het uit bacteria geïsoleerde enzym en dat de geactiveerde initiatieplaatsen in vitro identiek zijn met de actieve initiatieplaatsen in vivo. Het is momenteel mogelijk specifieke dubbelstrengs DNA-moleculen te synthetiseren door transcriptie van zuivere mRNA's, terwijl tevens geprobeerd wordt het intacte ovalbumine-gen te isoleren (Monahan et al., 1976; Tsai et al., 1976). Met behulp van dergelijke geïsoleerde DNA-structuren moet het mogelijk zijn de interactie tussen DNA, chromatine-eiwitten en steroid-receptor-complexen rechtstreeks te bestuderen.

Slotopmerkingen

In het bovenstaande is geprobeerd een overzicht te geven van een aantal belangrijke biochemische parameters, waarvan aangetoond is dat ze beïnvloed worden door steroidhormonen en welke waarschijnlijk een belangrijke rol vervullen bij de uiteindelijke expressie van het hormoon-effect op cellulair niveau. Het geschetste beeld (figuur 1) is slechts kwalitatief besproken en er is voorbijgegaan aan de kwantitatieve aspecten van bijvoorbeeld het aantal aanwezige receptormoleculen en het

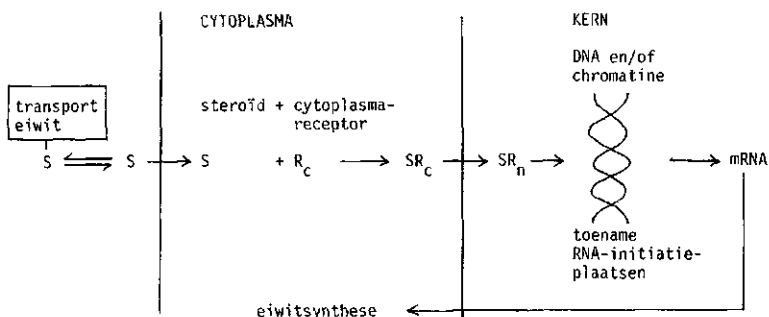


Fig. 1. Schema van het werkmeganisme van steroïden.

precieze aantal voor interactie met chromatine noodzakelijke steroïd-receptor-complexen, het aantal initiatieplaatsen voor RNA-synthese op het DNA, etc. (Schimke et al., 1975; Palmiter et al., 1976). Tevens geven de beschreven opvattingen uitsluitend een indruk over de momenteel meest populaire en als gevolg daarvan de meest bestudeerde mogelijke verklaring voor het mechnisme van werking van steroïdhormonen. Er wordt actief gezocht naar alternatieve biochemische mechanismen voor de werking van steroïden. In het werk van Szego (1974) zijn aanwijzingen gevonden voor een effect van steroïden op lysosomen als eerste intracellulair effect. Andere onderzoekers hebben gesuggereerd, dat onder invloed van steroïden veranderingen optreden in concentraties van cAMP en cGMP, welke mogelijk een rol als 'tweede boodschapper' zouden kunnen spelen bij de cellulaire expressie van het hormoon-effect. Deze opvattingen zijn niet bij voorbaat in strijd met het volgende regulatiemechanisme:

steroïdreceptor → chromatine → RNA → eiwitsynthese

Het belang van de grote lijnen van dit model bij het werkmeganisme van steroïdhormonen lijkt onmiskenbaar, maar er zijn nog zoveel onopgehelderde details, dat bij voortgezet onderzoek niet kan worden uitgesloten, dat effecten via lysosomen en/of cyclische nucleotiden een rol kunnen spelen. Verder onderzoek over de aard en de functie van de bij de effecten van steroïdhormonen betrokken chemische componenten zal ongetwijfeld het inzicht vergroten in de regulatie van RNA- en eiwitsynthese onder invloed van steroïden in zowel normale als pathologische situaties.

Deze nieuwe inzichten in het moleculaire mechanisme van de werking van steroidhormonen vinden reeds toepassing in een aantal fysiologisch en klinisch belangrijke situaties. Bijvoorbeeld door toediening van synthetische, biologisch inactieve verbindingen welke een interactie kunnen aangaan met de cellulaire receptoren, is het mogelijk om de werking van de endogeen aanwezige steroidhormonen te blokkeren (Clark et al., 1976). Tevens is gevonden dat bij spontaan optredende genetisch bepaalde ongevoeligheid voor steroiden, zoals bij het syndroom van de testiculaire feminisatie (zie het hoofdstuk van Van der Werff ten Bosch) (waarschijnlijk het gevolg van een geslachtschromosoom-gebonden mutatie), receptoren voor androgeen in de androgeengevoelige weefsels ontbreken of sterk verlaagd zijn. Dit verklaart, dat genotypisch mannelijke individuen (waargenomen bij de mens, ratten, muizen, runderen), ondanks de produktie van normale hoeveelheden androgenen, een vrouwelijk fenotype hebben (Yamamoto et al., 1975).

Bij onderzoek naar de relatie tussen steroidhormonen en tumor-groei, bij onder andere borstkanker en prostaathypertrofie, is gevonden, dat in diverse tumorcel-populaties steroidreceptoren voorkomen, die in alle opzichten vergelijkbaar zijn met de intracellulaire steroidreceptoren in normale doelwit-organen voor steroiden (Bresciani et al., 1973; McGuire et al., 1974). Op grond van de tot nu toe beschikbare informatie blijkt, dat endocriene therapie geen effect heeft op de groei van tumoren waarin geen steroidreceptoren voorkomen. Bij aanwezigheid van een steroidreceptor resulteert endocriene therapie in 50-70% van de gevallen in een (tijdelijke) regressie van de tumorgroei.

Functie van hormonen bij ontwikkeling en stofwisseling van insecten

'Van lopende larve tot vliegend imago'

A.M.Th. Beenackers

Sinds Kopeč meer dan 55 jaar geleden aantoonde, dat de cerebrale ganglia in insecten een neurohormoon produceren dat noodzakelijk is voor de metamorfose, is er een sterke uitbreiding gekomen in onze kennis omtrent de hormonale processen die insectenvervellingen en groei reguleren. Naast neurohormonen in de hersenen zijn andere morfogenetische hormonen aangetoond en is hun plaats van herkomst geïdentificeerd. Ofschoon binnen de immense klasse der insecten maar een betrekkelijk gering aantal soorten in het experimentele werk is gebruikt, bleek vaak de overeenkomst tussen de verkregen resultaten zo groot, dat men langzamerhand wel tot het opstellen van een uniform basisprincipe omtrent de endocriene regulatie van de insectenontwikkeling is gekomen.

Alvorens in te gaan op die endocriene regulatie eerst enkele opmerkingen over de groei en ontwikkelingsverschijnselen zelf.

Fysiologie van de vervelling

Beperkend voor de groei van de jonge larven is het exoskelet dat door de epidermis is gevormd. Vervelling is daarom noodzakelijk, waarbij vlak na de vervelling de wat ruimere nieuwgevormde cuticula nog flexibel is en verdere groei toelaat, tot na het verharden van de huid (sclerotisatie) weer van een 'restrictief' skelet kan worden gesproken. Het discontinue patroon van de larvale groei is daarmee een functie van de epidermis. Groei van andere weefsels kan continu verlopen, bijvoorbeeld pootspieren in de diverse larvale stadia en vliegspieren in het laatste larvestadium van de sprinkhaan. Groei van de epidermis daarentegen wordt bereikt door celvermeerdering en toename in celgrootte, in de beginperiode van de vervelling.

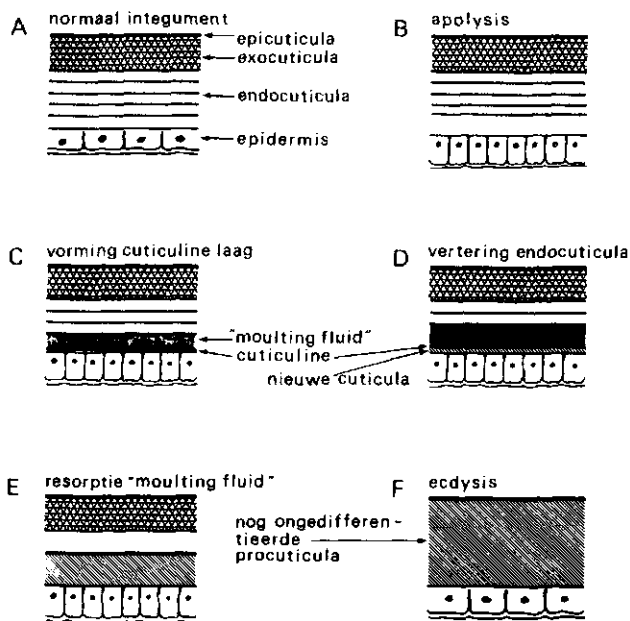


Fig. 1. Schema van de vervelling. Na de apolysis, het loslaten van de oude cuticula van de onderliggende epidermiscellen (B), wordt de oude cuticula gedeeltelijk gehydrolyseerd (C, D) en door de epidermale cellen wordt een nieuwe cuticula gevormd (D, E). Bij de ecdysis worden de resten van het oorspronkelijke integument verwijderd (F).

Een vervelling is een gecompliceerd gebeuren (figuur 1). Het omvat allereerst de apolysis, het loslaten van het oude skelet van de epidermiscellen. De apolysis sluit een larvale periode af. Na de apolysis begint de vorming van een nieuwe cuticula door de epidermiscellen. Deze scheiden tegelijkertijd een verteringsenzymen bevattende vloeistof, de 'moulting fluid' af, waardoor hydrolyse van het oude chitine en proteïne kan plaatsvinden. De hydrolyseproducten worden geresorbeerd. Ecdysis is het feitelijke verwijderen van cuticulaire overblijfselen. De periode tussen apolysis en ecdysis kan vrij lang zijn. Ondertussen verdikt zich de nieuwe cuticula.

Gedurende de larvale periode ondergaan insecten in de opeenvolgende vervellingen een aantal veranderingen in externe en interne morfolo-

gische eigenschappen. De meest ingrijpende veranderingen vinden plaats tijdens de laatste, metamorfoserende, vervelling, die aanleiding geeft tot het soortspecifieke imaginale fenotype. Hierbij kan sprake zijn van zeer sterke in- en uitwendige veranderingen, gepaard gaande met een tussen larve en imago optredend popstadium (endopterygote insekten). Het is ook mogelijk dat genoemde veranderingen geringer zijn (exopterygote insekten). Dit verschijnsel van polymorfisme berust op het feit, dat de beide levensvormen een eigen karakteristiek hebben: de larvale stadia zijn gespecialiseerd in voeding en dientengevolge groei; het imago in voortplanting en samenhangend hiermee meestal verspreiding.

Met name bij de endopterygote insekten is de levenswijze van larve en imago sterk verschillend. Gedurende het popstadium worden de zuiver larvale structuren afgebroken en door imaginale vervangen. De voorlopers van de imaginale structuren en organen zijn overigens al in de larve aanwezig in de vorm van celgroepen, de zogenaamde imaginale schijven, zoals die voor vleugels, poten en antennes. Zij kunnen in de larvale perioden wel groei vertonen, maar differentiatie vindt pas plaats bij de pupale en imaginale vervellingen.

Endocriene regeling van de vervelling

Het basisprincipe van de endocriene regulatie van de ontwikkeling is als volgt weer te geven (figuur 2).

De hormonale stimulus voor een vervelling komt vanuit de cerebrale ganglia. De eerste aanwijzingen hierover kwamen van het vermelde onderzoek van Kopeč, die aantoonde dat wegnemen van de cerebrale ganglia in larven van de vlinder *Lymantria* verhinderde dat er een pupale vervelling tot stand kwam. Nog veelal onbekende stimuli die van exogene en/of endogene aard zijn, beïnvloeden de vorming van het neurohormoon in neurosecretorische cellen. Dit hormoon bereikt via de hemolymfe de prothoracale klieren, afhankelijk van de soort gelegen in de prothorax of caudaal in de kop. Het 'brain hormone' wordt daarom ook aangeduid als prothoracotroop hormoon. De betekenis van de prothoracale klieren werd duidelijk in het begin der dertiger jaren toen Hachlow van enkele vlindersoorten poppen doorsneed en constateerde dat de imaginale ontwikkeling alleen kon plaatsvinden als een thoracaal centrum aanwezig was; dit centrum werd door Fukuda (ca. 1940) geïdentificeerd. De prothoracale klieren zijn verantwoordelijk voor de productie

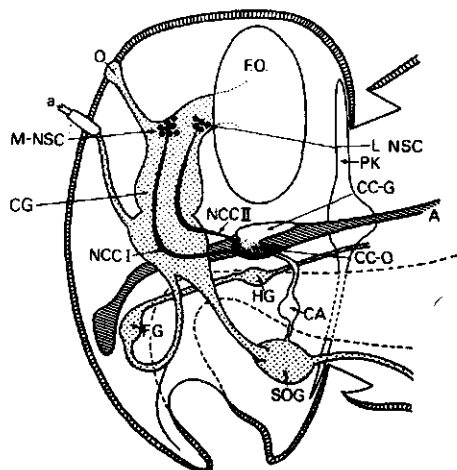


Fig. 2. Schematische weergave van de belangrijkste (neuro-)endocriene organen in de kop van een sprinkhaan (alleen rechterzijde getekend). De mediane (M-NSC) en laterale (L-NSC) neurosecretorische cellen in het cerebrale ganglion (CG), gelegen in de pars intercerebralis, geven via het opslagdeel van het corpus cardiacum (CC-O) neurohormonen af aan de hemolymfe, waaronder het prothoracotrope hormoon, dat de prothoracale klieren (PK) aanzet tot produktie van ecdyson. De corpora allata (CA) vormen het juveniel hormoon. Het klierdeel van het corpus cardiacum (CC-G) produceert stofwisselingshormonen. Aangegeven zijn verder: HG = hypocerebraal ganglion, FG = frontaal ganglion, SOG = suboesofageaal ganglion, FO = facet-oog, O = ocellus, a = antenne, A = aorta, NCC I en II (nervi corporis cardiaci I en II) = zenuwen tussen het cerebrale ganglion en de corpora cardiaca.

van ecdyson, dat de processen op gang brengt die tot een vervelling leiden. Het karakter van de vervellingen wordt bepaald door een ander hormoon, het juveniel hormoon (JH), gevormd in de corpora allata, organen gelegen bij – en door zenuwen verbonden met – de hersenganglia. De corpora allata (CA) zijn voor het eerst als klier zonder afvoergang waargenomen door Nabert (1913); voor hun fysiologische betekenis bij de insektenontwikkeling hebben vooral experimenten van Wigglesworth (ca. 1930-35) verklarend gewerkt. Zijn experimenten met de bloedzuigende wants *Rhodnius* leidden tot de gedachte dat als de JH-titer (concentratie in gewicht/volume) in de hemolymfe hoog is, de eerstvolgende vervelling een larvale is. Wordt de JH-titer lager, dan vindt bij de endopterygote insekten een pupale vervelling plaats, terwijl bij

afwezigheid van het hormoon de door ecdyson opgeroepen vervelling aanleiding geeft tot de ontwikkeling van het imago.

In de volgende paragrafen zal nader worden ingegaan op de betekenis van de onderscheiden hormonen bij de regulatie van de ontwikkeling.

Invloed prothoracotroop hormoon

Wanneer vroeg in een larvaal stadium de cerebrale neurosecretorische cellen worden vernietigd, treedt geen vervelling op. Re-implantatie van de neurosecretorische cellen of van cerebrale ganglia herstelt de vervellingsmogelijkheid. De prothoracotrope werking van het hormoon, een neurosecreet, kan worden bewezen door 'ligatuurexperimenten'. Bij insecten waarin een ligatuur is aangelegd tussen kop en thorax wordt een tweede ligatuur aangebracht tussen bijvoorbeeld de thorax en het abdomen (figuur 3). Implantatie van cerebrale ganglia in het abdomen heeft geen effect; als dit in de thorax gebeurt, zal dit deel gaan vervellen. Door verplaatsing van de ligatuur kan aangetoond worden, dat slechts het lichaamsdeel waarin na hersenimplantatie de prothoracale klieren

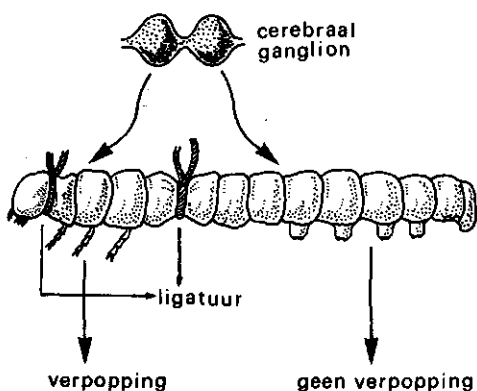


Fig. 3. Experiment om aan te duiden dat voor een vervelling neurosecreet van de cerebrale ganglia en prothoracale klieren noodzakelijk zijn. Wanneer hormoontransport tussen de kop en de rest van het lichaam onmogelijk wordt gemaakt en een tweede ligatuur elders in de rups wordt aangebracht, veroorzaakt implantatie van een extra cerebraal ganglion alleen in dat gedeelte van het lichaam waarin zich de prothoracale klieren bevinden, een vervelling.

aanwezig zijn, kan vervellen. Het prothoracotrope hormoon dat via de corpora cardiaca (CC, figuur 2) aan de hemolymfe wordt afgegeven, is zeer waarschijnlijk een polypeptide, maar isolering in zuivere vorm is nog niet volledig gelukt.

Een bepaalde stimulus is noodzakelijk voor de afgifte van het hormoon aan de hemolymfe, wellicht ook voor de synthese van het hormoon; onduidelijk is nog of deze twee onderscheiden gebeurtenissen door eenzelfde stimulus worden opgeroepen. Als externe stimuli zijn onder andere licht en temperatuur mogelijk. Een interne stimulus is bijvoorbeeld zwelling van het abdomen door voedselopname, zoals voorafgaand aan de vervelling bij *Rhodnius*.

Veel meer dan bij één der andere bij de vervelling betrokken hormonen het geval is, lijkt het tijdstip van de afgifte van het prothoracotroop hormoon een soortspecifiek karakter te hebben, hetgeen ongetwijfeld met verschil in gedrag, voeding, habitat en dergelijke van de soort te maken heeft. Het programma van de vervellingen zal bepaald zijn door het totaal aan omstandigheden eigen aan en karakteristiek voor de 'niche' waarin de soort wordt aangetroffen.

Zoals reeds is vermeld beïnvloedt het prothoracotrope hormoon de prothoracale klieren. Injectie van een extract van cerebrale ganglia stimuleert RNA-synthese in deze klieren. Kobayashi en Yamazaki hebben met gedeeltelijk gezuiverd hormoon uit de zijderups *Bombyx mori* aangetoond, dat dit hormoon geen effect uitoefent op de DNA-synthese, wel op de synthese van RNA, dat vervolgens vanuit de kern het cytoplasma binnengaat.

Daarnaast bestaat het idee, dat het prothoracotrope hormoon reeds aanwezige enzymen die bij de ecdysonsynthese een rol spelen via adenosine-3',5'-monofosfaat (cAMP) activeert. Gilbert en medewerkers hebben aan homogenaten van de prothoracale klieren van *Manduca sexta* gelabeld ATP toegevoegd en vastgesteld dat, mede afhankelijk van de leeftijd van de donor-larven, cAMP-verhoging optrad, met name in aanwezigheid van aminophylline, waardoor aangetoond werd dat de prothoracale klieren zowel adenylcyclase als fosfodiesterase activiteiten vertonen. Eveneens werd aangetoond dat toevoeging van cAMP aan een medium waarin prothoracale klieren waren geïncubeerd in een verhoging van de ecdysonsecretie resulteerde. Hoewel zij in een hypothetisch model de complexe werking van het prothoracotrope hormoon trachten

te verklaren, zal een verdergaande opheldering van het werkingsmechanisme van het neurohormoon moeten wachten tot men het in gezuiverde vorm in handen heeft.

Behalve het prothoracotrope hormoon hebben ook ecdyson en JH een bevorderende werking op de afgifte van het ecdyson door de prothoracale klieren. Het is niet onwaarschijnlijk dat de waargenomen stimulering door ecdyson zorgt voor verfijnde synchrone activiteit van de gepaarde prothoracale klieren. De stimulerende invloed van JH op de afgifte van het ecdyson wordt verondersteld ervoor zorg te dragen dat, wanneer een larvale vervelling gaat optreden, beide hormonen, JH en ecdyson, gelijktijdig aanwezig zijn, zodat de noodzakelijke simultane invloed gewaarborgd is.

Hoewel uit de vermelde ligatuurexperimenten aannemelijk werd gemaakt, dat de prothoracale klieren een belangrijke rol spelen bij de vervelling, heeft het nog lange tijd geduurd voor kon worden bewezen dat deze klieren inderdaad een vervellingshormoon produceren. Pas toen orgaancultures mogelijk werden kon de secretie van ecdyson door de prothoracale klieren worden vastgesteld. Dat de klieren het hormoon zelf synthetiseren is bepaald in in vitro experimenten door aanbieden van gelabeld cholesterol: in het medium komt dan gelabeld ecdyson vrij.

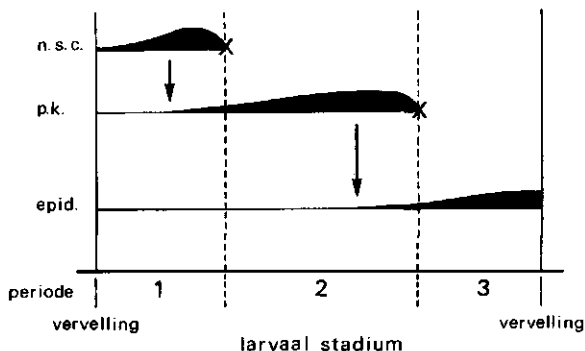


Fig. 4. In elk larvaal stadium worden twee kritische tijdstippen onderscheiden: één, die de periode afsluit waarop het prothoracotrope hormoon uit de neurosecretorische cellen (NSC) aanwezig moet zijn en één, die het moment aangeeft, waarop het ecdyson uit de prothoracale klier (pk) niet meer aanwezig hoeft te zijn voor de epidermale vervelling (epid.). X = wegnahme orgaan is niet meer van invloed.

Elk larvestadium is met betrekking tot hormooninvloeden te verde-
len in zeker drie fasen, met twee kritische tijdstippen (figuur 4):

Eerste fase: de periode waarin de prothoracale klieren worden geacti-
veerd door het prothoracotrope hormoon.

Tweede fase: de periode waarin de epidermis door ecdyson wordt be-
ïnvloed; het prothoracotrope hormoon is niet meer nodig.

Derde fase: de epidermis heeft de invloed van het ecdyson ondergaan;
dit hormoon is niet meer nodig voor de verder epidermale vervellings-
processen.

De ecdysonen in insekten

Dat ecdyson als het vervellingshormoon moet worden beschouwd is al
in 1954 door Karlson en medewerkers vastgesteld. Tijdens de isolerings-
processen en zuiveringsprocedures en de latere structuurbepaling, ble-
ken twee biologisch actieve fracties aanwezig te zijn; de grootste fractie
werd α -ecdyson genoemd, de andere β -ecdyson. Beide ecdysonen zijn
 C_{27} -sterolen en hebben sterk polaire eigenschappen ten gevolge van vele
hydroxylgroepen (figuur 5). Werd eerst α -ecdyson beschouwd als het
werkzame hormoon, later is gebleken dat β -ecdyson — het ecdysteron
dat identiek is met het vervellingshormoon in Crustacea — de hoogste
biologische activiteit bezit. Vooral in de laatste jaren is komen vast te
staan dat de prothoracale klieren uitsluitend α -ecdyson produceren. Dit
bereikt via de hemolymfe de doelwit-organen. In deze organen vindt
dan door hydroxylering de omzetting tot β -ecdyson plaats. De wijze
waarop het hormoon getransporteerd wordt is nog niet geheel duidelijk:
een aantal onderzoekers neemt aan dat ecdyson wordt getransporteerd
gebonden aan hemolymfe-proteïnen, terwijl anderen het vrij ecdyson

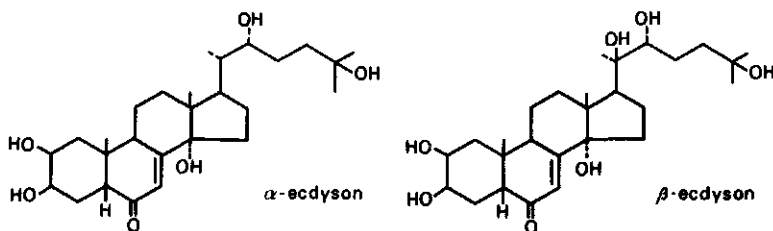


Fig. 5. Structuur van het α - en het β -ecdysone.

Tabel 1. De werking van ecdyson bij enkele insecten.

Orde	Soort	Experimentele omstandigheden	Respons	Noodzakelijke dosis ¹
Neuroptera	<i>Sialis lutaria</i>	overwinterende larve	verpopping	50
Isoptera	<i>Kaloterme flavicollis</i>	werksterlarve	vervelling	3
Hemiptera	<i>Rhodnius prolixus</i>	gedecapiteerde larve	vervelling	75
Hymenoptera	<i>Cimbex americana</i>	diapauze-larve	aanvang der ontwikkeling	660
Lepidoptera	<i>Ephestia kuehniella</i>	abdomen ligatuurlarve	verpopping	50
Diptera	<i>Chironomus tentans</i>	larve	'puff-inductie'	0,0002

1. Uitgedrukt in *Calliphora*-units: 1 unit = 0,01 µg ecdyson.

als fysiologische transportvorm beschouwen. De sterke polariteit maakt een goede oplosbaarheid mogelijk. Het is overigens zeer wel mogelijk, dat een proteïne-binding bepalend is voor of het uittreden uit de prothoracale klieren of het fysiologisch functioneel worden van het hormoon in de doelwit-organen.

Enkele typische voorbeelden van ecdysoninvloed op ontwikkelingsprocessen zijn opgenomen in tabel 1. Het zijn veelal processen die samenhangen met de vervelling, larvaal of metamorfoaserend. Daarnaast is de invloed op het gen-systeem in enkele Diptera bekend.

Invloed ecdyson op cellulaire processen De invloed op de vervelling is allereerst het op gang brengen van de apolysis: het loslaten van de cuticula door de epidermiscellen. Naast andere neuro-endocriene factoren, speelt ecdyson eveneens een rol bij de vorming van de nieuwe cuticula en de secretie van de waslaag. In 1963 heeft Wigglesworth aan de epidermiscel van *Rhodnius* geconstateerd dat onder invloed van ecdyson de nucleolus vergroot wordt, RNA in het cytoplasma verschijnt,

de mitochondriënpopulatie toeneemt en de proteïnesynthese versterkt wordt. Dat het hier om vermeerdering van specifieke proteïnen gaat (en daaraan voorafgaand om de vorming van specifiek mRNA) is door Karlson en medewerkers bestudeerd aan het verschijnsel 'sclerotisatie', dat zich manifesteert in het donkerbruin worden van de cuticula van het puparium. Het sclerotine is een combinatie van een chinon met eiwitmoleculen, resulterend in een hoog-moleculaire, stabiele stof. Het chinon ontstaat uit N-acetyl-dopamine, dat uiteindelijk van tyrosine afkomstig is; de eerste metabolische stap is oxidatie van het aminozuur tot DOPA (dihydroxyfenylalanine), dat op zijn beurt door het enzym DOPA-decarboxylase wordt omgezet in dopamine. Enkele uren na injectie van ecdyson in een geïsoleerd larvaal abdomen neemt dit enzym in activiteit toe. Deze toename kan worden verhinderd door gelijktijdige injectie van bijvoorbeeld puromycine, een antibioticum dat de eiwitsynthese remt, of van actinomycine, dat RNA-synthese verhindert. Dus ecdyson bevordert de nieuw-vorming van het enzym, waarschijnlijk werkend op het niveau van de transcriptie.

Een meer gedetailleerde en methodisch-technisch hanteerbaarder experimentele benadering van de relatie tussen ecdyson en proteïnesynthese levert het onderzoek aan de speekselklieren van *Drosophila* en *Chironomus*, waarin polytene chromosomen aanwezig zijn, chromosomen die eveneens herkenbaar zijn in bijvoorbeeld middendarmcellen. In deze chromosomen zijn 'puffs' aanwezig, de belangrijkste plaatsen van RNA-synthese. In bepaalde ontwikkelingsstadia zijn, in de tijd gezien, specifieke puff-patronen geconstateerd, bijvoorbeeld een puff-volgorde die karakteristiek is voor een laat-larvaal stadium. Injectie van ecdyson in een vroeger stadium resulteert spoedig in een ontwikkeling van een puff-patroon, behorend bij de laat-larvale periode. De eerste chromosomale puff verschijnt reeds 15-20 min na injectie, de tweede 15-30 min later en in de loop van de volgende uren zijn grote aantallen ervan te zien. Wanneer onvoldoende ecdyson wordt geïnjecteerd verschijnen alleen de eerste, hetgeen een aanwijzing is dat de latere puff-volgorde afhankelijk is van de activiteit van de eerst ontstane. Het chromosomale RNA dat in de verschillende puffs wordt gevormd is puff-specifiek. Beermann beschreef reeds in 1952 de puff als een structurele modificatie van het DNA, waardoor de synthese van specifieke RNA-soorten mogelijk wordt.

In het voorgaande hoofdstuk van Van der Molen is de invloed van

steroïdhormonen op het celmetabolisme reeds besproken; vandaar dat hier wordt volstaan met het vermelden van de twee meest gangbare hypothesen omtrent het werkingsmechanisme van het steroïdhormoon ecdyson: Karlson en medewerkers veronderstellen een direct effect van ecdyson; het hormoon activeert de genen (de-repressie) als gevolg van het feit dat het een directe binding aangaat met het repressor eiwit. Kroe-ger daarentegen postuleert dat ecdyson niet direct op het genoom, maar op de kernmembraan inwerkt, waardoor de permeabiliteit van natrium- en kaliumionen verandert: de concentratie van deze ionen is dan van invloed op de synthese van het mRNA. Deze verklaring wordt thans als minder waarschijnlijk geacht.

De ecdyson-titer Hoewel gedurende het gehele larvestadium meetbare hoeveelheden ecdyson aanwezig zijn, hetgeen geleid heeft tot de veronderstelling dat subliminale invloeden van het hormoon moeten uitgaan gedurende een langere periode alvorens het tot de beschreven morfologische en biochemische effecten kan komen, zijn er toch in de loop van een ontwikkelingsstadium veranderingen in de ecdyson-concentratie gemeten. Vooral de onlangs geïntroduceerde methode om via 'radio-immuno-assay' de concentratie van het hormoon te bepalen heeft hiertoe veel bijgedragen. Gilbert en medewerkers hebben op deze wijze het verloop van de ecdyson-concentratie in het laatste larvestadium van de vlinder *Manduca sexta* bepaald (figuur 6). Op de 4e dag van het 10 dagen durende stadium is er een geringe verhoging, terwijl een sterke concentratievermeerdering gemeten werd op de 7e en 8e dag, waarna een sterke daling optreedt. Hoewel een causale relatie nog onduidelijk is, is het interessant dat op de 4e dag de algemene morfologie van de larve verandert en het dier graafbewegingen gaat vertonen. Op de 7e dag begint de pupale ontwikkeling, waarna op de 9e dag de volledige pop, nog omgeven door de larvale cuticula, ontstaan is. Op de 10e dag heeft de ecdysis plaats.

Deze experimenten zijn gecombineerd met onderzoek naar hormoonafgifte door de prothoracale klieren via orgaankweek in een ge-eigend medium. In de loop van de 4e dag werd ecdyson in het medium aangetoond en de hoogste synthese-activiteit werd gemeten op de 7e dag (figuur 6). Naast deze, wellicht te verwachten overeenkomst tussen dier en klier, is het interessant dat werd vastgesteld dat de prothoracale klier α -ecdyson afscheidt, maar dat in het dier als geheel zowel α - als

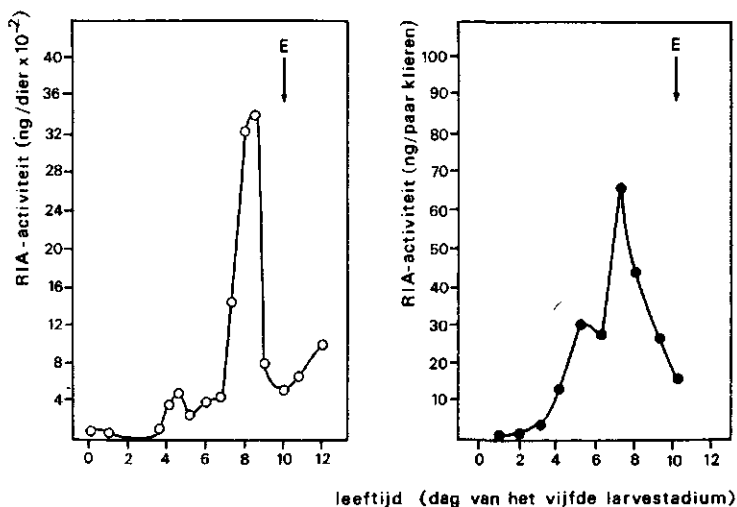


Fig. 6. De ecdysonconcentratie gedurende het laatste larvestadium in de tabakspijfstaart (links) en de synthese-nelheid van ecdyson voor een paar geïsoleerde prothoracale klieren uit dit insect (rechts). RIA-activiteit = concentraties ecdyson bepaald via radio-immunologische bepaling, E ecdysis. (Naar Bollenbacher et al., 1975.)

β -ecdysone aanwezig is en wel op de 1e tot de 4e dag in de verhouding 1:1, op de 6e tot de 9e dag daarentegen vijfmaal zoveel β - als α -ecdysone, waarbij de omzetting van α - in β -ecdysone dus in andere organen dan de prothoracale klier heeft plaatsgevonden. Daarmee wordt steun gegeven aan de eerder vermelde veronderstelling dat niet α -, maar β -ecdysone het werkzame hormoon is. Toch moet hier voorzichtigheid worden betracht. Bij de genoemde hormonale invloeden op de puff-inductie in speekselklieren van *Chironomus* is geconstateerd dat β -ecdysone allereerst de zogenaamde 'puff IV-2-B' doet ontstaan. Gebleken is nu dat α -ecdysone een puff op plaats I-18-C veroorzaakt, onafhankelijk dus van de aanwezigheid van β -ecdysone. Dit kan erop wijzen, dat α -ecdysone niet louter als voorloper voor ecdysterone functioneert, maar dat beide stoffen een verschillende specificiteit hebben. Overigens is in de speekselklieren van enkele *Drosophila*-soorten deze invloed van α -ecdysone niet aan te tonen.

De juveniel hormonen in insekten

Naast het ecdyson speelt, zoals in het begin aangegeven, het juveniel hormoon een rol bij de vervellingen. Het JH is met name van belang om de differentiatiegraad bij elke vervelling te bepalen. Omdat een nieuwe cuticula alleen kan worden gevormd na voorafgaande invloed van ecdyson, is ecdyson noodzakelijk voor de mogelijkheid van JH om morfogenetische invloeden uit te oefenen. In het hoofdstuk van De Wilde zal blijken dat JH ook invloeden kan uitoefenen op cellulaire gebeurtenissen, los van ecdysonwerking, met name bij de insektenvoortplanting.

De structuuropheldering van JH heeft lang op zich laten wachten, ondanks de bekendheid met het effect en vermoedelijke vormingsplaats, de corpora allata. Williams' ontdekking in 1956, dat het abdomen van de imaginale mannelijke mot *Hyalophora cecropia* grote hoeveelheden JH bevat, leidde isolerings- en zuiveringsexperimenten in. In 1967 slaagde Röller erin het hormoon uit dit dier te identificeren: JH-I (figuur 7). Weldra bleek dat er nog een analoog juveniel hormoon aanwezig was, namelijk JH-II, en later werd in andere soorten (o.a. *Manduca sexta*, *Schistocerca*, *Locusta*) een weer andere vorm, het JH-III aangetoond.

Was lange tijd onzeker of de CA de directe bron van het (de) JH waren, onlangs is door kweek in vitro van deze klieren vastgesteld, dat de fysiologisch actieve hormonen inderdaad in de CA worden gesynthetiseerd.

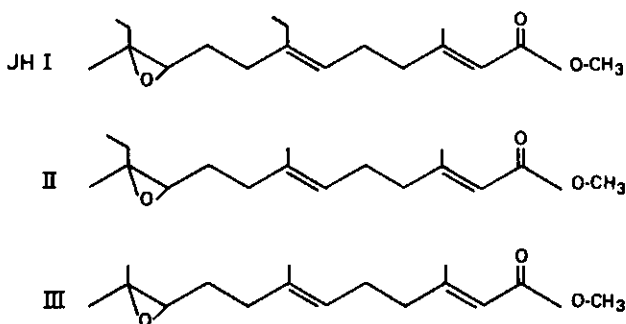


Fig. 7. Structuur van de drie typen juveniel hormoon, zoals deze in insekten worden aangetroffen.

Regulatie juveniel hormoon-titer De methode waarop een insect tijdens de larvale ontwikkeling zowel in de hemolymfe als in de weefsels het gehalte aan JH nauwkeurig reguleert, is de laatste jaren onderzocht en gedeeltelijk opgelost. Hierbij moet, naast synthesesnelheid, de mate van afbraak en de eventuele beïnvloeding van deze laatste door aanwezigheid van beschermende stoffen in aanmerking worden genomen.

Het is gebleken dat JH fysicochemische interacties met hemolymfe-macromoleculen aangaat. Hierbij zijn in experimenten met larvale stadia van de tabakspijlstaart, *Manduca sexta*, twee bindingsvormen aangetoond (figuur 8). De ene bindingsvorm is die aan lipoproteïnen. Nu zijn er vele verschillende lipoproteïnen in insectenhemolymfe aantoonbaar. In het vierde larvestadium van *Manduca* kunnen zes soorten lipoproteïnen worden onderscheiden: één ervan kon in vitro een JH-binding aangaan. Het is een zogenaamd 'high density lipoprotein' en aangeduid

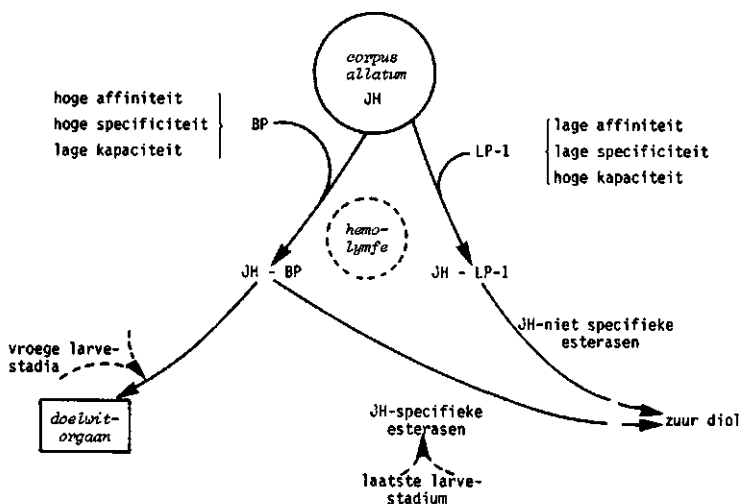


Fig. 8. Het door de corpora allata afgegeven juveniel hormoon (JH) wordt in de hemolymfe getransporteerd gebonden aan proteïnen. In tegenstelling tot het aan het lipoproteïne-1 (LP-1) gebonden hormoon, wordt het aan het bindingsproteïne (BP) gekoppeld juveniel hormoon beschermd tegen afbraak door esterasen die niet specifiek zijn voor juveniel hormoon. Het BP gebonden juveniel hormoon kan slechts worden gehydrolyseerd door een voor juveniel hormoon specifieke esterase, die aanwezig is in het laatste larvestadium. Het bindingsproteïne zal tevens functioneren bij de hormoonherkenning door het doelwit-orgaan.

als LP-1. De bindingskarakteristieken tonen aan dat het eiwit een betrekkelijk lage bindingsactiviteit heeft, een lage specificiteit (het kan ook andere lipiden binden) en een hoge capaciteit, met andere woorden het kan veel hormoon binden. Naast dit LP-1 is onlangs nog een ander, niet tot de lipoproteïnen gerekend eiwit gevonden dat JH kan binden, het zogenaamd 'binding protein'. Eventueel toegediend JH bindt zich bij voorkeur aan dit bindingsproteïne. Het heeft een moleculairgewicht van ca. 35 000 en een hoge affiniteit, een hoge specificiteit en een beperkte capaciteit voor het JH. De affiniteit voor JH-I en -II is groter dan voor JH-III; dit wijst erop, dat de binding een functie van de polariteit van het molecuul is: het minst polaire hormoonmolecuul heeft de hoogste bindingsaffiniteit.

De betekenis van het bindingsproteïne moet bij *Manduca* wellicht worden gezien in het licht van de regulatie van de JH-titer. Zoals reeds eerder opgemerkt is deze titer onder andere afhankelijk van synthese en afgifte door de hormoonproducerende klier en van de afbraaksnelheid van het hormoon. Die afbraak van JH verloopt via esterhydrolyse en hydrolyse van de epoxide-ring, waardoor via het zuur en diolester een zuur diol ontstaat (figuur 9). Deze degradatieproducten vertonen geen biologische activiteit. Door gedurende een ontwikkelingsperiode de voor genoemde afbraak verantwoordelijke enzymen, carboxylesterase en epoxidehydrolase te activeren, kan de JH-titer gereguleerd worden,

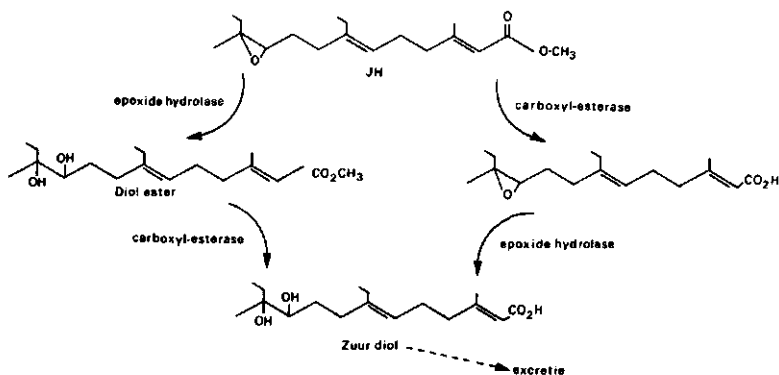


Fig. 9. Afbraak van het juveniel hormoon (JH) via hydrolyse van de epoxide-ring en esterhydrolyse tot een zuur diol, dat als degradatieproduct wordt uitgescheiden.

zowel in de hemolymfe zelf als in de doelwit-organen. Een studie naar esterasen aanwezig in de hemolymfe heeft twee groepen aangetoond met een belangrijk verschil in specificiteit voor JH (figuur 8). Het JH-specifieke esterase kan JH-hydrolyse bewerkstelligen ook als het aan het bindingsproteïne is gebonden, de niet-specifieke esterasegroep kan allerlei esters, ook die van vrij aanwezig JH, afbreken. De belangrijke functie van het bindingsproteïne zal zijn de bescherming van JH tegen de niet-specifieke esterasen, waarmee het proteïne een essentiële rol vervult in de regulatie van de JH-titer. Gebleken is nu, dat in vroege larvestadia wel de niet-specifieke esterasen aanwezig zijn, maar niet de specifieke. Deze laatste verschijnen pas in het laatste larvestadium. Evenals van het bindingsproteïne vindt de synthese ervan plaats in het vetlichaam.

Uit het voorgaande moet duidelijk zijn dat een belangrijke trend in het onderzoek nu is, dat wordt nagegaan hoe de regulatie van de aanmaak en afgifte van zowel bindingsproteïne als van JH-specifieke esterasen plaatsvindt. Van het esterase is reeds bekend dat synthese en afgifte niet strikt gekoppeld zijn; opslag in het vetlichaam is mogelijk, hetgeen onafhankelijke controle van beide processen vraagt. Voor wat betreft het bindingsproteïne blijken de synthese en afgifte ongeveer synchroon te verlopen.

Het is mogelijk dat de fysiologische functie van bindingsproteïne niet alleen is het beschermen en transporteren van JH, maar eveneens controle van de afgifte van het hormoon uit de CA. Door snelle binding van het hormoon kan een grote concentratiegradiënt tussen CA en hemolymfe worden gehandhaafd. Daardoor kan het bindingsproteïne aan de regulatie van de hormoon synthese bijdragen.

Tenslotte zijn er in dit verband ook nog aanwijzingen gevonden, dat het bindingsproteïne participeert in de werking van het JH op de epidermale cel. Als de vleugelaanleg van de mot *Plodia* in orgaancultuur wordt gehouden, veroorzaakt toevoegen van ecdyson aan het medium cuticulavorming. Toevoegen van JH remt in een aantal gevallen cuticulavorming; de remming wordt versterkt door toevoeging van bindingsproteïne. Het lijkt erop, dat het eiwit een functie heeft bij hormoonherkenning door of transport in het doelwit-orgaan.

Invloed juveniel hormoon op cellulaire processen Vervolgens rijst de vraag hoe het JH zijn invloed op de morfogenese uitoefent. Gegevens

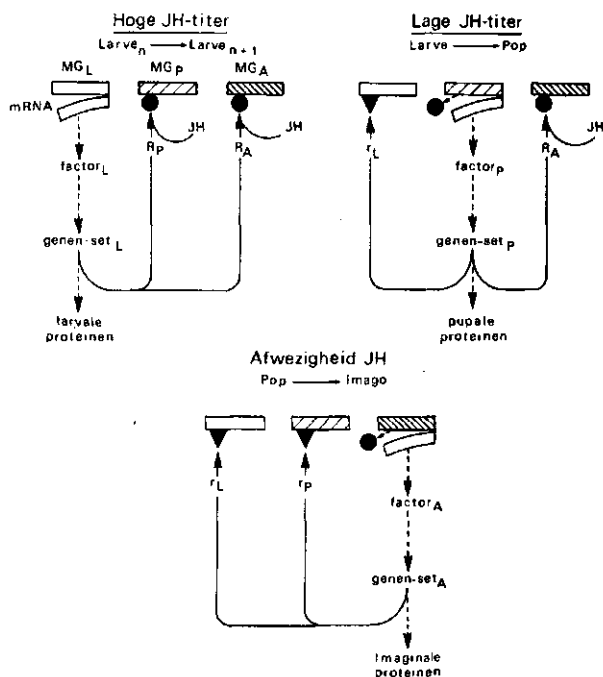


Fig. 10. Schematische voorstelling van de hypothese van Williams en Kafatos omtrent de werking van juveniel hormoon op cellulaire processen. Deze hypothese maakt gebruik van het door Jacob en Monod opgestelde operonmodel, bestemd om het molecuulair-genetische mechanisme van de regulatie van enzym-synthese te verduidelijken. In dat model zijn repressors werkzaam, eiwit-moleculen die, eventueel in combinatie met een andere stof (co-repressor) de synthese van een bepaald boodschapper-RNA (mRNA) verhinderen. Het genoom van de betreffende insectencel wordt nu voorgesteld te zijn verdeeld in drie sets genen, elk gecontroleerd door zijn eigen hoofdregulator-gen (MG_L , MG_P en MG_A). Juveniel hormoon (JH) werkt als co-repressor samen met de repressor van het pupale hoofd-gen (R_P) en die van het imaginale hoofdgen (R_A). Indien de concentratie van het juveniel hormoon hoog is zijn de repressors R_P en R_A werkzaam (voorgesteld door ●, waardoor MG_P en MG_A niet in staat zijn tot synthese van mRNA) en is alleen MG_L actief. Dit vormt mRNA, dat codeert voor de synthese van een factor L die op zijn beurt de larvale genen-set (set L) operationeel maakt; enzymen en andere proteïnen van de larve worden nu gesynthetiseerd, waaronder de repressors R_P en R_A . Bij een lage concentratie van het juveniel hormoon verliest de repressor R_P zijn affiniteit voor MG_P . Nu wordt de factor_P gevormd, die de genen-set_P activeert, waardoor de synthese van pupale proteïnen mogelijk wordt, waaronder de repressor R_A en de nieuwe repressor r_L , die ook onafhankelijk van juveniel hormoon op het MG_L werkzaam kan zijn (voorgesteld door ▼). In afwezigheid van juveniel hormoon zullen op overeenkomstige wijze imaginale pro-

daarover zijn nog schaars en onduidelijk. Het hormoon moet in werking treden tijdens of kort nadat ecdyson zijn primaire werking op de vervelling uitoefent. Bepaalde, door ecdyson ingeleide processen, zoals synthese van de cuticula van pop en imago en differentiatie van imaginale schijven, moeten door JH worden geremd. Uit experimenten met speekselklieren van *Chironomus* kan de conclusie worden getrokken, dat JH een invloed uitoefent op de gen-expressie. Als dieren, die in het laatste larvestadium zijn in een JH-houdend medium worden geplaatst, blijft metamorfose tot pop uit. Onderzoek van het 'puff-patroon' wees uit, dat een aantal, normaal ten gevolge van ecdyson geïnduceerde puffs, afwezig waren, terwijl typisch 'larvale puffs' gereactiveerd werden. Dit betekent overigens niet, dat JH invloed heeft op loci die normaal rechtstreeks door ecdyson worden geactiveerd. Gewezen is reeds op de beide puffs die spoedig na injectie van ecdyson optreden en eerst later door andere worden gevolgd. Die eerste twee puffs zijn ook zichtbaar wanneer een larvale vervelling tot stand gaat komen. Deze kunnen inherent zijn aan elke vervelling, terwijl in afwezigheid van JH optredende puffs bepalend zijn voor het imaginale karakter van de vervelling. Aanwezigheid van JH remt dan de gen-expressie van deze laatste. De hypothese van Williams en Kafatos omtrent de werking van JH maakt van dit idee gebruik. De hypothese wordt beschreven in figuur 10 en het bijbehorende bijchrift.

Invloed van het juveniel hormoon op de orgaanontwikkeling Het voorgaande houdt in, dat de imaginale ontwikkeling slechts kan plaatsvinden in afwezigheid van JH. Implantatie van actieve CA vroeg in het laatste larvestadium van bijvoorbeeld de sprinkhaan, leidt na de, in principe imaginale, vervelling tot het ontstaan van een extra-larvaal stadium, dat later opnieuw een vervelling ondergaat. Dit wijst erop dat, in tegenstelling tot het normale geval, de prothoracale klieren actief blijven. Of dit het gevolg is van een directe werking van JH op de prothoracale klieren of van een indirecte via het cerebrale neurosecretorische

Vervolg Fig. 10.

teïnen gesynthetiseerd kunnen worden doordat de repressor R_A wegvalt en de repressors r_L en r_P hun invloed op de genen MG_L en MG_P uitoefenen. (Naar Williams & Kafatos, 1971.)

systeem, is nog onduidelijk. Reeds eerder werd op de stimulerende invloed van JH op de ecdysonproductie gewezen.

Wegname van de CA uit voorafgaande larvestadia resulteert daarentegen in een vervroegde vervelling tot imago, waarbij een klein adult dier met ontwikkelde vleugels ontstaat.

Naast de ingrijpende veranderingen die de metamorfose op de uitwendige vorm, met name in de endopterygote insecten, heeft, gaat de imaginale ontwikkeling ook gepaard met inwendige wijzigingen: typisch larvale organen verdwijnen, specifiek imaginale organen komen tot ontwikkeling, waarbij deze ontwikkeling al in het laatste larvestadium kan beginnen.

Als voorbeeld gelden de vliegspieren van de sprinkhaan, waarvan de zichtbare ontwikkeling begint in het begin van het vijfde, laatste larvestadium. In dit stadium is de groei regelmatig, hetgeen ook geldt voor de inwendige organisatie, structureel en metabolisch. Direct na de imaginale vervelling vinden er drastische veranderingen plaats: de mitochondriëndichtheid neemt toe, enkele catabolische enzymen verveelvoudigen hun activiteit, terwijl andere zeer sterk worden gereduceerd. In deze ca. drie dagen durende periode die de differentiatiefase van de vliegspieren wordt genoemd, komt het soortspecifieke imaginale stofwisselingspatroon tot stand. De veronderstelling dat groei en differentiatie kan plaatsvinden dank zij de afwezigheid van JH in dit larvestadium, kon voor een deel worden bevestigd via de genoemde implantatie-experimenten. De spiergroei bleef achter en met name de differentiatie van het imaginale stofwisselingspatroon bleef achterwege. In sprinkhanen, die door wegname van de CA vervroegd tot imago's ontwikkeld zijn, komen ook de vliegspieren vervroegd tot ontwikkeling en het metabolische patroon ervan is identiek aan dat van zich normaal ontwikkelde volwassen dieren. Hoe de verhoogde JH-titer in de implantatie-experimenten de vliegspierontwikkeling beïnvloedt, is nog onbekend. Maar de eerder geuite veronderstelling, dat de aanwezigheid van het juveniel hormoon de synthese van larvale proteïnen doet voortgaan, en de transcriptie van de voor de imaginale ontwikkeling verantwoordelijke genen verhindert, gaat ook op voor orgaanniveau.

Hormonen der corpora cardiaca

Was in het voorgaande sprake van insektenhormonen en ontwikkeling van larve tot imago, niet minder belangrijk zijn endocriene processen in het volwassen dier.

De al aan het begin van dit hoofdstuk genoemde taken van het imago: verspreiding en reproductie vragen uiteraard ook om een verfijnde regulatie van cellulaire, en orgaanprocessen. Ook hierbij treden in vele gevallen hormonen als regulatoren op. Verschillende ervan (afgezien van het juveniel hormoon, dat direct betrokken is bij de reproductie) zijn afkomstig uit de corpora cardiaca. Deze organen, die via zenuwen met de hersenen zijn verbonden, bestaan uit twee onderscheiden delen: een opslagdeel dat dienst doet als neurohemaal orgaan (zie hoofdstuk van Joosse) voor de neurohormonen afkomstig uit neurosecretorische cellen van de hersenen, en een klierdeel dat als endocrien orgaan eigen hormonen produceert (figuur 2). De hormonen die door de corpora cardiaca aan het bloed worden afgegeven zijn te verdelen in: morfogenetische hormonen (zoals het besproken prothoracotrope hormoon), kinetische hormonen (waaronder het diuretisch hormoon en een hartslag-versnellend hormoon) en metabolische hormonen (met name het hyperglycemisch en het adipokinetisch hormoon). Terwijl het merendeel van deze hormonen zijn oorsprong vindt in de cerebrale neurosecretorische cellen, is in ieder geval voor het adipokinetisch hormoon vastgesteld, dat het klierdeel (glandulaire deel) de plaats van synthese en afgifte is. In de komende paragrafen zal voornamelijk aandacht worden besteed aan de metabolische hormonen, hetgeen zal geschieden in het kader van de vliegmogelijkheid van de meeste insekten, een eigenschap die mede verantwoordelijk is voor de verspreiding van de soort.

De stofwisselingshormonen Zoals reeds is opgemerkt, wordt gedurende de vliegspierontwikkeling in de differentiatiefase het uiteindelijke metabolische karakter van de spieren vastgelegd. Dit metabolische patroon bepaalt welke substraten gedurende de vlucht als energiebron kunnen dienen. Afgezien van enkele insekten zoals de tsetse-vlieg die bepaalde aminozuren als energiebron hebben, blijken de meeste onderzochte insektensoorten voor het metabolisme in de vliegspier koolhydraten en/of vetzuren te benutten. In dit verband kunnen drie groepen insekten worden onderscheiden: obligate koolhydraat-verbruikers, pre-

ferente vetverbruikers en insecten die beide substraten kunnen benutten. Tot deze laatste groep behoort onder andere de treksprinkhaan. Vooral bij insecten die langdurige trekvluchten maken of bij insecten die in volwassen toestand niet meer eten (bijvoorbeeld diverse vlindersoorten) is het nodig dat een grote energievoorraad in een zo klein mogelijk volume wordt opgeslagen; dit is het geval als vetvoorraden worden aangelegd en dit verklaart het belang van vetzuuroxidatieve mogelijkheden in de vliegspieren. De reservevoorraden bevinden zich in het vetlichaam, zodat gedurende de vlucht substraten via de hemolymfe naar de vliegspieren moeten worden getransporteerd. De genoemde metabolische hormonen, het hyperglycemisch hormoon en het adipokinetisch hormoon, spelen hierbij een rol.

In 1961 werd voor het eerst hyperglycemische activiteit aangetroffen in de corpora cardiaca van enkele kakkerlak-soorten (Steele, 1961) en later eveneens in de corpora cardiaca van de vleesvlieg, de sprinkhaan en de honingbij. Het belangrijkste hemolymfe-koolhydraat in insecten is het disaccharide trehalose, dat uit de glycogeenvoorraden in het vetlichaam wordt gevormd en vervolgens afgegeven aan de hemolymfe. Hoewel de experimentele gegevens hieromtrent nog betrekkelijk gering zijn, is voor enkele soorten aangetoond, dat het hyperglycemisch hormoon de fosforylase-activiteit in het vetlichaam verhoogt, waardoor de omzetting van glycogeen wordt versneld. Invloeden van de hyperglycemische factor op andere metabolische stappen bij de trehalosevorming of op membraantransport van dit koolhydraat (vergelijkbaar met insuline in vetweefsel bij vertebraten) zijn niet uitgesloten.

Eerst in 1969 werd de adipokinetische werking van het corpus cardiacumextract van de sprinkhaan aangetoond (Beenackers, 1969; Mayer & Candy, 1969), later ook van de kakkerlak. De fysiologische werking van het hormoon bestaat uit een versnelling van de afgifte van diglyceriden uit het vetlichaam; deze diglyceriden worden in dit orgaan gevormd uit triglyceriden. In tegenstelling tot bij vertebraten worden namelijk bij de meeste insecten vetzuren als diglyceriden getransporteerd; welke enzymatische processen bij vorming en afgifte van deze lipiden door het adipokinetisch hormoon worden beïnvloed, is nog onbekend.

Uit de corpora cardiaca van de treksprinkhaan is een verregaand zuivere hormoonfractie verkregen. De meest gezuiverde fractie heeft zowel hyperglycemische als adipokinetische activiteit, hetgeen moet leiden tot de conclusie, dat beide activiteiten aan hetzelfde molecuul ver-

bonden zijn. Het hormoon blijkt een klein peptide te zijn, waarschijnlijk bestaande uit acht aminozuren (Holwerda et al., 1977).

Adipokinetisch hormoon en insektenvlucht De relatie tussen de adipokinetische activiteit en het fysiologisch gebeuren tijdens vlucht is vooral door recent onderzoek aan de sprinkhaan duidelijk geworden. De normaal tijdens vlucht optredende verhoging van de diglyceride-concentratie in de hemolymfe kan eveneens verkregen worden door injectie van corpus cardiacum-extract in een rustend dier. Reeds na een vlucht van 15 min is een significante toename van de concentratie van het hormoon in de hemolymfe vastgesteld (Houben, 1976). Opvallend is, dat na injectie van het extract, dat zoals gesteld ook hyperglycemische activiteit vertoont, geen toename van de trehalose-concentratie in de hemolymfe geconstateerd wordt. Dit is wel aantoonbaar door corpus cardiacum-extract van de sprinkhaan in te spuiten in de kakkerlak, die daarop reageert met toename van de trehalose-concentratie, echter niet met lipideverhoging zoals in figuur 11 weergegeven. Eveneens in deze

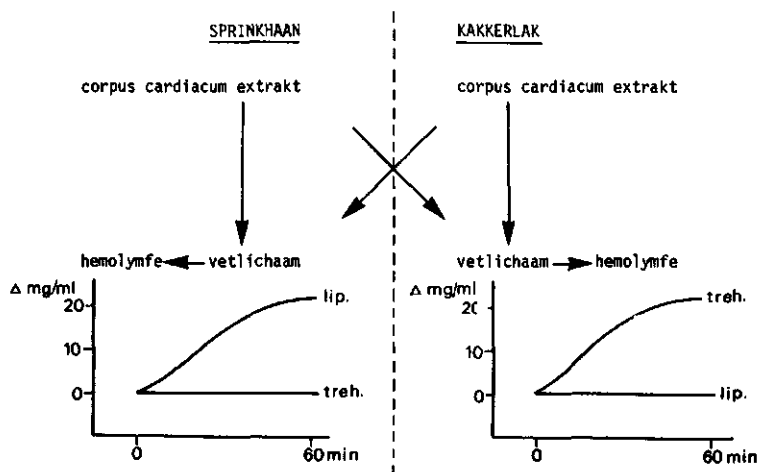


Fig. 11. Injectie van een sprinkhaan met een extract van corpora cardiaca van sprinkhaan of kakkerlak verhoogt de lipideconcentratie in de hemolymfe. Injectie van de kakkerlak met extract van corpus cardiacum van sprinkhaan of kakkerlak doet de trehaloseconcentratie in de hemolymfe toenemen. Dit betekent, dat in de hormoonklier van beide insecten zowel adipokinetische als hyperglycemische activiteit aanwezig is, maar dat de hormoon-beïnvloeding soortspecifiek is.

figuur is het resultaat van het reciproke experiment te zien. Corpus cardiacum-extract van de kakkerlak, dat in de kakkerlak zelf hyperglycemische maar geen adipokinetische werking heeft, roept in de sprinkhaan een verhoging van de diglyceride-concentratie op, maar verandert de koolhydraatconcentratie niet. Deze experimenten tonen aan: (a) dat beide insecten beide hormonale activiteiten in hun corpora cardiaca bevatten, maar dat (b) de beïnvloeding door de hormonen soortspecifiek is, blijkbaar aangepast aan de fysiologische mogelijkheden.

Afgezien van de nog niet te beantwoorden vraag waarom de onderzochte insecten beide hormonale activiteiten bezitten, waar er toch maar één in de fysiologische processen een rol schijnt te spelen, speelt met name voor de sprinkhaan het probleem welk biochemisch antwoord gegeven gaat worden op verhoging van de hormoon titer in de hemolymfe tijdens de vlucht. Ongetwijfeld zal de oplossing gezocht moeten worden in het meest waarschijnlijke doelwit-orgaan voor de hormonale activiteiten, het vetlichaam. Invloed op de concentratie van cAMP in het vetlichaam is, ook met de meest gezuiverde fractie van sprinkhaan-corpus cardiacum, reeds aangetoond (Gäde & Holwerda, 1976); de waargenomen verhoging van deze nucleotideconcentratie onder invloed van extern toegediend hormoon correleert fraai met de identieke reactie die onder invloed van vlucht wordt opgeroepen. Een mogelijke rol van cAMP als 'tweede boodschapper' voor zowel hyperglycemische activiteit in *Periplaneta* als adipokinetische invloed in *Locusta* kan echter pas worden vastgesteld als van cAMP afhankelijke proteïnekinase(n) een rol blijkt (blijken) te spelen bij de activering van voor substraatafgifte verantwoordelijke enzymen.

Een belangrijke vraag is nog, hoe synthese en afgifte van de stofwisselingshormonen worden gereguleerd. Subcellulair onderzoek van het neuro-endocriene complex van de treksprinkhaan heeft hierop enig licht geworpen (Rademakers, 1977). Het eerder genoemde klierdeel van de corpora cardiaca bevat één type cellen, waarin elementair granula van ca. 300 nm (= 3000 Å) doorsnede. Reeds na een vlucht van 5 min blijken granula te worden afgescheiden naar intercellulaire ruimten, zoals te zien valt uit exocytoseverschijnselen. Bovendien wordt spoedig na de aanvang van de vlucht een verhoogde activiteit in het Golgi-systeem waargenomen, hetgeen duidt op versnelde synthese processen. Daar het klierdeel de bron is van het adipokinetisch hormoon, worden deze gebeurtenissen toegeschreven aan synthese en afgifte van deze hormonale

factor. In dit deel van de corpora cardiaca worden naast de kliercellen nog axonuiteinden aangetroffen met elementair granula van ca. 95 nm (= 950 Å). Gecorreleerd aan de kliercelactiviteit zijn via synaptische structuren tussen axon en cel afgifteverschijnselen van laatstgenoemde granula aangetoond. Met behulp van de door Wigglesworth geïntroduceerde cobaltdiffusie-techniek kon de oorsprong van de axonuiteinden worden vastgesteld. Het cobalt-ion bleek vanuit het klierdeel via de tussen corpora cardiaca en cerebrale ganglia verlopende nervi corporis cardiaci II naar de hersenen te diffunderen tot in een aantal cellen, lateraal van het gebied van de mediane neurosecretorische cellen.

Besluit

Resumerend kan worden gesteld, dat het onderzoek naar de functie van insektenhormonen een essentiële bijdrage levert om fundamentele verschijnselen die aan de insekten worden waargenomen te verklaren. Tot deze verschijnselen moet zeker gerekend worden het optreden van onderscheiden levensvormen met hun eigen functionele specialisatie gedurende de ontwikkeling. Het gecompliceerde vervellingspatroon houdt hiermee verband. De grote vermeerdering van kennis omtrent vervelling en ontwikkeling die in korte tijd is geboekt — en die in vele opzichten ook richting heeft gegeven aan het endocrien onderzoek in andere diergroepen — verhult echter niet het feit, dat nog aanzienlijke lacunes bestaan in ons inzicht. Te wijzen valt bijvoorbeeld op de hormonale invloeden op cellulair niveau, zeker als in aanmerking wordt genomen dat van een complexe samenwerkende invloed van meerdere hormonen sprake zal zijn. Veel onbekendheid bestaat ook nog over de wijze waarop interne en met name externe factoren zodanig op het endocriene systeem werkzaam zijn, dat een geordend fysiologisch gedrag bereikt wordt. Een en ander geldt eveneens voor het onderzoek van recentere datum, veelal naar hormonale invloeden op andere dan ontwikkelingsgebeurtenissen. In het voorafgaande is dit duidelijk geworden voor de endocriene processen, samenhangend met de insektenvlucht, maar dit betreft eveneens vele andere processen waarvan endocriene sturing bekend is, en die onbesproken zijn gebleven. Een verdere, noodzakelijke uitbreiding van vergelijkend insektenonderzoek zal kunnen leiden tot bijsturing en wellicht tot herziening van gevestigde opvattingen.

Hormonale invloed op voortplanting en milieurelaties van insecten

J. de Wilde

*'Life is the continuous adjustment of
internal relations to external relations'*

H. Spencer

Probleemstelling

Reeds in het begin van deze eeuw werden biologen gewaar, dat het dierlijke organisme twee, ogenschijnlijk tegenstrijdige typen van relaties onderhoudt. Interne relaties leiden tot stabiliteit, externe relaties daarentegen tot aanpassing aan de wisselvalligheden van het milieu (adaptabiliteit). Dit werd al in 1900 door de Franse fysioloog Richet gesignaleerd, maar de tegenstrijdigheid komt het duidelijkst tot uiting door vergelijking van twee kernachtige uitspraken van respectievelijk de fysioloog en de ecooloog die beide typen van relaties voor het eerst klaar en duidelijk hebben geformuleerd.

Claude Bernhard, de Vader van de Fysiologie, deed in 1878 zijn befaamde uitspraak: 'La fixeté du milieu intérieur est la condition de la vie libre'.

Jacob von Uexküll, een van de wegbereiders van de moderne ecologie en ethologie, stelde in 1909: 'Die Umwelt ... ist immer ein Teil des Tieres selbst, durch seine Organisation aufgebaut und verarbeitet zu einem unauflöslichen Ganzen mit dem Tiere selbst'.

Nu zijn er milieu-invloeden, die zo vérgaande consequenties hebben voor de fysiologische toestand van dieren, dat er sprake is van totaal verschillende levensniveaus. Men kan zich nu afvragen, op welke wijze in dergelijke gevallen de informatie die een dier uit zijn milieu ontvangt, dusdanig naar de 'binnenwereld' wordt overgedragen dat de homeostatische processen niet worden verstoord. Het is de verdienste van Ernst en Berthä Scharrer geweest dat zij in de neuro-endocriene integratie een

mechanisme hebben onderkend, dat de integriteit van het organisme waarborgt en toch een sterke adaptabiliteit aan milieu-invloeden mogelijk maakt. 'Channels must exist, ... through which these modifying influences enter the control system and become integrated with or supersede the ... feedback mechanism. This integration can only take place in the central nervous system' (E. & B. Scharrer, 1963).

Heeft nu het ecofysiologische onderzoek de veronderstelling van het echtpaar Scharrer bevestigd, en zo ja, op welke wijze doet het effect van milieu-invloeden zich op de endocriene centra van diverse diersoorten gelden? In het volgende wordt een poging gedaan tot synthese van hetgeen we in dit opzicht bij reproductie en imaginale diapauze van insecten te weten zijn gekomen, met als 'Leitmotiv': de extrinsieke regeling van deze toestanden bij de Coloradokever.

Milieu-invloeden, toestandsniveaus, signalen

Twee categoriën van milieu-invloeden In figuur 1 wordt onderscheid gemaakt tussen twee typen van milieu-invloeden.

Ten eerste zijn er de directe invloeden op de perifere processen, die van meer kwantitatieve aard zijn. Hiertoe behoren o.m. het effect van de temperatuur op de stofwisselingsprocessen, de invloed van lichtgradiënten bij fototaxis, de invloed van voeding op de groei en de invloed van concurrenten op de beschikbaarheid van benodigd materiaal.

Daarnaast zijn er de milieu-invloeden waarvan het aangrijpingspunt meer centraal is en het effect bestaat uit het deblokken van processen en het veroorzaken van adaptatiesyndromen van uiteenlopende aard. In dit geval is niet zozeer het kwantitatieve, maar meer het configuratieve element van belang; het betreft de werking van specifieke moleculen, zoals feromonen, bepaalde patronen van licht en duisternis, bepaalde temperaturen in relatie tot de tijd en bepaalde optische configuraties. Deze factoren hebben een *signaalwaarde*. Dit tweede type milieu-invloeden zal ons in dit hoofdstuk verder bezighouden. De syndromen die ze veroorzaken zijn fysiologische en morfogenetische toestanden, zoals reproductieve toestand, migratie, diapauze en ecomorfen als fasen, kasten en morfen. Hun effect op het centrale zenuwstelsel is in vele gevallen *extrasensorisch* d.w.z. zonder tussenkomst van de zintuigen.

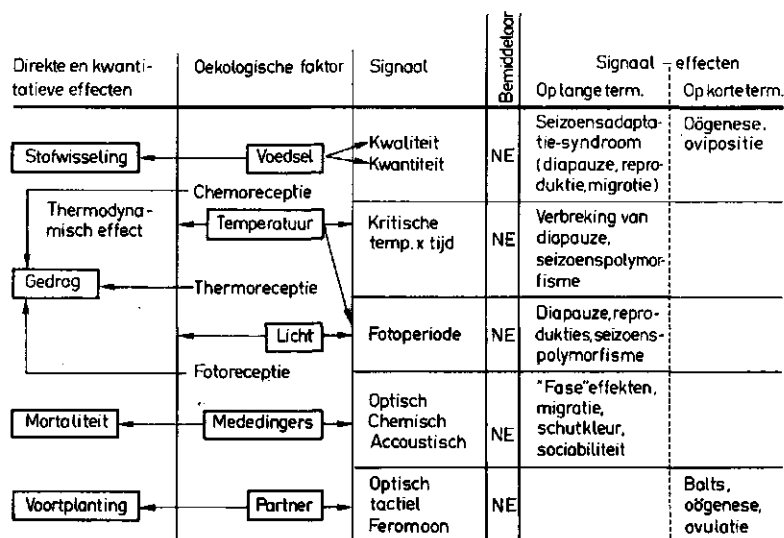


Fig. 1. Twee effecten van milieufactoren. Links: de effecten die niet-toestandsbepalend zijn maar meer directe functionele en numerieke reacties betreffen. Rechts: de signaaleffecten die homeostatische toestanden en syndromen bepalen en worden gekanaliseerd via het neuro-endocriene stelsel.

Homeostase in verschillende toestandsniveaus Het in de probleemstelling gesignaleerde, dreigende relatieconflict kan worden vermeden indien het milieu verschillende toestanden induceert, die door hun eigen homeostatische niveaus worden gekarakteriseerd.

Bij de Coloradokever (*Leptinotarsa decemlineata* Say) kunnen we twee adaptieve toestanden onderscheiden:

1. De reproductieve toestand, gekenmerkt door eiafzetting, seksueel gedrag, vreterij en soms verspreidingsgedrag (vliegen). Deze toestand duurt als regel ca. 6 weken. Iedere 1 à 2 dagen worden 75-100 eieren geproduceerd.
2. De diapauze-toestand, gekenmerkt door afwezigheid van voortplanting en vreterij, door rust- of graafgedrag en door een zeer laag stofwisselingsniveau. Deze toestand duurt onder natuurlijke omstandigheden 7-8 maanden en wordt in de grond doorgebracht.

De reproductieve toestand wordt voorafgegaan door een rijpingsperiode, de diapauze door een prediapauze-periode gedurende welke de

eerdergenoemde niveaus worden ingesteld. Reproductie kan óf direct na ontpopping optreden, óf na afloop van de diapauze; in het laatste geval is dit onder natuurlijke omstandigheden in het volgende voorjaar. De diapauze kan al in de nazomer beginnen, maar valt verder samen met het winterseizoen.

Eenzijds was nu gevonden dat een aantal van de processen die de beide toestanden kenmerken, onder endocriene invloed staan. Anderzijds had ecologisch onderzoek geleerd, dat diapauze en reproductieve toestand worden bepaald door de milieu-omstandigheden, waaronder larve en imago opgroeien. Bijgevolg is de Coloradokever een uitermate geschikt proefdier om de relaties tussen buiten- en binnenwereld, in de zin van onze probleemstelling, te onderzoeken.

De signalen die voortplanting en diapauze bepalen Het primaire signaal dat in gematigde en subtropische gebieden voortplanting en diapauze bepaalt heeft een kosmische oorsprong: de 'fotoperiode'. De fotoperiodieke reactiekromme van de Coloradokever vertoont een steile daling bij 15 uur. De Coloradokever is een langedagdier: daglengten boven 15 uur veroorzaken bij 70 à 80% van de kevers de reproductieve toestand. Daarentegen wordt door daglengten beneden 14 uur bij 100% van de kevers diapauze veroorzaakt (figuur 2). Uit het bovenstaande

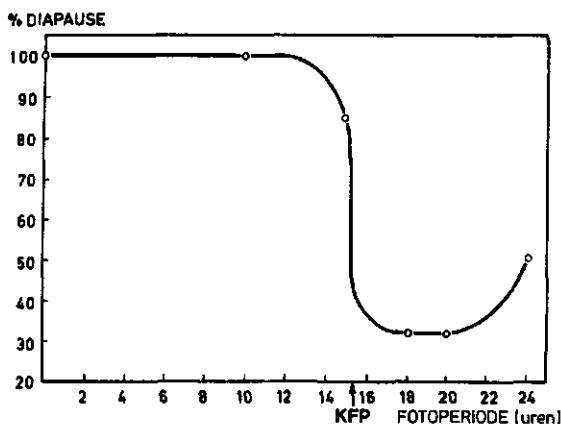


Fig. 2. Fotoperiodieke reactiekromme bij de Coloradokever bij 25°C. KFP = kritische fotoperiode.

volgt, dat de daglengte de levenscyclus met het astronomische seizoen synchroniseert. Secundair signaal is de temperatuur, die de fotoperiodieke respons op twee wijzen kan beïnvloeden: hoge temperaturen doen het kortedageffect teniet en verschuiven de kritische fotoperiode naar lagere waarden. Hiervoor zijn bij de Coloradokever temperaturen boven 30°C vereist. In warme zomers synchroniseren zij de levenscyclus met het *klimatologische seizoen*.

Een derde factor is de fysiologische toestand van de aardappelplant. Wanneer fysiologisch oud aardappelloof als voedsel wordt gegeven, komt de eiafzetting tot stilstand en treedt diapauze in: óók onder condities van langedag en hoge temperatuur. Wij hebben hier te doen met een 'veto-factor' die de levenscyclus van de kever synchroniseert met het *waardplant-seizoen*.

Vergelijkbare relaties zijn ook bij de andere insekten gevonden. Het gevoelige stadium (bij de Coloradokever in hoofdzaak de imago) en het reagerende stadium kunnen soms identiek zijn, soms v^{er} uiteen liggen. Wat de invloed van de temperatuur betreft: bij de meeste insekten van de gematigde zone wordt door temperaturen boven 25°C het kortedageffect al geremd. Bij de gekweekte zijderups (*Bombyx mori* L.) die een kortedagdier is, en waarbij de diapauze dus onder langedagomstandigheden intreedt, leidt dit tot de paradoxale situatie dat hoge temperaturen de (ei)diapauze bevorderen! Er zijn echter ook veel insekten die ongevoelig zijn voor de daglengte. Bij de meeltor, *Tenebrio molitor*, heeft nóch korte- noch langedag invloed op de reproductie; de diapauzetoestand komt bij dit dier niet voor.

Het aangrijpingspunt en het 'primum movens'

Wanneer we ons nu de vraag stellen, hoe de daglengte wordt waargenomen, realiseren we ons dat de fotoperiodiciteit een cyclisch verschijnsel is, en dat wij een dag-nachtritme ook in diverse andere levensprocessen tegenkomen. De Coloradokever legt bijvoorbeeld alleen overdag zijn eieren, en is óók wat de voedselopname betreft een 'dagdier'.

Vervolgens is van belang dat er een kritische fotoperiode is die de scheiding vormt tussen korte- en langedageffecten. Hoe wordt nu de daglengte door het dier gemeten? Hierover bestaan verschillende opvattingen. Sommige onderzoekers menen verband te moeten leggen met de dag-nacht-ritmiek; andere zijn de mening toegedaan dat het overschrij-

den van de kritische fotoperiode wordt gemeten door een 'interval-timer' die de absolute duur van de donkerperiode registreert.

Verder kan men zich afvragen waar het centrum gelegen is waar de daglengte wordt geregistreerd. De plaats hiervan kan men door topografische uitsluitingsproeven opsporen. Daarbij blijkt in de eerste plaats, dat de samengestelde ogen (evenals de meeste kevers heeft de Coloradokever geen enkelvoudige ogen) niet noodzakelijk zijn; chirurgisch verwijderen of bedekken met ondoorzichtige lak levert tot uitkomst dat het daglengte-effect onveranderd behouden blijft. Aangezien de kop het lichaamsdeel is dat gevoelig is voor de daglengte, blijft het cerebrale ganglion als waarschijnlijke plaats van perceptie over: de cuticula van de kop is boven het midden van de hersenen transparant!

Bij de diapauzepop van de zijdevlinder *Anthereya pernyi*, die zich voor dit type onderzoek veel beter leent dan de Coloradokever-imago, is deze perceptie door Williams & Adkisson meer gedetailleerd onderzocht. Deze pop, die donker gepigmenteerd is en zeer weinig licht doorlaat, heeft boven het cerebrale ganglion een transparant cuticulavenster. Langedag is bij deze pop een voorwaarde voor de imaginale ontwikkeling in het voorjaar. Bij differentiële belichting van vóór- en achterzijde van de pop met respectievelijk een lange- en kortedagperiode volgt de ontwikkeling de belichting van de vóórzijde. Wordt het cerebrale ganglion naar de top van het abdomen verplaatst en een kunstmatig venster ter plaatse in de cuticula aangebracht, dan volgt de ontwikkeling daar-entegen de belichting van de achterzijde. Verder blijkt, dat in de zijlobben van de hersenen een rose pigment aanwezig is, dat mogelijk bij het fotodynamische proces een rol speelt. Het op-gang-brengen van de ontwikkeling berust echter op een effect van de pars intercerebralis (zie figuur 2 in het hoofdstuk van Beenakkers).

Terugkerend naar de Coloradokever, vragen wij ons af, wat nu het hiërarchisch hoogste centrum is dat bij reproductie en diapauze de leiding heeft, en of ook hier de mediane neurosecretorische cellen (M-NSC) een rol spelen. Het blijkt dat de wegname van deze cellen door hoogfrequente wisselstroom diverse complicaties met zich mee kan brengen. In gevallen waarin deze operatie 'schoon' verlopen is, blijkt de voortplanting ook bij een languedagperiode niet in te treden, terwijl na enige tijd diapauze-gedrag wordt waargenomen. De waarschijnlijkheid, dat het 'primum movens' in de M-NSC gelegen is, wordt nog vergroot door de waarneming, dat na het voederen met fysiologisch oud loof de

neurosecretorische cellen blijkens histologisch onderzoek hun sekreet blijken vast te houden en na daaropvolgende voeding met jong loof, dit weer afgeven. Parallel hiermee wordt in het eerste geval de eierproductie geremd en vervolgens weer versneld. Schooneveld, die bij de Coloradoever niet minder dan zeven typen cerebrale NSC onderscheidde, kon van vier daarvan aantonen, dat hun histologisch activiteitsbeeld parallel loopt met reproductie en diapauze. Een sterke accumulatie van neurosecreet treedt echter pas in de tweede helft van de prediapauze op, en pas na vele weken is de stilstand in het secreettransport volledig.

Dat de activiteit van cerebrale neurosecretorische cellen niettemin de 'pacemaker' is van de activiteit van de corpora allata kon nader worden geadstrueerd in proeven, waarbij bij vrouwelijke dieren de postcerebrale complexen door kortedagbehandeling werden geïnactiveerd en vervolgens weer door langedagbehandeling geactiveerd. Op mijn laboratorium deden wij dit in proeven, waarbij het cerebrale ganglion alleen via de bloedbaan zijn effect op het postcerebrale complex kon uitoefenen.

Complexen van corpora cardiaca en corpora allata werden in het ventrale deel van de thorax geïmplanteerd bij kevers die tevoren van hun postcerebrale complexen waren beroofd. Deze laatste operatie, bij langedagdieren uitgevoerd, brengt ze tot reproductieve stilstand. Wordt na de implantatie van inactieve complexen, afkomstig uit diapauze-dieren, een kortedagperiode toegepast, dan treedt op de duur diapauze in. Wordt nu een langedagperiode gegeven, dan worden de corpora allata geactiveerd en treedt na enige tijd ovipositie op.

Klaarblijkelijk worden de corpora allata voortdurend gedomineerd door het neurosecretorische systeem van de kop. Dit kan onder de gegeven omstandigheden zijn neurosecreet aan de hemolymfe afgeven via een regeneraat van de corpora cardiaca.

Endocrinologisch-ecologische parallellen

Uit het bovenstaande kwam al naar voren dat door ingrepen in het endocriene stelsel daglengte-effecten konden worden gesimuleerd. Dit kwam in onderzoek op mijn laboratorium het fraaist naar voren bij extirpatie en re-implantatie van de corpora allata. Wanneer na langedagbehandeling bij vrouwelijke dieren de eierproductie in gang werd gezet, kon deze zowel door daaropvolgende kortedagbehandeling als door allatectomie, het operatief verwijderen van de corpora allata, tot stilstand

worden gebracht. De latentietijd van dit effect verschilde niet significant, en beide behandelingen hadden later diapauze tot gevolg.

Interessant waren ook de uitkomsten van proeven die betrekking hadden op het effect van fysiologisch oud aardappelloof. Wanneer van een dieet van jong blad op oud aardappelloof werd overgegaan, daalde de eierproduktie sterk. Men zou nu vermoeden dat het oude loof deficiënt geworden is ten aanzien van voedingsstoffen die essentieel zijn voor de oögenese, en dit is ook in de literatuur wel gesuggereerd. In een onderzoek van Ferket werden nu na daling van de eierproduktie tot een minimum, in iedere op oud loof gekweekte kever twee paren actieve corpora allata geïmplanteerd. De eierproduktie steeg weer tot normale hoogte, hetgeen bewijst dat er sprake was van *endocriene* deficiëntie. Tezamen met eerdere genoemde waarnemingen suggereert dit een signaaleffect van het oude loof.

Het opwekken van diapauze door allatectomie zal in een volgende paragraaf nader worden besproken. Daar wordt ook vermeld, hoe men door uitwendige toediening van JH (juveniel hormoon) de verbreking van diapauze teweeg kan brengen.

Men kan zich uiteraard afvragen of bij kortdageffecten naast een uitblijven van de stimulerende invloed van de cerebrale neurosecretie ook niet sprake is van remming van de activiteit van de corpora allata vanuit het cerebrale ganglion langs reflectorisch-nerveuze weg. Hiervoor hebben wij nooit aanwijzingen gevonden. Het extirperen en elders in het lichaam implanteren van postcerebrale complexen heeft bij diapauzekevers nooit in activering geresulteerd. Bij andere insektensoorten, zoals sommige kakkerlakken, oefent het cerebrale ganglion echter wel degelijk een remmende invloed op de corpora allata uit; in dit geval in de pre-reproductieve periode.

Het is een groot voordeel gebleken, dat men de Coloradokever door geschikte keuze van voedsel, daglengte en temperatuur in een voorspelbare fysiologische toestand kan brengen. Door microchirurgische ingrepen kan men proberen deze inductie teniet te doen en daarmee de centra te vinden die de toestand reguleren. Daarbij zijn de corpora allata als 'master glands' naar voren gekomen.

De componenten van de oögeneses

Algemene gang van de oögenese Oögenese begint in het germarium, dat bij insecten behalve oögoniën en oöcyten, ook voedingscellen kan bevatten. Dit is met name bij polytrofe en telotrofe ovariolen het geval. De oöcyten, bij polytrofe ovaria begeleid door tot cysten verenigde trofocyten, dalen in het vitellarium af, waar ze door follikelcellen worden omgeven. Bij telotrofe ovariolen (figuur 3) is met het afdalen van

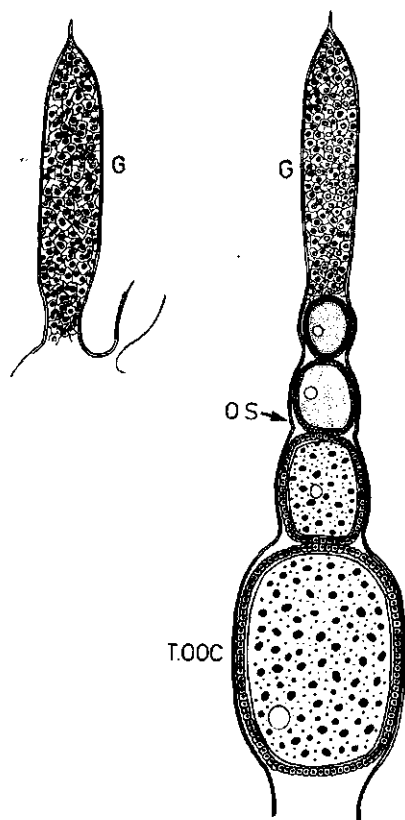


Fig. 3. Ovariolen van de Coloradokever. Links: inactief (diapauze-toestand). Alleen het germarium (G) is ontwikkeld. Rechts: actief (reproductieve toestand). In het vitellarium zijn vier follikels zichtbaar. De voedingsstrengen zijn bij het telotrofe ovarium van de Coloradokever moeilijk te zien. In de terminale oöcyt (T.OOC) is de vitellogenese voortgeschreden. OS = ovariolescheden.

de afzonderlijke oöcyten een zekere activiteit waarneembaar van de in het germarium achterblijvende voedingscellen waarmee ze verbonden zijn. In voedings- en follikelcellen zijn met histologische technieken transportverschijnselen merkbaar; in het bijzonder de eerstgenoemde cellen dragen proteïnen, RNA en gevormde elementen aan de oöcyt over. Vervolgens neemt de terminale oöcyt massaal hemolymfeproteïnen in zich op, in het bijzonder van het vitellogenine; hieruit bouwt de oöcyt zijn dooierplasma op. Tenslotte vormen de follikelcellen achtereenvolgens de dooiermembraan die het eiplasma omsluit en het chorion, waarna de ovulatie plaatsheeft.

Vitellogenese als keten van processen De ovariolen zijn bij de Coloradoever van het telotrofe type. Men vindt in het vitellarium een vijftal follikels met hun primaire oöcyten, waarvan de laatste verreweg de grootste is. Door plasmastrengen met de trofocyten in het germarium verbonden, worden aan de vier proximale oöcyten diverse bouwstenen toegevoerd. De aanwezigheid van de door β -caroteen oranje-geel gekleurde dooier is echter pas in de voorlaatste oöcyt voor het eerst zichtbaar en in de terminale oöcyt wordt de grote massa van de eiwitrijke dooier afgezet. De verbinding met het germarium is dan al verbroken. Daarmee gaat gepaard, dat in de subterminale follikel de follikelcellen hun direct contact met de oölemma beginnen te verliezen; er ontstaat een intrafolliculaire ruimte, waarin zowel de oöcyt als de follikelcellen hun talloze microvilli uitsteken. Ook tussen de follikelcellen onderling ontstaan ruimten die de hemolymfe laten passeren.

Elektronenmicroscopisch is te zien hoe geprecipiteerde eiwitten zich op de oölemma afzetten. Tevens worden in de follikelcellen secretiegranula waargenomen die in binnenwaartse richting worden getransporteerd. Vermoed wordt, dat de secretiegranula mucopolysacchariden bevatten die bij de selectieve precipitatie van vitellogene eiwitten een rol spelen (figuur 4).

Door de oölemma worden nu pinocytoseblaasjes gevormd, waardoor de eiwitten in de vorm van vacuolen in het plasma van de oöcyt worden opgenomen. Vervolgens zien we een proces van concentratie optreden, waarbij de vacuoleblaasjes in korrels veranderen, die zich weer tot grotere granula verenigen, tot tenslotte het formaat van de normale dooierkorrel is bereikt. Binnen deze korrels zijn vaak eiwit-schijnkristallen zichtbaar.

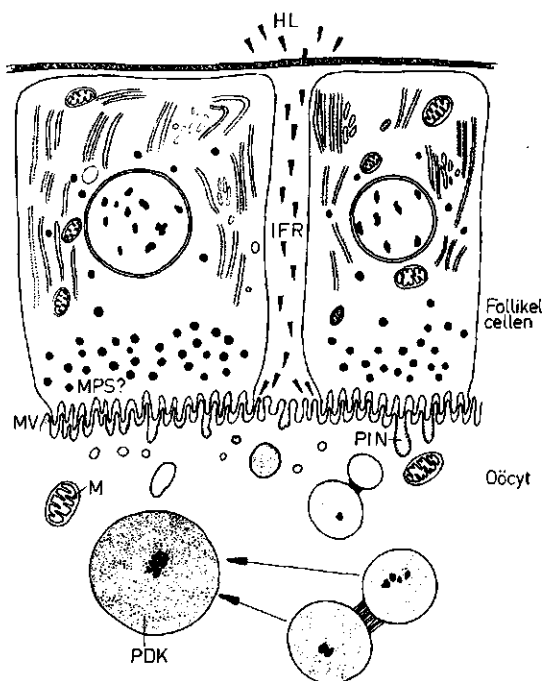


Fig. 4. De ultrastructuur van follikel en terminale oöcyt. De interfollikulaire ruimte (IFR) laat hemolymfe (HL) passeren. Aan de basis van de microvilli (MV) heeft in het oölemma pinocytose plaats. Het opgenomen eiwit is geprecipiteerd, wellicht met behulp van door de follikelcellen afgescheiden mucopolysaccharide (MPS). M = mitochondrion, PDK = proteïne-dooierkorrel. (Naar De Loof.)

Een eigen synthetische activiteit van de oöcyt wordt gesuggereerd door de concentrische lagen van RER die worden waargenomen; hoe deze synthese plaatsvindt is echter nog niet duidelijk. Aan het einde van de vitellogenese bestaat de massa van de oöcyt voor 17% uit eiwitten.

Elektroforetisch is door De Loof aangetoond, dat bij de Colorado-kever in het dooiereiwit alle langs deze weg aantoonbare hemolymfe-eiwitten worden teruggevonden. Twee eiwitten worden echter selectief sterker opgenomen dan de andere: het zogenaamde vitellogenine en een chromoproteïne. Deze beide maken respectievelijk 70 en 15% van het dooiereiwit uit, terwijl zij in de hemolymfe slechts respectievelijk 30 en

11% van het eiwitgehalte voor hun rekening nemen. Zij onderscheiden zich van de andere hemolymfe-eiwitten door hun hoog molecuulgewicht (meer dan 250 000). Het dooiervitelline is immunologisch identiek met het hemolymfe-vitellogenine.

De selectieve opname van het vitellogenine is het eerst door Telfer (1960) bij de zijdevlinder, *Hyalophora cecropia*, aangetoond. Vitellogenine is alleen bij vrouwelijke dieren aanwezig (vandaar de vroegere naam 'female protein') en dan nog alleen in de reproductieve toestand. Bij de Coloradokever betekent dit, dat zowel allatectomie als kortedagbehandeling de vorming van dit proteïne verhinderen. In plaats daarvan wordt een zogenaamd kortedagproteïne waargenomen, waarvan de synthese ophoudt zodra de JH-spiegel weer stijgt.

Voor een groot aantal insectensoorten is het bestaan van vitellogenine aangetoond en waar het het eerst afwezig leek (bijvoorbeeld *Drosophila*) is het recent ontdekt. Het wordt, evenals trouwens de andere hemolymfe-eiwitten, in het vetlichaam gesynthetiseerd en vrijwel onmiddellijk aan de hemolymfe afgegeven. Vandaar, dat men het in het vetlichaam in nauwelijks aantoonbare hoeveelheden vindt. Eén en ander is de laatste jaren door onderzoek van het vetlichaam in vitro onomstotelijk komen vast te staan. Na het bovenstaande is het niet verwonderlijk, dat het vitellogenine na ovariëctomie in de hemolymfe accumuleert.

Gedurende vele jaren werd aangenomen dat de follikelcellen bouwstoffen van de dooiersubstantie direct aan de oöcyt zouden doorgeven en nog heden ten dage treft men in de literatuur suggesties in deze richting aan. Aangezien echter bovengeschetste gang van zaken een sluitende verklaring geeft, en bovendien in toenemende mate steun vindt in de experimentele gegevens, zullen wij in ons verdere betoog hiervan uitgaan.

Tot slot nog het volgende: eiwitsynthese in het vetlichaam stelt de beschikbaarheid van aminozuren voorop, die weer uit proteïnerijke voeding moeten voortkomen. Dit veronderstelt op zijn beurt de aanwezigheid van proteasen in de darm, en een zodanig voedingsgedrag dat in een eiwitrijk dieet resulteert. Verder is het begrijpelijk dat een zó hoog-energetisch proces als de vitellogenese (de Coloradokever legt iedere 6 dagen zijn gewicht aan eieren) ondergeschikt is gemaakt aan diverse ecologische synchronisatie-mechanismen die de doeltreffendheid van deze energiebesteding verzekeren. Het ligt dus voor de hand, dat de

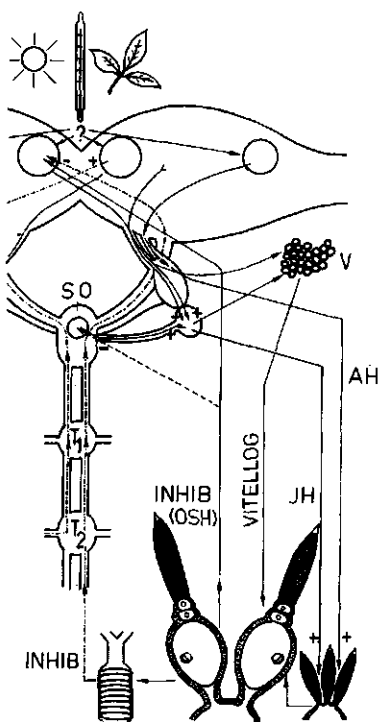


Fig. 5. Overzicht van een aantal exogene en endocriene effecten bij de oögenese gecombineerd uit gegevens bij verschillende insectesoorten verkregen. AH = activeringshormoon (neurosecretorisch hormoon), JH = juveniel hormoon, INHIB (OSH) = oöstatisch hormoon dat de successie van follikels regelt, INHIB = remmende werking van een in de vagina aanwezig eierpakket via de zenuwbaan reflectorisch naar de neurosecretorische centra geleid, v = vetlichaam.

endocriene regeling van de oögenese nauw in de homeostatische niveau-regulatie is geïntegreerd (figuur 5).

Endocriene regeling van de oögenese

Uitgangspunten De eerste aanwijzing voor endocriene regeling van de oögenese bij insecten werd gevonden in onderzoek van V.B. Wigglesworth (1936) met de wants *Rhodnius prolixus*.

Na decapitatie van tevoren gevoede wantsen werden in het telotrofe ovarium de volgende veranderingen geconstateerd:

- De oögenese wordt onderbroken op het moment, waarop de vitellogenese begint.
- De reeds ten dele gevitelliniseerde ova worden geresorbeerd; tegelijk met deze oösorptie degenereert de follikel.

Aangezien reïmpantatie van corpora allata de oögenese weer op gang brengt, was bewezen dat het corpus allatum hiervoor onmisbaar is. In latere onderzoeken met andere insektensoorten werd door een reeks van auteurs de afhankelijkheid van de oögenese van de activiteit van de corpora allata als regel bevestigd. De eerste differentiële extirpatie van de corpora allata werd door Weed (1936) bij de sprinkhaan *Melanoplus* verricht.

Uitzonderingen, zoals Phasmidae en Saturniidae, bleken te wijten aan bijzondere biologische omstandigheden. Bij Phasmidae werd het neotene karakter van de imago's, bij Saturniidae het vroege tijdstip in de ontwikkeling waarop de oögenese plaatsvindt (namelijk in de pupa) als verklaring aanvaard. In het onderzoek op mijn laboratorium met *Leptinotarsa* werd al vroeg een opvallende overeenkomst gevonden tussen de toestand van de ovariën van enerzijds kevers die van een langenaar kortedagbehandeling waren overgezet en anderzijds van gedecapiteerde, tevoren reproductieve *Rhodnius*-wifjes. De werkhypothese, dat kortedag de activiteit van de corpora allata zou verhinderen, lag voor de hand. Hierop is, toen deze hypothese bevestigd kon worden, ons verdere onderzoek gebaseerd.

Endocriene regeling van de vitellogenine-synthese Door experimenten in vitro uitgevoerd, o.m. met het vetlichaam van de kakkerlakken *Nauphoeta* en *Leucophaea*, is aangetoond dat toevoeging van actieve corpora allata of JH aan orgaanculturen van het vetlichaam een verhoogde afgifte van vitellogenine aan de mediumvloeistof veroorzaakt. In de meeste gevallen is de hormonale invloed op de vitellogeninesynthese nog alleen in vivo onderzocht, door middel van microchirurgische ingrepen en hormoon-toediening.

Bij *Leucophaea* wordt vitellogenine alleen door het vetlichaam van geslachtsrijpe wifjes gesynthetiseerd. Allatectomie verhindert de vitellogenine-synthese, evenals decapitatie of afsnoering van het abdomen. Worden na deze ingrepen actieve corpora allata geïmplantéerd of wordt

JH toegevoegd, dan wordt de vitellogenese op gang gebracht. Als JH wordt toegevoegd blijkt de opgebrachte dosis kwantitatief gerelateerd te zijn aan de synthesesnelheid van het vitellogenine. Bij *Leucophaea* schijnt dus JH als enige hormonale factor voldoende te zijn om de vitellogeninesynthese te induceren en is de cerebrale neurosecretie hierbij niet direct betrokken.

We zagen al eerder, dat bij *Rhodnius* de oögenese (en dus ook de vitellogenine-synthese) bij gedecapiteerde dieren kan plaatshebben nadat in de torso actieve corpora allata zijn geïmplanteerd. Hetzelfde geldt voor *Pieris brassicae* en voor de Tabakspijlstaart *Manduca sexta*. In andere gevallen (*Aedes*, *Calliphora*, *Leptinotarsa*, *Schistocerca*) kon worden aangetoond dat naast de activiteit van de corpora allata de cerebrale neurosecretie een afzonderlijk effect op de vitellogenese heeft, naast de adenotrope werking die de neurosecretie in het algemeen op het corpus allatum uitoefent. Voor *Calliphora* werd door E. Thomsen overtuigend aangetoond dat extirpatie van de M-NSC niet door implantatie van actieve corpora allata kon worden gecompenseerd. Zij meende een algemeen stimulerend effect van de cerebrale neurosecretie op de proteïnesynthese te moeten veronderstellen; maar, zoals op verschillende plaatsen in dit hoofdstuk blijkt, is deze opvatting door nieuwere gegevens achterhaald.

Nu zullen de effecten beschreven worden van verschillende microchirurgische ingrepen op de samenstelling en de concentratie van hemolymfeproteïnen in het algemeen, omdat hieruit zo duidelijk blijkt dat gedachtengangen, die later onjuist bleken te zijn, toch het vinden van een sluitende oplossing kunnen vergemakkelijken.

Onderzoek van Highnam en medewerkers in Sheffield, met *Schistocerca* uitgevoerd, leidde tot het vermoeden dat de proteïneconcentratie in de hemolymfe wel eens regulerend zou kunnen werken op de activiteit van het corpus allatum. Na ovariëctomie werd het volume van het corpus allatum vergroot en steeg het eiwitgehalte van de hemolymfe aanzienlijk. Werd vervolgens allatectomie toegepast, dan steeg het eiwitgehalte eveneens, hetgeen werd toegeschreven aan het uitvallen van de opnamecapaciteit van het ovarium, dat door allatectomie wordt geïnactiverd.

Vervolgens werd door Minks in Wageningen bij *Locusta* gevonden, dat na ovariëctomie het vitellogene proteïne zich selectief in de bloedvloeistof ophoopt, terwijl het na allatectomie weer verdwijnt.

De Coloradokever bleek zich later wel in het bijzonder goed voor dit onderzoek te lenen, om redenen die reeds bij de homeostase zijn vermeld. Toen de Loof proeven analoog aan die van Minks, met bij langedagbehandeling opgekweekte *Leptinotarsa*-wijfjes uitvoerde, bleek na allatectomie niet alleen het gehalte aan vitellogenine in de hemolymfe te verminderen, maar bovendien kwam daarvoor in de plaats de synthese van enkele proteïnen die ook bij een kortedagbehandeling werden geproduceerd. Deze beide typen eiwitten vormden dus zeer goede indicatoren voor de activiteit van het corpus allatum; ovariëctomie heeft op hun synthese kwalitatief geen invloed. Indien de Sheffield-groep naast het totale proteïnegehalte in het bloed ook de kwalitatieve samenstelling had bestudeerd, zou hun hypothese anders hebben geluid.

In het eerdergenoemde onderzoek van De Loof werd overigens ook gevonden dat naast actieve corpora allata of geïnjiceerd JH ook een actief cerebraal ganglion nodig is voor de vitellogenine-synthese.

De gedachte, dat vitellogenine in het vetlichaam wordt gesynthetiseerd, terwijl in de terminale oöcyt hieruit het vitelline wordt geassembleerd, begint de laatste tijd plaats te maken voor de gedachte, dat beide processen in het vetlichaam plaatsvinden, terwijl kant en klare vitelline door het bloed aan de follikel wordt toegevoerd. Dit komt voort uit het werk van de Wyatt-groep en van Engelmann. Het blijkt dat in de cisternen van het ruw endoplasmatisch reticulum van de cellen van het vetlichaam vitellogenine (260 000 dalton; 1 dalton = $1,66 \times 10^{-27}$ kg) wordt afgegeven, dat als het eerste translatieprodukt moet worden beschouwd. Vervolgens wordt hieruit een lipo-glycoproteïde van 550 000 dalton gevormd, dat het vitelline is, dat in hemolymfe en oöcyt wordt aangetroffen.

De rol van de follikelcellen als ecdyson-producenten Het eerst bij *Aedes*, maar later ook bij *Locusta* en *Bombyx*, is aangetoond dat de follikelcellen tijdens de vitellogenese α -ecdyson synthetiseren. Bij *Locusta* is dit hormoon niet in het bloed van adulte dieren aangetroffen en bestaat de veronderstelling dat het binnen de follikel blijft en rechtstreeks naar de oöcyt wordt doorgegeven. Inderdaad bevatten de eieren α -ecdyson. Bij *Bombyx mori* heeft de vitellogenese in het popstadium plaats. De ovariën synthetiseren ecdyson, dat in de laatste helft van de pupale periode als een afzonderlijke piek in de hemolymfe-titer aantoonbaar is. Het was reeds bekend dat in de eieren van *Bombyx* reeds

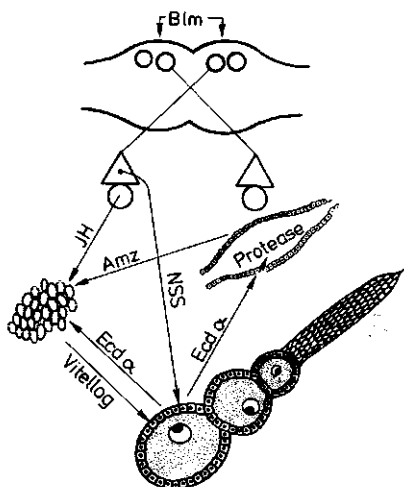


Fig. 6. Overzicht van de regeling van de vitellogenese bij de steekmug *Aedes aegypti*. Na een bloedmaaltijd (Blm) wordt neurosecretorisch (NSS) de follikel tot het vormen van α -ecdyson ($Ecd \alpha$) aanzet. Hierdoor wordt de eiwitvertering in de darm gestimuleerd. Uit de hierdoor beschikbaar komende aminozuren (Amz) synthetiseert het vetlichaam vitellogenine (Vitell), hierdoor door het ecdyson aanzet. (Naar Hagedorn & Lea, 1976).

tijdens zéér vroege embryonale stadia hydrofiele conjugaten van ecdysonen worden aangetroffen. Over de betekenis hiervan bestaan alleen vermoedens.

Beter zijn we geïnformeerd over de rol van α -ecdyson bij de vitellogenese van *Aedes*, dank zij het onderzoek van Hagedorn en Lea (figuur 6). Het was al geruime tijd bekend dat bij muskieten de activiteit van de cerebrale M-NSC, via het corpus cardiacum, naast het JH onmisbaar is voor de oögenese. Bij de gelekoorts-muskiet *Aedes* is een bloedmaaltijd vereist om de oögenese op gang te brengen. Deze bloedmaaltijd stimuleert de neurosecretorische activiteit van het cerebrale ganglion.

Wordt nu een dergelijk geactiveerd cerebraal ganglion in cultuur gebracht tezamen met ovariën van niet met bloed gevoede dieren, dan wordt door deze laatste α -ecdyson gesynthetiseerd en aan het cultuurmedium afgegeven. Dit ecdyson zou nu vervolgens twee functies hebben:

— De vorming van protease in de middendarm wordt bevorderd. Na

ovariëctomie blijft de trypsine-activiteit uit en kan door injectie van α -ecdysone op gang worden gebracht.

— Het α -ecdysone brengt de vitellogenine-synthese in het vetlichaam op gang.

Beide effecten zouden afhankelijk zijn van de aanwezigheid van JH, dat ovariën en vetlichaam 'competent' zou maken om respectievelijk op het hersenhormoon en op α -ecdysone te reageren.

Endocriene regeling van de ovariole-activiteit Na allatectomie worden bij de Coloradokever in hoofdzaak de volgende verschijnselen aan de ovariole waargenomen: In de terminale oöcyt begint na 12-14 dagen de oösorptie, die ongeveer op de 20e dag is beëindigd. Lysosoomachtige lichamen, die tussen de dooierkorrels gelegen zijn, brengen hun inhoud naar buiten en lossen een groot gedeelte van de eiwitrijke dooier op (figuur 7). De oöcyt wordt kleiner, met het gevolg dat zijn follikelcellen een onregelmatige dubbellaag gaan vormen. Naarmate de oöcyt verder inschroept en tenslotte geheel autolyseert, worden de follikelcellen meer pycnotisch en gaan tenslotte ten gronde. Ook de subterminale follikel verdwijnt op deze wijze, wanneer zijn inhoud al enigszins is gevitelliniseerd. Aan het einde van de oösorptie zijn in het vitellarium nog slechts een of twee jonge follikels aanwezig. Wanneer wij vrouwelijke Coloradokevers die bij langedag zijn voortgekweekt overbrengen naar kortedag, dan worden dezelfde oösorptieverschijnselen waargenomen als die optreden na allatectomie.

Worden bij kevers die bij kortedag zijn opgekweekt en in diapauze zijn gegaan de ovariën geïnspecteerd, dan is het germarium significant kleiner dan bij actieve, langedagwijfjes; op welk effect dit berust is onbekend. Het vitellarium is als regel nauwelijks ontwikkeld en bevat alleen bij uitzondering een jonge follikel.

Uiteraard blijft, zowel na allatectomie als bij kortedagbehandeling, de vorming van vitellinemembraan en chorion achterwege. Ook heb ik nooit waargenomen dat na deze behandelingen oösorptie optreedt bij ovariole-eieren die reeds volledig door de eivliezen waren omhuld.

Al eerder werd vermeld, dat bij ovariën van *Rhodnius* is waargenomen, dat de terminale follikelcellen onder invloed van het JH uiteenwijken en de endofollikulaire ruimte vrijmaken. Hierin profileert vervolgens de oöcyt, waarvan de oölemma zijn microvilli in de ruimte uitsteekt. Bij *Aedes aegypti* is gevonden, dat deze proliferatie optreedt

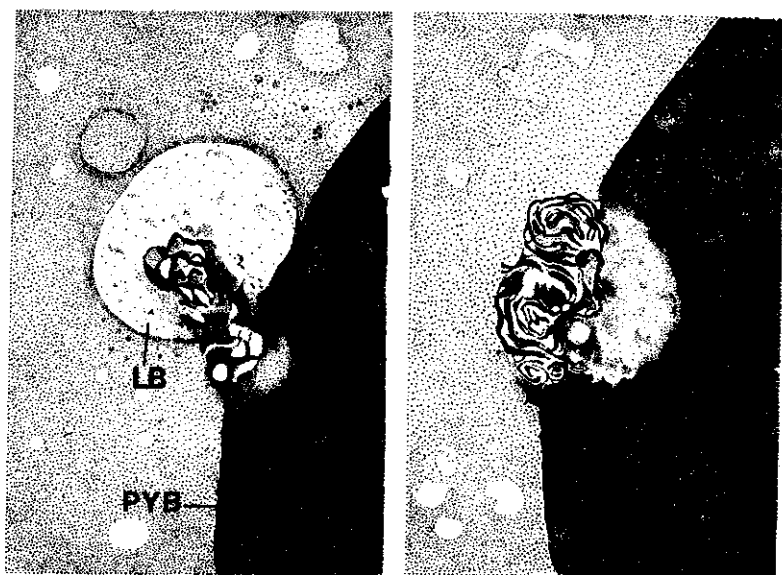


Fig. 7. Twee stadia van een lysosoomachtig lichaam (LB) dat tijdens de oösorptie als gevolg van een lage JH-titer een dooierkorrel (PYB) proteolytisch afbreekt.

onder invloed van het juveniel hormoon. Hiermee stemt overeen, dat bij de Coloradokever na allatectomie de proliferatie van de oöcyt spoedig verdwijnt.

Imaginale diapauze als pseudo-allatectomie

Wanneer bij de Coloradokever de corpora allata worden weggenomen, wordt een reeks van gebeurtenissen ingeleid die veel lijkt op die, welke na kortedagbehandeling wordt waargenomen. De kever neemt veel voedsel op, maar de ovipositie heeft niet plaats of wordt na korte tijd gestaakt. De ovarieën zijn of gaan in regressie, zoals in de vorige paragraaf werd beschreven. Er vormt zich een uitgebreid vetlichaam dat door vulling met proteïnekorrels bleek van kleur is. Vervolgens graaft de kever zich in de bodem in en gaat in rust. Het zuurstofverbruik is tot minder dan 20% van de vroegere intensiteit gedaald.

Door Stegwee en De Kort is de oorzaak van deze sterke daling van

de ademhalingsactiviteit nader onderzocht. Het rustmetabolisme van gevleugelde insecten komt in belangrijke mate voor rekening van de vliegspieren met hun reuzenmitochondriën, de sarcosomen. Nu bleek, dat onder kortedagbehandeling, respectievelijk na allatectomie, de vliegspieren atrofie gaan vertonen, zodat, wanneer de diapauze is begonnen, de sarcosomen goeddeels zijn verdwenen of sterk zijn gereduceerd. De Kort bepaalde gedurende de prediapauze (waarin de vliegspieren zich aanvankelijk ontwikkelen maar daarna in regressie gaan), de activiteit van een aantal enzymen van het energiemetabolisme in de vliegspieren, parallel met de ultrastructuur van deze spieren. Hij kwam tot de conclusie, dat de activiteit van mitochondriale enzymen als succinaatdehydrogenase en α -glycerofosfaat-oxydase tijdens de degeneratie van de sarcosomen een scherpe daling vertoonden, terwijl plasmatische, extramitochondriale enzymen als glyceraldehydefosfaat-dehydrogenase en glycerol-dehydrogenase veel geleidelijker van activiteit veranderen.

Tegen het einde van de diapauze worden de vliegspieren opnieuw gesynthetiseerd, zodat, wanneer de Coloradokever bovengronds verschijnt, hun structuur weer is hersteld.

Merkwaardig is, dat bij een insect als de meeltor na allatectomie alleen stilstand van de reproductie optreedt; het loopgedrag en de ademhalingsintensiteit blijven onveranderd. De vliegspieren van *Tenebrio* zijn minder goed ontwikkeld dan die van *Leptinotarsa*, maar de structuur blijft na allatectomie intact.

Het is verleidelijk te trachten verschillen op te sporen tussen de diapauzeconditie van allatectomie- en kortedagdieren. Een markant verschil is, dat allatectomiediapauze nooit spontaan of door externe factoren verbroken wordt. We hebben op mijn laboratorium dergelijke Coloradokevers gedurende meer dan $1\frac{1}{2}$ jaar in rivierzand in diapauze kunnen houden; ze bleven tot hun dood in het substraat ingegraven. Dit verschil is op zichzelf niet verwonderlijk. Wel merkwaardig was het verschil in reactie op implantatie van actieve corpora allata. Terwijl bij Coloradokevers die na allatectomie in diapauze waren gegaan implantatie van twee paren corpora allata afkomstig van reproductieve dieren voldoende was om de rusttoestand te verbreken, was dit bij kortedagdiapauze zeer veel moeilijker. Toen het aantal tot 10 was opgevoerd, werd tenslotte een kortdurende reactivatie waargenomen. In de volgende paragraaf zal blijken waarop dit verschil berust.

Tot slot dient nog te worden vermeld, dat manipulaties met de

corpora allata kunnen worden vervangen door behandeling met JH, hetgeen enkele verrassende uitkomsten heeft opgeleverd. Geheel volgens de verwachting was gebleken dat de diapauze kon worden verbroken door toediening van vrij hoge doses JH. Blijkens het onderzoek van Schooneveld en medewerkers resulteert dit alleen in een kortdurende activering wanneer de dieren onder kortedagomstandigheden worden gehouden. Wordt daarentegen overgegaan op langedag, dan resulteert een normale ovipositietijd van ca. zes weken.

Uit histologisch onderzoek bleek, dat de cerebrale neurosecretie bij diapauzedieren reeds 1 dag na de JH-behandeling op gang wordt gebracht. Er is dus sprake van een positieve terugkoppeling (feedback) van de JH-titer op de neurosecretie! Daarnaast bleek ook, dat de eigen corpora allata van de behandelde Coloradokevers niet in grootte toenamen; zij bleven op het diapauzeniveau, wat inactiviteit suggereert. Ze zijn trouwens niet essentieel voor het bovengenoemde activeringsproces; de JH-behandeling is even werkzaam wanneer ze worden geëxtirpeerd. Dit suggereert dat, naast de verhoging van de JH-titer de activering van de M-NSC essentieel is voor het verbreken van diapauze.

Een enkel woord dient nog gewijd te worden aan de situatie bij mannelijke Coloradokevers. Diapauzegegedrag en stofwisselingsverlaging zijn ook hier bij kortedag en allatectomie praktisch gelijk, maar na allatectomie bij langedag treedt gedurende de prediapauze copulatie op, terwijl die bij kortedag achterwege blijft.

Ten aanzien van de reactivering gelden dezelfde verschillen als bij het vrouwelijke dier. Wat de reproductie betreft, is het vooral de activiteit van de accessorische geslachtsorganen die de aandacht vraagt. Lengte en doorsnede van deze langgerekte klieren worden door kortedagbehandeling en allatectomie beide aanzienlijk verminderd, en ook de ultrastructuur wijst op inversie. Ten aanzien van de testes worden zulke effecten niet gevonden.

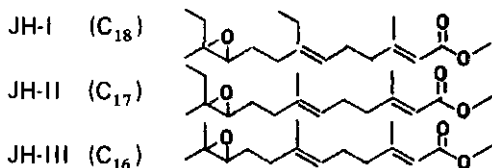
Kortedagdiapauze is dus bijna identiek met het allatectomiesyndroom, maar niet geheel; de term pseudo-allatectomie wordt dan ook niet ten onrechte gebruikt.

Uit het voorgaande blijkt, dat het in de inleiding gestelde probleem in hoofdzaak is terug te brengen tot de invloed van het milieu op de homeostatische regeling van de JH-concentratie in het bloed. Daaraan zal de volgende paragraaf zijn gewijd.

De titer van het juveniel hormoon en zijn regulatie

We komen nu tot de essentiële vraag: wordt de titer van het juveniel hormoon (JH-titer) in beide toestanden — reproductie en diapauze — op een verschillend niveau gereguleerd en zo ja: hoe wordt de 'hormostaat' ingesteld? Hiermee is verbonden de vraag, of de gevonden JH-titer een fysiologische betekenis heeft, en welke mechanismen er zijn om de regulatie te bewerkstelligen. Het antwoord op deze vragen blijkt ingewikkelder te zijn dan wij aanvankelijk hadden kunnen vermoeden.

Men kan het JH-gehalte in de hemolymfe bepalen door middel van biologische toetsen; men krijgt dan een waarde die de JH-activiteit weergeeft, maar men kan op deze wijze de aard van de werkzame juveniel hormonen niet leren kennen. We onderscheiden er tegenwoordig drie, die alle biologisch actief zijn.



Langs gaschromatografische weg kan men de hoeveelheden van deze drie hormonen (in ng) naast elkaar bepalen.

Door Trautmann is vastgesteld dat de volwassen Coloradokever in hoofdzaak JH-III bevat. Met behulp van de Galleria-toets hebben we zowel bij korte- als bij langedagdieren de JH-titer in de loop van het imaginale leven gevolgd. Parallel daarmee werd het volume van de corpora allata bepaald. Zoals uit figuur 8 blijkt, is er na ontpopping in beide gevallen een initiële stijging van de JH-titer waarneembaar; daarna is er duidelijk sprake van twee niveaus, die zijn gecorreleerd met processen die karakteristiek zijn voor de twee fysiologische toestanden: reproductie en diapauze. Deze correlatie suggereert dat de bepaalde titer ook inderdaad een fysiologische betekenis heeft.

Vervolgens werd de vraag gesteld: welk aandeel hebben de snelheden van hormoonafgifte en -afbraak in de regulatie van de JH-titer? Wat de produktiesnelheid betreft hadden we aanvankelijk alleen indirecte maatstaven; er waren aanwijzingen dat de grootte van het corpus allatum toeneemt bij stijgende activiteit. Sinds kort weten we dat de snelheid

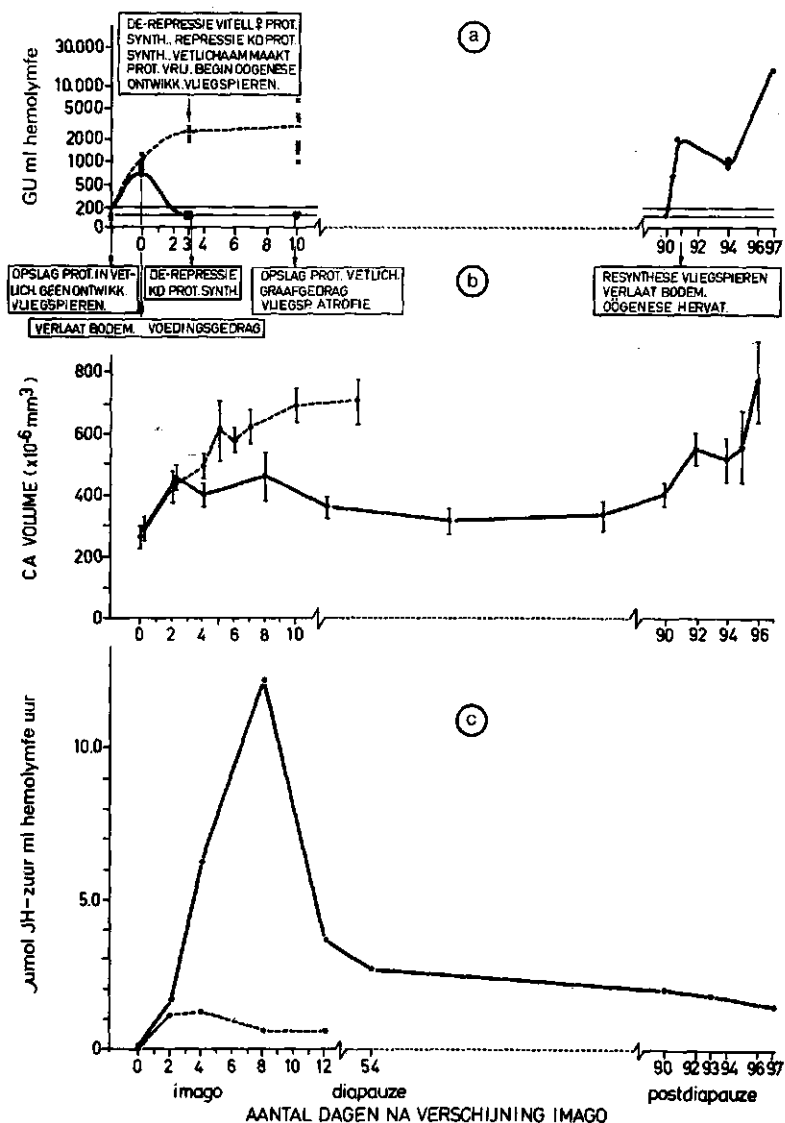


Fig. 8. De JH-titer bij de Coloradokever in twee toestandsniveaus.

a. De JH-titer in de hemolymfe.

b. Het volume van de corpora allata (maatstaf voor de incretorische activiteit).

c. De activiteit van de specifieke JH-esterase (maatstaf voor de afbraaksnelheid).

Onderbroken lijn: langedagbehandeling. Getrokken lijn: kortedagbehandeling.

van de JH-synthese de beste maatstaf is voor de snelheid van afgifte, aangezien de klier slechts zeer weinig JH-opslagcapaciteit bezit. De door Tobe en Pratt ontwikkelde methoden om in vitro de synthese-activiteit bij geïsoleerde corpora allata te meten, zullen ons naar verwachting binnenkort meer directe gegevens opleveren. De door Schooneveld en medewerkers verrichte metingen van het CA-volume, waaruit bleek dat toediening van JH de klier in regressie deed gaan, stemmen hoopvol ten aanzien van de feedback-relaties die daarbij zullen worden aangetroffen. De snelheid van inactivering van JH in de hemolymfe bleek zeer groot te kunnen zijn: 'half-life'-waarden van 25 minuten werden bij kamertemperatuur vastgesteld. Wij realiseerden ons echter, dat er alleen sprake kon zijn van regulatie, wanneer er tussen de JH-titer en de snelheid van secretie en inactivering een negatieve terugkoppeling zou bestaan.

Het werd nu interessant, de afbraakmechanismen nader te analyseren en het verloop van hun activiteit bij korte- en langedagdieren gedurende het imaginale leven te vervolgen. Onderzoek van Kramer en De Kort heeft het volgende resultaat opgeleverd:

Van de verschillende afbraakmechanismen van JH waarover een insect beschikt, namelijk microsomale oxydatie, epoxy-hydratase en carboxy-esterasen, bleken de carboxy-esterasen bij de Coloradokever verreweg het meest actief te zijn. Daarbij bleek de activatie van JH-specifieke esterase het duidelijkst verband te houden met de fysiologische toestand van het dier en de gemeten JH-titer. Een K_m -waarde van 5×10^{-7} mol l^{-1} kon worden vastgesteld. In figuur 9 is de activiteit van deze esterase in de loop van het imaginale leven in beide toestanden weergegeven. Daarbij blijkt het volgende: volgens verwachting is de JH-esterase activiteit bij langedagbehandeling laag. Bij kortedagbehandeling stijgt de activiteit in de initiële fase tijdelijk tot hoge waarden, maar neemt wanneer de diapauze eenmaal heeft doorgezet, weer af. Vergelijking met de JH-titer suggereert, dat de 'hormostaat' die de JH-esterase-activiteit regelt, een feedback-relatie met de titer impliceert, en op twee niveaus kan worden ingesteld. Bij een langedagbehandeling is bij een hoge JH-titer de esterase-activiteit laag; de hormostaat is weinig gevoelig voor de JH-titer. Bij een kortedagbehandeling is de hormostaat zeer gevoelig; reeds bij lage JH-titers ontstaat een hoge esterase-activiteit. Wanneer tenslotte de JH-titer tot zeer lage waarden daalt die kennelijk beneden de grens van het waarneembare liggen, loopt de esterase-activiteit weer terug. Het is van belang hier te vermelden, dat inderdaad

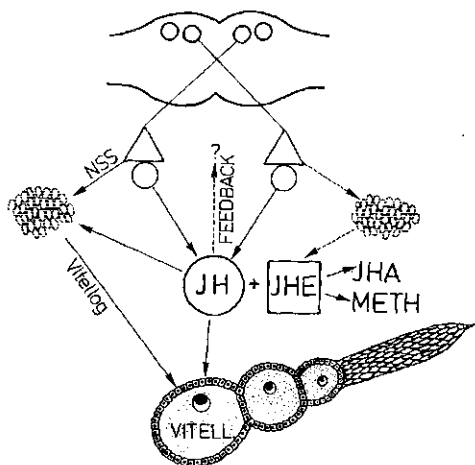


Fig. 9. De regeling van de JH-titer via de snelheid van insecretie (getrokken lijn) en de snelheid van synthese van JH-esterase (JHE) (onderbroken lijn) bij de Coloradoever, benevens enkele effecten van deze titer. NSS = neurosecretorische substantie, Vitell. = vitellogenine.

toediening van JH gedurende de kortedagdiapauze de JH-esterase-activiteit onmiddellijk weer doet stijgen!

Deze gegevens maken het begrijpelijk dat in onze implantatieproeven zo'n groot aantal corpora allata vereist was om de diapauze zelfs maar tijdelijk te verbreken. Dergelijke implantaties doen bij kortedagdiapauze de JH-afbraak in snel tempo stijgen, en elimineren dus hun activerende effect. Hier ligt nu juist het verschil tussen allatectomie-diapauze en kortedag-diapauze. Bij een allatectomie-diapauze is de JH-titer eveneens sterk verlaagd, maar wanneer deze door toediening of implantatie verhoogd wordt, treedt geen stijging van de JH-esterase-activiteit op. Het ligt voor de hand, de JH-perceptie, respectievelijk de afgifte van de esterase-inducerende factor, te lokaliseren in de postcerebrale klieren.

Dat het cerebrale ganglion een rol speelt bij de inductie van JH-esterase-activiteit wordt gesuggereerd door werk van Retnakaran en Joly, die na cauterisatie van de neurosecretorische A- en B-cellen een sterke daling van de JH-esterase-activiteit meenden waar te nemen. Reeds eerder was door Girardie gevonden dat deze operatie sommige effecten van het corpus allatum lijkt te ondersteunen. Het feit, dat na ligatuur van de

kop de persistentie van JH in de Coloradokever sterk wordt vergroot, en dat na deze behandeling bij diapauzekevers de JH-esterase-activiteit niet meer op toediening van JH reageert, vormt een verdere aanwijzing in deze richting. De lokalisatie van de 'hormostaat' lijkt nu binnen het bereik van het onderzoek te zijn gekomen.

De JH-esterase wordt in het vetlichaam gesynthetiseerd. Hier worden (figuur 9) eveneens andere bloedproteïnen gevormd, o.m. een lipoproteïne met een molecuulgewicht groter dan 10 000, dat het C_{18} -JH kan binden en als 'transport-proteïne' moet worden opgevat. Hierdoor is enerzijds het transport van het in water moeilijk oplosbare JH in de hemolymfe verzekerd, en anderzijds beschermt het 'carrier protein' het JH in zekere mate tegen het effect van JH-esterase. De affiniteit tot het JH is bij de Coloradokever laag, maar de bindingscapaciteit hoog. Men moet zich waarschijnlijk voorstellen dat de 'carrier protein'-moleculen in de nabijheid van het corpus allatum de vrijkomende JH-moleculen wegvangen. Veel bescherming tegen JH-esterase zullen ze echter niet bieden, getuige de korte 'half-life'-tijd van JH in de hemolymfe.

Van kosmische oorzaak tot subcellulair gevolg

Van buiten- naar binnenwereld strekt zich een lange keten van relaties uit. De daglengte, uit de constellatie van planeten voortkomend, wordt door de hersenen van de Coloradokever geregistreerd. Dit berust op een mechanisme, dat op vrijblijvende wijze in het cerebrale zenuwstelsel is ingebouwd. Een insect als de meeltor mist dit mechanisme en het verdwijnt bij de Coloradokever in sommige levensfasen, bijvoorbeeld direct na het verbreken van de winterrust. De respons t.a.v. de daglengte is zódanig, dat een smal kritisch gebied twee typen van daglengte-inductie scheidt. Langedag induceert in hoofdzaak reproductie, kortedag-diapauze. Het kritische gebied is zó smal, dat er bijna sprake is van een alles-of-niets effect. Langedag activeert neurosecretorische cellen en stelt tegelijkertijd de 'hormostaat' van de JH-titer op hoog niveau in. Bijgevolg worden de corpora allata geactiveerd en is hun produkt, het JH, aan langzame afbraak onderhevig. De resulterende hoge JH-titer, tezamen met een of meer neurosecretorische hormonen van het cerebrale ganglion, brengt de vitellogenese op gang, terwijl tevens de voedingsactiviteit dit proces ondersteunt. De JH-activiteit onderhoudt de cere-

brale neuro-secretie, wat een 'bufferend' effect heeft bij overgang naar kortedag.

Onder invloed van kortedag wordt de 'hormostaat' van het JH laag ingesteld; een geringe JH-titer is al in staat een hoge afbraaksnelheid te bewerkstelligen. Het heeft er alle schijn van dat de lage initiële JH-titer cerebrale neurosecretorische activiteit induceert van een type dat de synthese van JH-esterase in het vetlichaam induceert. De JH-titer daalt nu tot zeer lage waarden, beneden het minimum perceptibile van het regulatiesysteem. Als gevolg daarvan is er geen vitellogenese maar in plaats daarvan wordt 'kortedag-proteïne' gevormd en daalt de synthese van JH-esterase tot zeer lage waarden. Het vitellarium van de ovariolen gaat in regressie en het graafgedrag gaat over tot rust.

In het voorgaande zijn enkele subcellulaire componenten opgesomd van de twee toestanden die door de daglengte worden geïnduceerd. Ik vermeldde al eerder de teruggang van de synthese van mitochondriale enzymen die door De Kort gedurende de vliegspier-atrofie bij kortedagkevers was geconstateerd. Bartelink, die dit onderzoek voortzette, vond dat toediening van JH bij prediapauze-kevers tot resultaat had dat de ¹⁴C-leucine-incorporatie in de geïsoleerde sarcosomen van deze kevers significant werd verhoogd. De eiwitsynthese in de sarcosomen wordt dus in een bepaalde fase door de JH-titer in het bloed reversibel beïnvloed.

Aldus reageert de Coloradokever; een insect als de meeltor heeft zijn gedrag en vliegspierstructuur niet onder de controle van JH gesteld en bij schorskevers wordt juist door een hoge JH-titer de vliegspier-atrofie veroorzaakt. De 'boodschap' die een hormoon overbrengt is een functie van de 'ontvangende' weefsels.

Tussen astronomische oorzaak en subcellulair gevolg ligt de homeostatisch gestuurde JH-titer. Dat temperatuur en voedselkwaliteit effecten hebben die volkomen analoog zijn aan die van de daglengte, bewijst dat informatie van zeer verschillende aard, neuro-endocrien geïntegreerd, hetzelfde homeostatische centrum bespeelt. De vrijblijvendheid van sommige correlaties bij vergelijking van verschillende insectensoorten wijst erop, dat de ecologische niche voor iedere soort zijn diepgaande fysiologische consequenties heeft.

Synchroniserende signalen bij de voortplanting

In het voorafgaande zijn signaaleffecten behandeld die bepaalde fysiologische toestanden opwekken. Er zijn echter ook signaaleffecten die, hoewel zij niet leiden tot het ontstaan van gecompliceerde syndromen, als voorwaardelijke prikkel fungeren bij bepaalde detailprocessen: oögenese, ovulatie, ovipositie. Factoren als balts, substraateffecten en inseminatie komen daarbij aan de orde. De balts, met zijn ingewikkeld spel van bewegingspatronen en feromonen, heeft tot functie het synchroniseren van de partners. Daarbij is in diverse gevallen gebleken dat gedurende de balts de activiteit van de corpora allata wordt verhoogd, hetgeen weer een voorwaarde is voor feromoonproductie en oögenese.

In vele gevallen is ook de opname van proteïnerijk voedsel een voorwaarde voor de oögenese. Daarbij fungeert het voedsel lang niet altijd als voedingsmiddel. Vaak zijn voldoende reservestoffen aanwezig, maar proteïnegebrek veroorzaakt pseudo-allatectomie die in dit geval geen diapauze maar alleen steriliteit tot gevolg heeft. Het effect loopt primair via de cerebrale neurosecretie. De copulatie is dikwijls (maar niet altijd) een voorwaarde voor de ovulatie. Hier kan óf de mechanische prikkel van de copulatie, óf de vulling van de vrouwelijke spermatheca, óf de seminale vloeistof, en soms combinaties hiervan, het signaal vormen dat de cerebrale neurosecretie activeert.

De eiafzetting wordt dikwijls bepaald door signalen uit het ovipositie-substraat die eveneens via het neuro-endocriene stelsel worden doorgegeven. Ook bij deze 'detail-signalen' geldt de vrijblijvendheid die in de vorige paragraaf is gesignaleerd. Het voorkomen van 'trigger-mechanismen' kan per soort verschillen, als onderdeel van de niche.

Involed van neuropeptiden op het gedrag van zoogdieren

Tj.B. van Wimersma Greidanus en D. de Wied

Het zenuwstelsel en het endocriene systeem

Zoals ondermeer ter sprake kwam in het hoofdstuk van Joosse, beschikt het diertlijk organisme over twee belangrijke communicatiesystemen: het zenuwstelsel en het endocriene systeem. Beide spelen een rol bij de waarneming en verwerking van informatie en garanderen de 'homioestasis' waar onder wordt verstaan het met elkaar in evenwicht zijn van alle biofysiologische functies in het lichaam.

Het zenuwstelsel is het geheel van zenuwcellen met hun uitlopers (zenuwvezels), dat de via receptoren binnenkomende informatie van het externe en interne milieu integreert en coördineert en de daarbij behorende signalen naar de daarvoor in aanmerking komende structuren doorgeeft. Indien nodig wordt gedeeltelijk verwerkte informatie opgeslagen als geheugen. Het endocriene systeem bestaat uit weefselstructuren en klieren die hormonen produceren en direct aan de bloedbaan afgeven. Door hun sterke doorbloeding beschikken de endocriene klieren over een constante informatie omtrent het interne milieu en zijn zij in staat tot de vereiste bijsturingen. De hormonen functioneren, specifiek dan enig ander bestanddeel in het bloed, als chemische boodschappers bij de coördinatie en integratie van vele levensfuncties.

De laatste jaren staat het onderzoek naar de relatie tussen het zenuwstelsel en het endocriene systeem in het centrum van de belangstelling. Enerzijds is het zenuwstelsel in staat controle uit te oefenen op het endocriene systeem en anderzijds blijken hormonen een directe invloed uit te oefenen op het zenuwstelsel. Wijzigingen in zowel het interne als externe milieu blijken in staat te zijn om functionele veranderingen in het organisme te veroorzaken via hormonen van de hypofyse.

ACTH

De periodiciteit in het seksueel gedrag wordt bij vele vertebraten bepaald door veranderingen in de omgeving, zoals de verhouding in de tijdsduur van licht en donker gedurende het etmaal, de temperatuur, de voedselvoorziening en sociale contacten. Het is bekend dat bij sommige dieren, zoals het konijn en de kat, de ovulatie geïnduceerd wordt door de paring of door een vergelijkbare vorm van seksuele opwinding. Bij de mens is bekend dat de menstruele cyclus verstoord kan worden door veranderingen in de omgeving en door geestelijke spanningen. Omdat de functies die samenhangen met de voortplanting direct afhankelijk zijn van de hormonen die geproduceerd worden door de geslachtsorganen en omdat de functionele activiteit van deze geslachtsorganen (gonaden) bepaald wordt door de gonadotrope hormonen van de hypofyse, is het duidelijk dat de omgevingsinvloeden op de voortplanting via de hypofyse tot stand komen.

De plotselinge sterke afgifte van hormonen door de bijnierschors als reactie op emotionele stimuli, zoals intens licht, plotselinge temperatuurveranderingen, geluid, vreemde omgeving, pijn en in het algemeen elke situatie die resulteert in angst, frustratie of woede, is veelvuldig beschreven. Aangezien de functionele toestand van de bijnierschors wordt gereguleerd door het uit de hypofyse afkomstige ACTH, het adrenocorticotrope of bijnierschorsstimulerende hormoon, hebben genoemde stimuli kennelijk een invloed op de hypofyse.

Studies bij verschillende soorten vertebraten hebben tot de conclusie geleid dat de hypothalamus een belangrijk eindstation is voor de ontvangst van informatie uit de omgeving en dat de hypothalamus deze informatie tevens vertaalt in chemische boodschappers, de neurohormonen. Deze neurohormonen (Engels: releasing hormones) vertalen neurale impulsen in een biochemische respons en kunnen, na via de portale vaten van de hypothalamus naar de adeno-hypofyse (zie het hoofdstuk van Jooisse) getransporteerd te zijn, de synthese en/of afgifte van bepaalde hypofysehormonen bevorderen of remmen. Ook voor de afgifte van het ACTH denkt men te maken te hebben met een dergelijk neurohormoon en men heeft aanwijzingen dat dit een peptide is. Eén van de mogelijke kandidaten voor de neurohormonen die de afgifte van ACTH regelen is het vasopressine. Dit is een hypothalamisch hormoon dat zijn naam te danken heeft aan zijn vermogen om bloedvaten te vernauwen en zo-

doende de bloeddruk te laten stijgen, maar dat veel belangrijker is voor de terugresorptie van water uit de nier naar de bloedbaan.

Het centrale zenuwstelsel blijkt dus in staat om via de factoren uit de hypothalamus en via hun invloed op de hypofyse, een regelende invloed uit te oefenen op het endocriene systeem. Maar tevens blijken hormonen dus op hun beurt weer een invloed te hebben op het centrale zenuwstelsel.

Onderzoek naar de invloed van hormonen op gedrag

Hormonen afkomstig uit vele endocriene klieren en organen beïnvloeden het centrale zenuwstelsel, hetgeen tot uiting komt in elektrofysiologische en/of biochemische veranderingen in de hersenen. Het is gebleken dat zowel neurohypofysaire als adenohypofysaire hormonen in dit opzicht werkzaam zijn en karakteristieke effecten op het centrale zenuwstelsel vertonen.

Het gedrag van mens en dier komt tot stand als functie van het centrale zenuwstelsel en met name het gedrag dat bepaald wordt door omgevingsvariabelen is in dit opzicht een goed voorbeeld. Om deze reden werd door ons in de afgelopen 15 jaar op het Rudolf Magnus Instituut in Utrecht als model voor de centrale werking van hormonen, de invloed bestudeerd van diverse hypofysaire hormonen op verschillende vormen van aangeleerd gedrag bij ratten. Deze stoffen zijn door ons neuropeptiden genoemd.

Voor dit onderzoek werd het voorwaardelijk vluchtgedrag als model gekozen, omdat dit een op angst gebaseerd gedrag is, waarbij emotie en 'stress' betrokken zijn. Aanvankelijk werd voornamelijk met een zogenaamde 'shuttlebox' gewerkt. Deze opstelling bestaat uit twee identieke compartimenten, gescheiden door een 5 cm hoge barrière. De dieren moesten leren binnen 5 seconden na presentatie van een voorwaardelijke prikkel (meestal het geluid van een zoemer) over de barrière heen te springen. Deden ze dat niet, dan volgde de onvoorwaardelijke prikkel (een milde elektrische stroom door de poten). Op deze wijze werden de dieren gedwongen naar het andere compartiment te vluchten. Na enige tijd werd de voorwaardelijke prikkel opnieuw aangeboden. Dit werd 10 maal per dag gedurende ongeveer 10 minuten herhaald. Op deze wijze leerden de dieren de voorwaardelijke vluchtreactie uit te voeren. Na twee weken werd deze voor vrijwel 100% binnen 5 seconden ge-

maakt. Daarna werd de uitblussing van de vluchtreactie bestudeerd. De voorwaardelijke prikkel werd aangeboden, maar wanneer de rat de vluchtreactie niet binnen 5 seconden uitvoerde, werd deze niet gevolgd door de onvoorwaardelijke prikkel. Daardoor bluste de voorwaardelijke vluchtreactie geleidelijk aan uit.

Verwijdering van de hypofyse Wanneer de hypofyse verwijderd werd, bleek dat hierdoor het aanleren van een voorwaardelijk vluchtgedrag ernstig werd belemmerd, hetgeen de conclusie wettigde dat één of meer hypofysehormonen betrokken zijn bij het aanleren van bepaalde vormen van gedrag.

Toediening van ACTH in een hoeveelheid die de atrofie van de bijnierschors die bij de hypofyseloze ratten optreedt, tegengaat, bleek in staat het aanleren van de voorwaardelijke vluchtreactie van hypofyseloze ratten nagenoeg geheel te herstellen. Omdat het belangrijkste effect van ACTH bestaat uit stimulering van de productie van hormonen door de bijnierschors, lag het voor de hand om aan te nemen dat het effect van ACTH tot stand zou komen via de bijnienschorshormonen. Dat bleek echter niet het geval te zijn. Behandeling van hypofyseloze ratten met bijnienschorshormonen kon het deficiënte leergedrag van deze dieren niet herstellen. Integendeel, er trad eerder een verslechtering op. Bovendien werd gevonden, dat het wegnemen van de bijnierschors geen noemenswaardige stoornis in het aanleren van een voorwaardelijke vluchtreactie veroorzaakte.

Structuur van aan ACTH verwante neuropeptiden ACTH (figuur 1) is een polypeptide dat bestaat uit een keten van 39 aminozuren, waarvan slechts een gedeelte essentieel is voor de werking op de bijnierschors. De sequentie 1-20 is nog in staat de bijnierschors te stimuleren. Wordt deze sequentie verder ingekort, dan verdwijnt de invloed grotendeels. Zo heeft de aminozuurketen ACTH 1-13 praktisch geen effect op de bijnierschors. Deze sequentie is ook aanwezig in het α -MSH (Melanoforen-Stimulerend Hormoon, figuur 1). Dit hormoon bevordert de spreiding van pigment over cellen in de huid van amfibieën. Het bleek nu dat α -MSH dezelfde invloed had en even sterk werkzaam was op het aanleren van de voorwaardelijke vluchtreactie van hypofyseloze ratten als het gehele ACTH-molecuul. Ook brokstukken van ACTH, zoals ACTH 1-10, en ACTH 4-10 waren in dit opzicht actief. De invloed van

ACTH		H-ser-tyr-ser-met-glu-his-phe-arg-trp-gly-lys-pro-val.....OH	39
α -MSH	(zoogdieren)	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 CH ₃ CO-ser-tyr-ser-met-glu-his-phe-arg-trp-gly-lys-pro-val-NH ₂	
β -MSH	(paard)	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13	
β -MSH	(varken)	H-asp-glu-gly-pro-tyr-lys-met-glu-his-phe-arg-trp-gly-ser-pro-arg-lys-asp-OH 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18	
β -MSH	(rund)	H-asp-glu-gly-pro-tyr-lys-met-glu-his-phe-arg-trp-gly-ser-pro-lys-asp-OH 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18	
β -MSH	(aap)	H-asp-ser-gly-pro-tyr-lys-met-glu-his-phe-arg-trp-gly-ser-pro-lys-asp-OH 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18	
β -MSH	(kameel)	H-asp-glu-gly-pro-tyr-arg-met-glu-his-phe-arg-trp-gly-ser-pro-lys-asp-OH 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18	
β -MSH	(kameel)	H-asp-gly-gly-pro-tyr-lys-met-glu-his-phe-arg-trp-gly-ser-pro-lys-asp-OH 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18	
β -MSH	(kameel)	H-asp-gly-gly-pro-tyr-lys-met-gln-his-phe-arg-trp-gly-ser-pro-lys-asp-OH 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18	
β -MSH	(mens)		
γ -LPH	(schaap)	H-ala-glu-lys-lys-asp-glu-gly-pro-tyr-arg-met-glu-his-phe-arg-trp-gly-ser-pro-lys-asp-OH 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22	
β -LPH	(schaap)	H.....pro-tyr-lys-met-glu-his-phe-arg-trp-gly-ser-pro-lys-asp-OH 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58	
		H.....pro-tyr-lys-met-glu-his-phe-arg-trp-gly-ser-pro-lys-asp:.....OH 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58	91

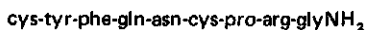
Fig. 1. De aminozuursamenstelling van ACTH, α -MSH, diverse β -MSH's en van β -en γ -LPH.

ACTH op het gedrag gaat dus buiten de bijnierschors om en is slechts in een klein deel van het molecuul gesitueerd. Dit is daarom zo interessant, omdat deze sequentie van 7 aminozuren niet alleen voorkomt in ACTH en in α -MSH, maar ook in de hypofysaire hormonen β -MSH en LPH (lipotrope hormoon): figuur 1. LPH bevordert onder meer de mobilisatie van vrije vetzuren uit vetcellen. Deze sequentie ACTH 4-10 wordt door sommige onderzoekers gezien als een oerhormoon; het bezit nog steeds een duidelijke MSH-werking, een geringe lipotrope activiteit en onder in vitro omstandigheden ook een — zij het geringe —, bijnierschorsstimulerende invloed. De werkzaamheid op het gedrag is echter door de inkorting niet noemenswaardig verminderd.

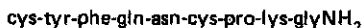
Het door ons gebruikte heptapeptide ACTH 4-10 was een langs synthetische weg bereide stof. Er is echter wel eens beweerd dat dit peptide als zodanig in de hypofyse zou voorkomen, hetzij als bouwsteen voor de synthese van ACTH, α - en β -MSH en β -LPH, hetzij als enzymatisch afbraakprodukt van deze peptiden. Ook heeft men wel gesuggereerd dat ACTH 4-10 uit de hypofyse naar de bloedbaan wordt afgescheiden. Bewijs hiervoor is echter nooit geleverd. Hypothetisch leek het echter niet onmogelijk dat de hypofyse peptiden zou bevatten, al dan niet chemisch verwant aan een deel van het ACTH-molecuul, die eveneens specifiek gedragsmodificerende eigenschappen zouden kunnen bezitten. Op grond hiervan werd gepostuleerd dat de hypofyse neuro-peptiden produceert, waarbij hypofysehormonen als precursors functioneren, die een rol spelen bij de vorming van voorwaardelijk gedrag. Een vergelijkbaar onderzoek aan hormoonfragmenten wordt beschreven in de hoofdstukken van Hekkelman en Gaillard.

Isolatie van neuropeptiden uit hypofyse-extracten Omdat in de Verenigde Staten veel onderzoek gedaan werd naar het isoleren van peptiden uit de hypofyse die chemische verwantschap vertonen met MSH, verrichtten wij het onderzoek naar uit de hypofyse te extraheren peptiden in samenwerking met de Yale University. Als uitgangsmateriaal dienden varkenshypofyses. Uit een extract hiervan werd een fractie geïsoleerd waarin zich veel MSH bevond. Deze fractie werd in subfracties gescheiden met behulp van een zogenaamde ionenuitwisselaar, waarbij tien subfracties werden verkregen. Hiervan bleken er vier in staat te zijn het aanleren van de voorwaardelijke vluchtreactie bij de hypofyseloze rat te bevorderen. Deze subfracties waren niet homogeen

en bevatten meestal verscheidene peptiden. De subfractie met de hoogste activiteit werd verder gefractioneerd met behulp van gelfiltratie over Sephadex G25. Dit resulteerde in de isolatie van een groot aantal deelfracties, waarvan er zes actief bleken te zijn. Eén van deze deelfracties bleek een hoge activiteit en een relatief laag moleculair gewicht te bezitten, hetgeen wees op de aanwezigheid van een betrekkelijk klein peptide. Deze deelfractie werd uitgekozen om te trachten het actieve peptide in zuivere vorm te isoleren door middel van papierchromatografie. De aminozuursamenstelling ervan werd vastgesteld en het peptide bleek de aminozuren: cystine, tyrosine, fenylalanine, glutaminezuur, asparaginezuur, proline en lysine te bevatten. Deze samenstelling suggereerde dat het door ons geïsoleerde peptide veel overeenkomst vertoonde met het lysine-vasopressine (figuur 2), dat in de hypofyseachterkwab van varkens wordt aangetroffen. Alle aminozuren waaruit lysine-vasopressine is samengesteld, behalve het glycine, werden in het geïsoleerde peptide gevonden. Dit suggereerde dat we te maken hadden met lysine-vasopressine waaraan het eindstandige glycinamide ontbrak. Synthetisch vervaardigd desglycinamide-lysine-vasopressine bleek chemisch volledig identiek te zijn met het geïsoleerde peptide en ook een even sterke invloed uit te oefenen op het aanleren van de voorwaardelijke vluchtreactie van de hypofyseloze rat. Het was verrassend, dat in plaats van een op ACTH of MSH, een op vasopressine gelijkend peptide uit de hypofyse werd geïsoleerd. Van vasopressine werd al eerder geconstateerd dat het eenzelfde soort invloed op het gedrag van dieren kan uitoefenen als de aan ACTH verwante peptiden. Als opvallende eigenschap van desglycinamide-lysine-vasopressine ten opzichte van lysine-vasopressine zelf bleek echter dat het desglycinamide peptide nauwelijks nog perifere endocriene activiteit (bloeddruk, waterhuishouding) bezit en dus in veel hogere mate dan lysine-vasopressine een specifiek gedragseffect bezit.



arginine vasopressine



lysine vasopressine

Fig. 2. De aminozuursamenstelling van vasopressine.

Evenals voor ACTH geldt dus ook hier dat de gedragswerking niet gekoppeld is aan de klassieke endocriene werking. Het feit dat bij het isoleren verschillende subfracties werden aangetroffen die het aanleren van de voorwaardelijke vluchtreactie van het hypofysoleze dier eveneens bevorderen, betekent dat ook andere gedragsactieve stoffen (met configuraties die wellicht meer gelijken op die van ACTH, MSH of LPH) in de hypofyse aanwezig zijn.

Invloed van neuropeptiden op voorwaardelijk vluchtgedrag Het onderzoek toonde aan dat ACTH analoga en vasopressine-analoga ook bij *intacte* ratten invloed hebben op het voorwaardelijk vluchtgedrag. Daarom werd besloten om niet het aanleren, maar het handhaven van de voorwaardelijke vluchtreactie te observeren. Nadat een dergelijke reactie is aangeleerd, zouden wij kunnen nagaan hoe lang het duurt voordat dit gedrag verdwijnt. Wij confronteerden de rat in die situatie slechts met de voorwaardelijke stimulus (het geluidssignaal). De onvoorwaardelijke stimulus (elektrische stroom) volgde de voorwaardelijke stimulus niet wanneer de vluchtreactie niet binnen 5 seconden werd uitgevoerd. Toediening van ACTH bleek het uitblussen van de voorwaardelijke vluchtreactie te kunnen remmen. Dit onderzoek werd in de shuttlebox en ook in een enigszins andere opstelling, de paalspringtest, aangetoond. Bij deze test werd de rat geleerd in een paal te vluchten naar aanleiding van een lichtprikkel die als voorwaardelijke stimulus fungeerde. De onvoorwaardelijke stimulus, die ook nu weer bestaat uit milde elektrische stroomstoten via de bodem van de kooi, werd gecombineerd met de voorwaardelijke stimulus als het dier niet binnen 5 seconden in de paal gesprongen was. De voorwaardelijke vluchtreactie werd in deze opstelling in 3 dagen onder aanbidding van 10 herhalingen per dag aangeleerd. Ze bluste echter ook weer snel uit. ACTH, doch ook de kortere sequenties zoals α -MSH, β -MSH, ACTH 1-10 en ACTH 4-10, remden de uitblussing van de voorwaardelijke vluchtreactie in de paalspringtest. Bij nader onderzoek werd aangetoond dat het tetrapeptide ACTH 4-7 (H-Met-Glu-His-Phe-OH) de kleinste eenheid uit het gehele ACTH-molecuul is dat nog de volledige invloed op het gedrag bezit. Bijnierschors hormonen kunnen ook in dit geval het effect van ACTH niet nabootsen. Integendeel, deze bevorderen de uitblussing van voorwaardelijk vluchtgedrag.

Zoals gezegd heeft ook vasopressine een invloed op het voorwaardelijk vluchtgedrag. Het is in staat om de uitblussing van voorwaardelijk

vluchtgedrag bij normale ratten te remmen en het aanleren ervan bij hypofyseloze ratten te stimuleren. Vasopressine lijkt dus dezelfde invloed op het gedrag uit te oefenen als ACTH. Vasopressine en ACTH zijn echter in chemisch opzicht verschillend van structuur. Het is daarom merkwaardig dat deze stoffen eenzelfde invloed op het gedrag hebben. Nader onderzoek bracht aan het licht dat dit op verschillende wijze tot stand komt. ACTH en ACTH-analoga oefenen slechts een kortdurende invloed van enkele uren tot maximaal een dag uit op het gedrag, dat zo lang blijft bestaan als deze stoffen worden toegediend. Vasopressine daarentegen beïnvloedt het gedrag langdurig, omdat het effect nog gedurende lange tijd (enkele dagen tot een week) na toediening zichtbaar blijft. Dit wordt niet veroorzaakt door een verschil in metabolisme, omdat de halfwaardetijd van ACTH en ACTH-analoga en van vasopressine en vasopressine-analoga niet meer dan enkele minuten bedraagt.

Deze gegevens omtrent de invloed van ACTH en vasopressine en daarvan afgeleide en verwante peptiden op het voorwaardelijk vluchtgedrag roepen een aantal vragen op die beantwoord moeten worden. Vragen als: maakt de hypofyse neuropeptiden en zo ja, wat zijn dat voor stoffen en wanneer worden ze afgegeven, komen vanzelf naar voren. Wat gebeurt er met ACTH en ACTH-analoga in het lichaam en waar gaan ze naar toe, hoe worden ze gemetaboliseerd, waar oefenen ze hun werking uit en op welke wijze doen ze dat? Hoe gedraagt de receptor zich en welk deel van het molecuul is essentieel voor de interactie met de receptor? Wat betekent de invloed van deze stoffen op het gedrag, hebben zij te maken met leren, geheugen, motivatie, angst, etc.?

Plaats van werking van neuropeptiden Nadat radioactief gelabelde peptiden waren verkregen, kon onderzoek naar de distributie en afbraak van ACTH-analoga worden ondernomen. Hieruit werd duidelijk dat slechts 0,01% van een ingespoten peptide in het centrale zenuwstelsel terecht komt. De resultaten van verdelingsstudies over morfologisch bepaalde hersengebieden lieten zien dat het septum de hoogste concentratie radioactiviteit bevatte. Bij toepassing van een microdissectie-techniek bleek een preferentiële opname van een radioactief ACTH 4-9-analoon detecteerbaar in de zogenaamde dorsale en fimbriale delen van het septumgebied. Andere methoden, zoals autoradiografie, zouden ook gebruikt kunnen worden om de preciese plaats van werking in de hersenen verder te bepalen.

Ondertussen was reeds ruwweg de plaats van werking van de neuro-peptiden bepaald met behulp van implantatie van deze peptiden in verschillende delen van de hersenen bij ratten. Bij deze dieren was op de schedel een roestvrijstalen plaatje met gaten gemonteerd, waardoor met behulp van holle naalden peptiden konden worden gebracht. De dieren werden in de paalspringtest getraind zodat de invloed van geïmplan-teerde peptiden op het uitblussen van de voorwaardelijke vluchtreactie kon worden nagegaan. Bepaalde hersengebieden die achter in de thalamus waren gelegen bleken gevoelig voor zowel ACTH-fragmenten als vasopressine bij het tot stand komen van het gedragseffect.

Om nadere gegevens omtrent de plaats van werking te verkrijgen werden tevens experimenten gedaan waarbij bepaalde delen van de her-senen werden vernietigd. Daarbij werd nagegaan welke beschadigingen de invloed van ACTH-analoga en van vasopressine op het gedrag konden voorkomen. Uiteindelijk bleken bepaalde delen van het limbische sys-teem die ook bij emotionele belevingen geacht worden van belang te zijn, zoals posterior thalamus, hippocampus en septumgebied, een be-langrijke rol te spelen bij de invloed van neuropeptiden op voorwaarde-lijk vluchtgedrag. Ook elektrofysiologisch onderzoek is onlangs in gang gezet om de structuren te lokaliseren die bij de invloed van neuro-peptiden in de hersenen betrokken zijn. Door bepaalde circuits elek-trisch te prikkelen en de daarop volgende elektrische verschijnselen te meten voor en na toediening van deze stoffen krijgt men een indruk van de activiteit van bepaalde hersendelen onder invloed van neuropeptiden.

Invloed van neuropeptiden op ander dan vluchtgedrag Tot dusverre betrof het onderzoek gedrag dat tot stand komt onder invloed van stress als gevolg van 'angst' en emotie. ACTH en ACTH-analoga spelen echter ook een rol bij de regulatie van gedrag dat niet op 'angst' is gebaseerd. Leert men een hongerige of dorstige rat op een hendel te drukken, waardoor voedsel of water ter beschikking komt, dan zal dat gedrag feilloos worden uitgevoerd zolang het bekrachtigd wordt door de beloning. Dit gedrag blust echter uit wanneer men de beloning (voedsel of water) onthoudt. Toediening van ACTH en — zoals in sommige gevallen reeds is aangetoond — ook van ACTH-analoga, remt de uitblus-sing van dit zogenaamde appetitieve gedrag.

ACTH en ACTH-analoga zouden het voorwaardelijk vluchtgedrag ook kunnen beïnvloeden door stimulering van de locomotorische activi-

teit van het proefdier. Dit kan men nagaan in een zogenaamd 'open field'. In deze opstelling observeert men veranderingen in het normale gedrag door metingen van de ambulatie (het heen en weer lopen), het op de achterpoten staan, het wassen en het defeceren gedurende 3 tot 5 minuten. Farmaca die de locomotorische activiteit stimuleren zullen gewoonlijk ook de ambulatie doen toenemen. ACTH-analoga bleken geen duidelijke invloed op het gedrag in het 'open-field' uit te oefenen.

Een andere manier om na te gaan of de invloed van neuropeptiden op het gedrag tot stand komt door stimulering van de locomotoriek, is om een gedragssituatie te kiezen waarbij van de dieren geen actief gedrag, zoals in de shuttlebox of in de paalspringtest, doch slechts een passief gedrag gevraagd wordt. Daartoe wordt de rat op een verlicht platform geplaatst dat verbonden is met een grote donkere kooi. Men maakt gebruik van de aangeboren eigenschap van de dieren om donker boven licht te verkiezen. Ratten zullen daarom, nadat ze op het platform geplaatst worden, de donkere ruimte verkiezen. Ze vertoeven dan ook slechts enkele seconden op het verlichte platform. Wanneer het dier enige malen aan deze situatie is blootgesteld, wordt de spijlenvloer van de donkere ruimte onder stroom gezet. De aversie die bij het dier bij een eerste ervaring ontstaat zal er toe leiden dat het de volgende maal de donkere ruimte niet dan na aarzeling betreedt. Deze 'vermijdingslatentie' is natuurlijk groter naar mate de aversie tegen de stimulus in de donkere ruimte sterker is. Toediening van ACTH en ACTH-analoga doen de vermijdingslatentie toenemen. Hetzelfde geldt ook voor toediening van vasopressine. In deze passieve vermijdingstest bevorderen deze peptiden dus een gedrag dat gepaard gaat met een reductie van locomotorische activiteit. Ook nu weer oefenen ACTH-analoga een kortdurende, en vasopressine-analoga een langdurende werking uit.

Ook agressie schijnt door ACTH te kunnen worden beïnvloed. Wanneer men een muis of rat isoleert, ontstaat agressiviteit. Deze wordt in veel mindere mate bij ratten zonder bijnier waargenomen. Er is ook gevonden dat toediening van grote hoeveelheden ACTH deze isolatie-agressie remt. Dit effect was echter niet met het ACTH-analoon ACTH 4-10 na te bootsen. Ook gedrag dat tot stand komt uit angst om door een op agressie getrainde rat te worden aangevallen kan door de neuropeptiden ACTH en vasopressine worden beïnvloed. Alhoewel er geringe verschillen bestaan tussen de resultaten die met deze stoffen zijn verkregen in het hiervoor beschreven passieve vermijdingsgedrag en in

deze zogenaamde 'avoidance-of-attack', zijn de effecten in het algemeen goed vergelijkbaar. Ook het vermijden van een aanval door een getrainde vechter wordt door ACTH en vasopressine gestimuleerd, afhankelijk van het tijdstip van toediening en met verschillen in werkingsduur.

Op verschillende manieren kan men 'amnesie' opwekken van aangeleerd gedrag. Zo is aangetoond dat vermijding van de donkere kooi in de passieve vermijdingstest kan worden verhinderd door de dieren onmiddellijk na de toegediende stroom in de donkere ruimte bloot te stellen aan CO₂ of elektroshock. Deze 'amnesie' kan onder bepaalde voorwaarden door toediening van ACTH 4-10 of van vasopressine worden tegengegaan.

Hoe moet men het effect van neuropeptiden op grond van al deze waarnemingen nu zien? Men heeft wel gesuggereerd dat ACTH, MSH en daaraan verwante peptiden invloed hebben op 'angst'. Anderen spreken over invloed op geheugen, op leren, op de motivatie etc. Zo veronderstelt men wel, dat ACTH de prikkelbaarheid in het centrale zenuwstelsel verhoogt, waardoor de 'angst' van het proefdier in bepaalde situaties zou toenemen. Daarom leert het dier sneller en blijft een eenmaal aangeleerd gedrag onder invloed van deze hormonen langer bestaan. Dat klopt echter niet met de waarneming dat ACTH-analoga ook invloed hebben op gedrag dat met voedsel beloond wordt en dat niet op 'angst' gebaseerd is. Elektrofysiologisch onderzoek suggereert dat ACTH 4-10 de transmissie in het zogenaamde limbisch systeem vergemakkelijkt. Dit heeft vermoedelijk tot gevolg dat de invloed van specifieke informatie uit de omgeving, in dit geval de voorwaardelijke stimulus, voorrang krijgt boven onspecifieke informatie. Dit zou het aanleren van de voorwaardelijke vluchtreactie bevorderen en het uitblussen ervan remmen.

Het hypofyse-bijniersysteem beïnvloedt in deze hypothese het eenmaal aangeleerde gedrag waarbij ACTH en ACTH-analoga door bevordering van de transmissie in het limbisch systeem de kans dat dit gedrag wordt uitgevoerd, vergroot, terwijl steroïden deze kans verkleinen.

Het hypofyse-bijniersysteem is één van de belangrijkste systemen die betrokken zijn bij de verdediging van het organisme tegen schadelijke prikkels (stress). Het systeem wordt geactiveerd bij somatische beschadiging, zoals dat bij traumata, operaties, verbrandingen en bloedverlies, voorkomt. Maar ook psychische beschadiging als gevolg van angst, spanning, frustratie etc., activeert het hypofyse-bijniersysteem. De afgifte van ACTH brengt de hormoonproductie van de bijnierschors op gang.

De daardoor geproduceerde glucocorticosteroiden zijn op één of andere wijze betrokken bij de verdediging van het organisme tegen schadelijke invloeden. Dit stelt het organisme in staat zich aan veranderingen in het interne of externe milieu aan te passen. Zonder een adequate functie van de bijnierschors kan het organisme zich niet handhaven. Het aanleren en uitblussen van voorwaardelijk gedrag kan beschouwd worden als een manifestatie van de aanpassing van het organisme aan veranderingen in de omgeving. De invloed van ACTH en analoga daarvan en de daaraan tegengestelde werking van steroiden zouden dan ook gezien kunnen worden in het kader van een adaptatief proces.

Rol van vasopressine en analoga bij geheugenprocessen

Er bestaan binnen de farmacologie van een dergelijk onderzoek over hormonen en gedrag verschillende fascinerende benaderingen. Zo kunnen we noemen (1) het karakteriseren of identificeren van het actieve bestanddeel van het hormoonmolecuul dat verantwoordelijk is voor het gedragseffect, (2) het opsporen van het werkingsmechanisme van de hypofysaire neuropeptiden voor hun effect op het gedrag, waarbij biochemische en elektrofysiologische technieken kunnen worden toegepast, en (3) de opheldering van het aangrijpingspunt van de hormonen in relatie tot hun werking op het gedrag. Deze onderzoeken zouden dan uiteindelijk kunnen resulteren in farmaca die in staat zijn om het tot-stand-komen en handhaven van bepaalde vormen van aangeleerd gedrag te beïnvloeden, tengevolge van een direct effect van deze stoffen op de hersenen. Dergelijk boeiend en grensverleggend farmacologisch en endocrinologisch onderzoek leidt tevens tot de vraag wat de fysiologische betekenis is van de uit de eigen hypofyse van het organisme afkomstige hormonen bij het tot-stand-komen van een dergelijk gedrag. Om deze vraag te beantwoorden werden o.m. radioimmunologische bepalingsmethoden ontwikkeld met de bedoeling om een eventuele afgifte van de hormonen ACTH en vasopressine door de hypofyse te kunnen registreren tijdens diverse fasen van het aanleren en handhaven van een bepaalde vorm van gedrag.

Het is mogelijk gebleken om proefdieren specifieke antilichamen te laten ontwikkelen tegen allerlei soorten van stoffen, waaronder hormonen. Deze antilichamen, die in feite bestaan uit grote eiwitten, zijn in staat om lichaamseigen en lichaamsvreemde stoffen te binden en zo-

doende het organisme te beschermen tegen eventuele schadelijke invloeden van deze stoffen.

Dergelijke antilichamen zijn o.m. ontwikkeld tegen vasopressine door konijnen met dit hormoon in geconjugeerde vorm in te spuiten. Na herhaalde injecties bleek het serum van de behandelde konijnen rijk te zijn aan antilichamen tegen vasopressine en kon dit serum gebruikt worden om bij ratten het endogene vasopressine te neutraliseren. Wanneer de antilichamen tegen vasopressine intraveneus werden toegediend bleek dat de urineproductie gedurende enkele uren na de toediening verhoogd was, een indicatie dat vasopressine was geneutraliseerd omdat dit hormoon immers een anti-diuretische werking bezit. Deze antidiuretische werking komt tot stand via een effect op de nier waardoor uiteindelijk water door het lichaam wordt vastgehouden en wordt, zoals eerder betoogd werd, beschouwd als het fysiologische effect van vasopressine. Toediening echter van antilichamen tegen vasopressine rechtstreeks in de hersenventrikels op verschillende momenten tijdens het aanleren van een bepaalde reactie van ratten op prikkels uit de omgeving toonde aan dat vasopressine een belangrijke, zo niet essentiële rol speelt bij processen die te maken hebben met de opslag en verwerking van informatie.

Tevens bleek dat het te-voorschijn-roepen of gebruikmaken van de opgeslagen informatie (Engels: retrieval) eveneens slechts in aanwezigheid van vasopressine kan geschieden. Het bleek mogelijk om door rechtstreekse toediening van antilichamen tegen vasopressine in de hersenen bepaalde vormen van gedrag te moduleren afhankelijk van concentratie en tijdstip van toediening. Zowel het voorwaardelijk vluchtgedrag in de *paalspringtest*, als het *passief vermijdingsgedrag* is ernstig verstoord na een zogenaamde intracerebroventriculaire toediening van antilichamen tegen vasopressine. Ratten waarbij op deze wijze in de hersenen aanwezig vasopressine was geneutraliseerd vertoonden bijvoorbeeld geen enkele terughoudendheid om een ruimte te betreden waar zij tevoren een onaangename ervaring in de vorm van een pijnprikkel hadden ervaren. Dit in tegenstelling tot een controlegroep die deze ruimte angstvallig vermeed.

Interessant is in dit verband dat neutralisatie van endogeen vasopressine in de periferie door een intraveneuze injectie van antilichamen tegen dit hormoon — die zoals gezegd leidde tot een verstoring van de waterhuishouding — geen invloed had op de genoemde geheugen- en

'retrieval'-processen, maar dat alleen een injectie van zeer geringe hoeveelheden antilichamen tegen vasopressine in het cerebrospinaal vocht in de hersenventrikels deze stoornis in het handhaven van een aangeleerde reactie te zien gaf. Deze resultaten doen vermoeden dat vasopressine niet alleen wordt afgegeven vanuit de neurohypofyse aan het bloed om zodoende de nier te bereiken en zijn antidiuretische werking te kunnen uitoefenen, maar tevens wordt afgescheiden in het cerebrospinaal vocht van de hersenen om zo in het centraal zenuwstelsel zijn invloed te kunnen uitoefenen op bepaalde geheugenprocessen.

Een andere benadering om aan te tonen dat vasopressine en analoga fysiologisch betrokken zijn bij geheugenprocessen, kon worden vastgesteld bij ratten met een aangeboren hypothalamische diabetes insipidus (DI). Deze dieren missen ten gevolge van een genetisch defect het vermogen om vasopressine te maken. Het aanleren van de voorwaardelijke vluchtreactie in de 'shuttlebox' is bij deze dieren enigszins gestoord en de dieren zijn niet in staat een aangeleerde reactie te handhaven. De ernstige geheugenstoornis die deze dieren hebben komt het duidelijkst tot uiting in passief vermijdingsgedrag, waarbij de rat slechts één keer de elektrische prikkel in de donkere ruimte ervaren heeft. Zulke diabetes insipidus ratten vertonen in deze test geen vermijdingsgedrag in tegenstelling tot heterozygote controleratten. Behandeling van homozygote DI-ratten met een eenmalige injectie van vasopressine onmiddellijk na de elektrische prikkel herstelt het gedrag. Dat we hier met een stoornis in het geheugen en niet met een stoornis in het leren te maken hebben, kon worden aangetoond toen bleek dat DI-ratten wel een normaal vermijdingsgedrag vertonen als ze kort na de elektrische prikkel worden getest. Er bestaat dus een stoornis in het vastleggen van informatie.

Conclusies

De hypofyse produceert neuropeptiden die verwant zijn aan ACTH en een kortdurend effect op aangeleerd gedrag uitoefenen en neuropeptiden verwant aan vasopressine die in dit opzicht een langdurend effect bezitten. Via deze neuropeptiden speelt de hypofyse een belangrijke rol bij de motivatie en bij leer- en geheugenprocessen. Daardoor wordt het organisme in staat gesteld op adequate wijze op veranderingen in de omgeving te reageren. Andere hypofysehormonen zijn hierbij vermoede-

lijk ook betrokken, zoals het groeihormoon dat de ontwikkeling van de hersenen van het rattefoetus bevordert wanneer het hormoon tijdens de zwangerschap aan de moeder werd toegediend, of prolactine dat betrokken is bij nestbouw en verzorging van de jongen. Ook peptiden uit de hypothalamus en andere delen van de hersenen kunnen het gedrag beïnvloeden.

Het luteïniserend hormoon 'releasing hormone' (LH-RH) stimuleert seksueel gedrag in gehypofysectomeerde-geovariëctomeerde ratten, dus door een directe invloed op het centraal zenuwstelsel en ook het thyreotrope hormoon 'releasing hormone' (TRH) en het MSH-afgifte remmende hormoon (MIF) beïnvloeden het centraal zenuwstelsel. De in de hersenen gevormde neuropeptiden worden waarschijnlijk o.m. aan het cerebrospinaal vocht (CSF) afgegeven. Dit lijkt een uitermate geschikt transportmiddel dat deze neuropeptiden naar het limbisch systeem vervoert waar vele van deze stoffen hun werking uitoefenen. Hypofysaire peptiden zouden ook via de CSF kunnen worden getransporteerd. Er bestaan aanwijzingen dat deze via transport langs de hypofysesteel of via zogenaamde basilaire cysternen die de hormoonproducerende cellen van deze klier onspoelen, aan de CSF worden afgegeven. Het is uiteraard ook mogelijk dat de neuropeptiden door de hypofyse aan de bloedbaan worden afgegeven om via de perifere circulatie tenslotte ook de hersenen te bereiken. Vele van de genoemde neuropeptiden spelen vermoedelijk een belangrijke rol bij het ontstaan en het handhaven van verschillende soorten gedrag. Neuropeptiden zoals ACTH en analoga en vasopressine en analoga zijn betrokken bij de motivatie en bij de registratie, opslag en reproductie van informatie welke het organisme in staat stelt om aangepast gedrag te ontwikkelen.

Toekomstbeeld

Het is niet eenvoudig om op basis van de gegevens betreffende de peptide-effecten op het vluchtgedrag van ratten een algemeen model te construeren van de rol van deze peptiden bij de gedragsregulatie van zoogdieren. Uitermate moeilijk wordt het om voorspellingen te doen ten aanzien van de functie van deze peptiden bij de mens. In ons gedrag kunnen we talloze voorbeelden vinden van voorwaardelijk gedrag waarbij onaangename situaties als pijn, verwonding en koude vermeden worden. Wij hebben geleerd, en leren nog steeds, om dreigende onaan-

gename gebeurtenissen te ontwijken door handelingen te verrichten die aangepast zijn aan de betreffende situatie. Ook lopen we voortdurend het risico blootgesteld te worden aan psychische stress-situaties die we adequaat moeten zien te verwerken of te vermijden. In een maatschappij die steeds gecompliceerder wordt, zullen aanpassingsstoornissen mogelijk frequenter gaan optreden en aanleiding geven tot psychosomatische afwijkingen. Het is daarom zaak na te gaan welke fysiologische veranderingen daarbij in het lichaam optreden en in hoeverre bij deze processen neuropeptiden betrokken zijn, zoals die door ons uit de hypofyse zijn geïsoleerd. De hypofyse blijkt in elk geval peptiden te bevatten die in staat zijn een bepaald afwijkend gedrag van ratten te herstellen. Omdat deze peptiden in het centrale zenuwstelsel werkzaam zijn, noemen we ze neuropeptiden. Men kan zich nu afvragen of ook bij mensen met stoornissen in de functie van deze endocriene klier gedragsveranderingen worden aangetroffen.

Het zou mogelijk kunnen zijn dat bepaalde afwijkingen in het gedrag van mensen samen kunnen hangen met een tekort aan bepaalde hypofysaire peptiden. Deze hypothese zou gesteund worden door een positief resultaat van een behandeling met deze peptiden van patiënten met een hypofysebeschadiging. Momenteel zijn in Nederland onderzoeken gaande omtrent de vraagstelling in hoeverre hypofysaire peptiden of daaraan verwante stoffen in staat zijn om het concentratievermogen, de attentie of de motivatie te verhogen. Hierdoor worden verschillende psychologische tests gebruikt. Tevens wordt, voornamelijk in de Verenigde Staten, onderzocht of dergelijke peptidehormonen een heilzame werking zouden kunnen hebben bij concentratie- en geheugenstoornissen zoals die onder meer bekend zijn bij mensen van oudere leeftijd.

Het is niet onmogelijk dat wij met deze ontdekkingen aan het begin staan van een nieuwe fase in de endocrinologie en dat de farmacologie van de hormonen een nieuw tijdperk in de wetenschap inluidt waarin het wellicht mogelijk is om diverse functies van het zenuwstelsel met van hormonen afgeleide stoffen te beïnvloeden en om afwijkingen in het functioneren ervan met dergelijke stoffen op te heffen.

Klinische aspecten van de endocrinologie

J.J. van der Werff ten Bosch

Ziekten, endocriene klieren en hormonen

Hormonen hadden al lang voordat zij in 1905 aldus gedoopt werden, een plaats in de biologische wetenschappen en met name ook in de geneeskunde. Betrekkelijk frequent voorkomende ziekten die het gevolg zijn van stoornissen in de produktie van hormonen zoals suikerziekte, endemische krop en de ziekte van Graves, waren als klinische eenheden lang voor 1900 bekend. Vele andere ziekten werden in de jaren rondom de eeuwwisseling ontdekt, d.w.z. dat hun symptomatologie beschreven werd en dikwijls tevens de relatie tussen klinische symptomen en een endocrien orgaan. Voorbeelden hiervan zijn de betekenis van de hypofyse voor de groei, de rol die de hypofyse speelt in het ziektebeeld acromegalie en ziekten van de bijschildklieren die resulteren in verhoogde produktie van parathormoon en skeletafwijkingen. Er werd in die jaren ook ontzaglijk veel dierexperimenteel onderzoek verricht waardoor onder meer de betekenis van de hypofyse voor allerlei processen in het lichaam duidelijk werd. Ook voor de geschiedenis van de suikerziekte waren dat belangrijke jaren omdat in die tijd langs experimentele weg suikerziekte werd opgewekt, hetgeen de sleutel opleverde voor een daaropvolgende therapeutische benadering van deze veel voorkomende ziekte.

Het gebruik van hormonen

Hormonen zijn niet alleen in de geneeskunde, maar ook in het dagelijkse leven van zeer veel gezonde mensen van deze tijd van groot belang. Zonder hormonen zouden wij niet beschikken over middelen voor orale anticonceptie. Immers, 'de pil' bestaat uit hormonen of op hormonen gelijkende stoffen. De werking van de pil berust op verstoring

van hormonale processen in het lichaam die leiden tot de rijping van ei-follikel en eikel, en tot ovulatie. Door de stoffen die de vrouw met de pil inslikt worden deze processen geremd. Naast deze pil voor de vrouw zijn er tabletten die door sportbeoefenaars gebruikt worden voor het zogenaamde 'dopen'. De stoffen die men daartoe aanwendt bestaan in sommige gevallen uit produkten die lijken op mannelijk geslachtshormoon, en die geacht worden de gespierdheid en de effectiviteit van de spierarbeid te vergroten.

Er zijn nog enkele andere, wat minder wijd verbreide voorbeelden. Zo is er de behandeling van verschillende vormen van kanker met hormonen. De laatste jaren is er de behandeling van vrouwen met gestoorde ovulatie, met gonadotrope hormonen of met stoffen die ingrijpen in hormonale regel-processen en die daardoor de secretie van gonadotrope hormonen stimuleren. In zulke gevallen ziet men dan wel de in de pers vermelde meerling-zwangerschappen.

Tenslotte mag als voorbeeld genoemd worden, het gebruik van preparaten met het doel de lengtegroei van het lichaam vroegtijdig tot stilstand te brengen. Met name voor meisjes die een grote volwassen lengte dreigen te zullen bereiken is deze laatste toepassing van betekenis. Tijdens de puberteit gaan kinderen uit de kluiten wassen onder invloed van de geslachtshormonen die ook de andere puberteits-verschijnselen teweegbrengen, zoals het optreden van beharing van buik en oksels en het groeien van borsten en uitwendige geslachtsorganen. Geslachtshormonen hebben twee invloeden op de beenderen. In de eerste plaats doen zij het delen van de kraakbeencellen versnellen, waardoor het bot sneller in lengte groeit. In de tweede plaats veroorzaken zij versnelling van de rijping, het verbenen van de kraakbenige groeischijven. Het netto effect van de normale puberteit, van de 'endogene toediening' van geslachtshormonen op het skelet is: een tijdelijke versnelling van de lengtegroei gevolgd door een stilstand, het uitblijven van verdere lengtegroei. Dat laatste is een gevolg van het feit dat kraakbeen wel en bot niet verder kan groeien. Als de puberteit niet zou plaatsvinden, dan zou de versnelling van de groei uitblijven maar ook het tot stilstand komen van de groei zou uitblijven, zodat het betrokken individu op volwassen leeftijd nog een tijdlang zou doorgroeien en uiteindelijk een grotere lengte zou bereiken dan gewoonlijk het geval is. Wanneer echter de puberteit zeer vroeg intreedt, zal de versnelling in groei maar ook de stilstand in lengtegroei op een jeugdiger leeftijd bereikt

worden en het totale effect zou een minder grote volwassen lengte zijn dan na een puberteit op normale leeftijd. Door het toedienen van geslachtshormonen aan kinderen kan men in het eerste geval het bereiken van de eindtoestand van het skelet op een vroegere leeftijd tot stand brengen. In zulke gevallen berust het therapeutisch gebruik van hormoonpreparaten op kennis van de fysiologische processen.

Endocriene ziekten

De meeste van de bovenstaande voorbeelden van gebruik van hormonen hebben met elkaar gemeen dat het toepassingen betreft waar het hormoon niet gebruikt wordt om een tekort aan te vullen. Om dit te verduidelijken het volgende.

Bij ziekte van een endocriene klier kan deze het vermogen missen om voldoende hormoon te produceren. Wanneer zo'n hormoon via een tablet of injectie wordt toegediend aan een patiënt dan spreken we van substitutie-therapie. Het 'geneesmiddel' wordt daarbij gebruikt om iets toe te voegen dat door het lichaam zelf gemaakt zou behoren te worden. Bij dit gebruik van hormonen als substitutie-middel, dienen we allereerst een inzicht te hebben in het wezen van endocriene ziekten.

Hormonen kan men als koeriers beschouwen, die langs de bloedbaan snellend boodschappen overbrengen naar verre en ver uiteen gelegen doelen. Daardoor hebben hormonen een belangrijke integrerende functie, die zij delen met het centrale zenuwstelsel (zie de hoofdstukken van Lever en Joosse). Als we willen spreken over effecten van stoornissen in de hoeveelheden hormonen die het lichaam maakt, dan is het nodig te weten welke functies die hormonen hebben. Globaal kunnen we aan hormonen functies toekennen die in de drie volgende categorieën thuishoren, te weten:

1. de regulatie van de groei en de ontwikkeling van het individu,
2. het in stand houden van het individu (homeostasis), en
3. het in stand houden van de soort via de regulatie van de voortplanting.

Een tekort of overmaat van één hormoon zal in het algemeen de harmonie in één of meer van deze functies verstoren. Een daaruit resulterende disharmonie kan men herkennen aan bijvoorbeeld een dubbelzinnige ontwikkeling van de geslachtsorganen, een te grote of een te geringe lichaamslengte, een gestoorde ontwikkeling van de hersenen,

een slechte algemene gezondheidstoestand, b.v. door afwijkingen in hartritme, in bloeddruk of in bloedsamenstelling, stoornissen in seksuele functies etc. Tekort of overmaat aan hormonen kan op verschillende wijzen ontstaan. Er kan sprake zijn van een afwijking in de produktie of in de opvang en verwerking van het hormoon in de doelwitcellen. Afwijkingen in opvang en verwerking door de doelwitcellen kunnen leiden tot verschijnselen van tekort, ondanks verhoogde of normale gehalten in het bloed en produktiesnelheden van het betreffende hormoon. Een voorbeeld hiervan is de ontwikkelingsstoornis die bekend staat onder de naam 'testiculaire feminisatie'. Dit is een geërfd onvermogen van testosteron-doelwitcellen om testosteron op te vangen of te verwerken. Lijders aan dit syndroom hebben een vrouwelijke lichaamsbouw, met uitzondering van het feit dat ze testikels bezitten en geen ovaria en baarmoeder (figuur 1). Bijna dezelfde stoornis zou men krijgen als de produktie van testosteron achterwege bleef: de doelwitcellen zouden ook dan van testosteron prikkeling verstoken blijven.

Afwijkingen in de produktie van een hormoon hebben bijna altijd een verstoring van een bepaald evenwicht, een stoornis in een regulatiesysteem tot gevolg. Kort gezegd: een tekort of een teveel aan hormonen, zal veelal vergezeld gaan van een poging van het systeem om daarvoor te compenseren, om een nieuwe, evenwichtige situatie te scheppen. Dat kan omdat veel hormoon producerende cellen deel uitmaken van een gesloten regulatiemodel, waarin via een terugkoppelende invloed van het produkt de snelheid waarmee dat produkt wordt aangemaakt beteugeld kan worden. Wij zullen verderop enkele illustraties tegenkomen van disharmonieën en de gevolgen van compensatiepogingen.

Endocriene ziekten worden meestal gekenmerkt door verschijnselen die het gevolg zijn van hormoontekort of -overschot. Daarnaast kunnen veranderingen in de grootte van de desbetreffende hormoon producerende klier plaatselijke gevolgen hebben. De klier kan namelijk aangetaast worden door een ontsteking of een gezwel, en daardoor groter worden; en zij kan door een regulatiestoornis meer dan normaal aangezet worden tot hormoonproduktie en daardoor in grootte toenemen. Als een klier groter wordt kunnen nabijgelegen structuren in gedrang komen, zoals de luchtpijp bij sterke vergroting van de schildklier, en de oogzenuwen bij een hypofysegezwel. In het hiernavolgende zullen enkele van de in het voorgaande besproken algemeenheden geïllustreerd worden aan de hand van ziekte toestanden die het gevolg zijn van hor-

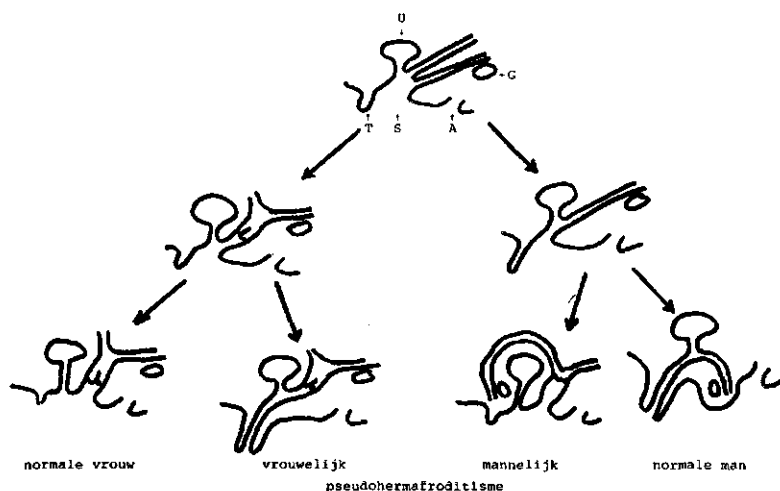


Fig. 1. Embryonale differentiatie van de neutrale geslachtsorganen (midden boven) in vrouwelijke (links onder) of mannelijke (rechts onder) richting. Midden onder staan extreme voorbeelden van vermannelijking bij een individu met ovaria (vrouwelijk pseudohermafroditisme) en van ontbreken van vermannelijking bij een individu met testes (mannelijk pseudohermafroditisme). Dit laatste wordt bijvoorbeeld gezien bij het syndroom testiculaire feminisatie. A = anus, U = urineblaas, G = gonade, T = tuberculum genitale, S = sinus urogenitalis.

monale disharmonie. Het is echter noodzakelijk om eerst wat achtergrond-informatie te verschaffen, om te schetsen hoe de normale ontwikkeling verloopt.

Het ontstaan van verschillen tussen de beide geslachten

Wanneer de dokter de boreling inspecteert om de moeder in te lichten omtrent het geslacht van het kind, dan kijkt hij naar het eindproduct van een ontwikkeling die begonnen is bij de conceptie. Daarbij werd een eicel bevrucht door een spermatozoön en afhankelijk ervan of deze spermatozoön een Y- dan wel een X-geslachtschromosoom huisvestte, zou de ontwikkeling vervolgens verlopen in de richting van een jongetje of in de richting van een meisje. De aanleg voor de kiemklier gaat zich in de tweede maand van de zwangerschap ontwikkelen tot een eierstok, tenzij er zich in de cellen van de foetus een Y-chromosoom bevindt. In

het laatste geval zal de rudimentaire gonade zich ontwikkelen tot een testikel. In de buik van de jonge vrucht bevinden zich twee buizenstelsels, respectievelijk het systeem van Wolff en het systeem van Müller. Uit het Wolffse systeem ontstaan mannelijke inwendige geslachtsorganen, zoals de prostaat en de zaadleiters, uit het Müllerse systeem de vrouwelijke geslachtsorganen waaronder baarmoeder en eileiders (figuur 1). Gewoonlijk komt bij de man het Wolffse systeem tot ontwikkeling onder invloed van testosteron dat gemaakt wordt door de testikel, terwijl het Müllerse systeem in ontwikkeling achterblijft. Die ontwikkeling wordt onderdrukt door een stof die ook in de testikels gemaakt wordt, maar waarvan de aard nog niet nauwkeurig bekend is; deze stof wordt de Müller inhiberende factor genoemd.

Bij de vrouw verloopt de ontwikkeling anders. Uit het Müllerse systeem ontwikkelen zich 'spontaan' de vrouwelijke inwendige organen, terwijl het Wolffse systeem niet tot ontwikkeling komt, omdat het geen prikkels van testosteron krijgt. Onder bepaalde omstandigheden is het mogelijk dat zowel het Müllerse als het Wolffse systeem tot ontwikkeling komen.

Heel anders ligt dit voor de uitwendige geslachtsorganen. Wij onderscheiden daarin primair een tweetal onderdelen: het tuberculum genitale, waaruit later de penis en de clitoris ontstaan, en een instulping in het onderlijf, de sinus urogenitalis. De urinebuis en het Müllerse en Wolffse systeem monden alle uit in deze sinus. Deze twee onderdelen van de uitwendige genitalia kunnen zich in mindere of in meerdere mate in mannelijke of in vrouwelijke richting ontwikkelen. Aan het ene einde van de reeks van mogelijke ontwikkelingsvormen bevindt zich de normale mannelijke verschijning, met maximale ontwikkeling van het tuberculum en met een afvoersysteem van zaad en urine langs een gemeenschappelijke buis, de urethra, die via de penis naar buiten uitmondt. Aan het andere einde van de reeks van mogelijkheden vinden we de normale vrouwelijke vorm, waar zich aan de buikzijde twee aparte openingen bevinden voor de urethra en voor de vagina, met slechts een ondiepe gemeenschappelijke ruimte, de vulva. Deze beide uiterste vormen van ontwikkeling zijn complementair. Als de uitwendige genitalia zich deels in mannelijke richting ontwikkelen dan zullen zij in dezelfde mate minder vrouwelijk zijn, en omgekeerd, wanneer de ontwikkeling in mannelijke richting onvolledig is dan zal naar de mate waarin die onvolledig is de ontwikkeling meer in vrouwelijke richting hebben

plaats gevonden. Wat dit betreft zijn de uitwendige genitalia principieel verschillend van de inwendige genitalia omdat daar naast elkaar een systeem voor mannelijke en een systeem voor vrouwelijke organen ligt. We zullen straks zien waarom deze uitwijding noodzakelijk was. We krijgen dan te maken met gedeeltelijk vermannelijkte meisjes en met onvoldoende vermannelijkte jongens.

Aangeboren bijnier-vergroting: endocriene ziekte die ontwikkeling, homeostase en voortplanting bedreigt

In het nu volgende zullen drie verschillende ziektebeelden geschetst worden, veroorzaakt door afwijkingen in de biosynthese van steroïdhormonen, die heel dicht bijeen liggen, en waarvan de gevolgen sterk kunnen verschillen. Het interessante van deze ziektebeelden is, dat zij het belang illustreren van het samengaan van chemie, embryologie en genetica. De kennis die wij thans hebben van dit gemeenschappelijke terrein is te danken aan het feit dat in de afgelopen decennia vertegenwoordigers van deze zeer verschillende onderzoekrichtingen zich hebben bezig gehouden op dit gebied. Het is buitengewoon interessant om te zien langs welke eenvoudige lijnen er nu gedacht kan worden bij het stellen van de diagnose van afwijkingen, die op zichzelf op het eerste gezicht, bizarre combinaties van verschijnselen kunnen omvatten. Het is verder interessant vast te stellen dat een deel van de verschijnselen die straks aan de orde komen, behoren bij een ziektebeeld dat in 1849 door Addison voor het eerst beschreven is. Het betrof toen mensen die sterk gepigmenteerd waren en die overleden aan verschijnselen van uitdroging en lage bloeddruk, en bij wie Addison afwijkingen in de bijnieren ontdekte.

Het onderwerp betreft de produktie van steroïdhormonen. Dit zijn produkten die uit cholesterol gemaakt worden in de geslachtsklieren en in de bijnierschors (zie de hoofdstukken van Van der Molen en van Van Wimersma Greidanus en De Wied). Wij zullen een stoornis in de synthese van bijnierschors-hormoon behandelen, die bij de mens kan resulteren in zeer sterk uiteenlopende ziektebeelden. Figuur 2 laat zien hoe de biosynthese verloopt van de verschillende steroïden die onder normale omstandigheden biologisch van betekenis zijn. Deze laatste zijn progesteron, testosteron, oestron en oestradiol, en aldosteron en cortisol. Vermoedelijk is het zo dat in alle organen waar steroïden gemaakt

worden in principe dit basisschema geldt. Het is duidelijk dat een aantal enzymen noodzakelijk zijn voordat uit cholesterol testosteron kan ontstaan. Als voor één van de tussenstappen het enzym ontbreekt, dan kan er geen testosteron gemaakt worden. Hetzelfde kan gesteld worden met betrekking tot cortisol.

Hier zullen vooral aangeboren afwijkingen in de productie van cortisol aan de orde komen. Dit zijn ziekten die berusten op een storing in de genen die noodzakelijk zijn voor het doen ontstaan van enzymen die bij de biosynthese van steroidhormonen betrokken zijn. Drie toestanden zullen worden beschreven, ieder behorende bij een tekort aan een enkel specifiek enzym (figuur 2). De enzymen waar het om gaat zijn het 3β -hydroxy-dehydrogenase (3β) dat onder andere nodig is voor de omzetting van pregnenolon in progesteron, het 21-hydroxylase (21), noodzakelijk voor de stap van progesteron naar desoxycorticosteron (DOC), en 11β -hydroxylase (11β), nodig om te komen van DOC naar corticosteron en van 17α -21-dihydroxyprogesteron naar cortisol. Wan-

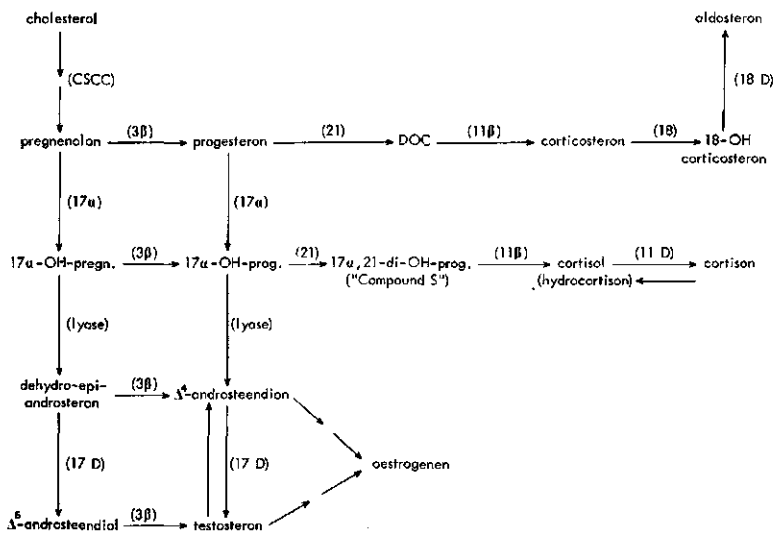


Fig. 2. Biosynthese van steroiden. Tussen haakjes bij de pijlen zijn de enzymen aangeduid; de relevante enzymen worden in de tekst voluit gegeven.

neer één van deze drie enzymen ontbreekt zal de bijnier niet het vermogen hebben om voldoende cortisol te maken en zal de patiënt verschijnselen van cortisol-tekort gaan vertonen. Een van de werkingen van cortisol die tengevolge van de enzymstoornis wegvalt, is het in bedwang houden van de secretie van ACTH door de hypofysevoorkwab. Een van de verschijnselen van ontremde produktie van ACTH is versterkte pigmentatie van huid en slijmvliesen. Dit verschijnsel komt voor bij al deze drie enzym-tekorten. Een andere werking van cortisol, maar meer nog van aldosteron, is het reguleren van de uitscheiding van zout met de urine. Als er te weinig aldosteron en cortisol gemaakt wordt, zal de urine een overmatige hoeveelheid zout bevatten; daardoor zal er in het lichaam een tekort aan zout ontstaan, en dat leidt tot uitdroging, lage bloeddruk, en verschijnselen van extreme zwakte. Deze verschijnselen van zoutverlies worden evenwel niet gezien bij alle drie enzymstoornissen. Het komt voor bij het 3β -defect, dikwijls bij het 21-defect, maar niet bij het 11β -defect. Integendeel bij deze storing treedt hypertensie, verhoogde bloeddruk, op. De verklaring voor deze verschillen is de volgende. Bij een 11β -defect zal door overmatige ACTH produktie en daardoor overmatige stimulering van de activiteit van alle processen in de bijnier die gelegen zijn vóór dit enzym, een overmaat geproduceerd worden van verschillende hormonen, onder welke het DOC. Dat is een stof die sommige werkingen gemeen heeft met cortisol en die met name verhoging van de bloeddruk kan veroorzaken.

De overmatige secretie van ACTH leidt, zoals gezegd, tot overproduktie van allerlei steroïden die gemaakt worden in de biosynthese vóór de plaats van een enzym-defect. Bij tekort aan 11β en aan 21 ontstaat een overmaat van de stoffen die in figuur 2 gelegen zijn na pregnenolon en progesteron, waaronder testosteron. Patiënten die lijden aan een van deze twee enzym-storingen scheiden dus in overmaat mannelijk (androgene) hormoon af. Dat heeft heel duidelijke gevolgen die bij jongens en meisjes verschillend zijn. De produktie van vermannelijkende hormonen vindt plaats kort na het begin van de geslachtsdifferentiatie van de inwendige en uitwendige genitalia. Meisjes die voor de geboorte zijn blootgesteld geweest aan testosteron zullen bij de geboorte uitwendig gedeeltelijk of geheel vermannelijkt zijn (figuur 1). Daarom bestaat bij zulke meisjes dikwijls bij de geboorte twijfel omtrent de aard van het geslacht. Deze afwijking wordt aangeduid met de naam vrouwelijk pseudohermaphroditisme, d.w.z. dat het individuen betreft die ovaria hebben

en gedeeltelijk of geheel vermannelijkte uitwendige genitalia. Jongens die aan een tekort van een van deze twee enzymen lijden zullen voor de geboorte ruimschoots voldoende mannelijke hormonen gehad hebben zodat omtrent de aard van hun geslacht bij de geboorte geen twijfel zal bestaan. Het is wel mogelijk dat bij of kort na de geboorte de groei van penis, skelet en spieren zodanig versneld lijkt te zijn dat men kan zeggen dat zulke jongens lijden aan verschijnselen van pubertas praecox, van vroegtijdige puberteit. En aangezien hier geen sprake is van rijping van de testikels maar alleen van een effect van testosteron, spreekt men in zo'n geval van een vervroegde pseudo puberteit, van pseudo pubertas praecox.

Samenvattend: bij deficiëntie van 11β en van 21 kunnen we te maken krijgen met pseudohermafroditisme bij meisjes bij de geboorte, met pubertas praecox bij de jongens, en in het ene geval het syndroom van zoutverlies (bij 21 -tekort) en in het andere geval met hoge bloeddruk (bij 11β -tekort).

Nu het derde enzym, het 3β . We hebben al gezien dat ook daarbij pigmentatie en zoutverlies optreden. De vraag is nu welke andere verschijnselen we kunnen verwachten. Bij een deficiëntie van 3β is er verminderde produktie van progesteron (en alle stoffen die daaruit gevormd worden), 17α -hydroxy-progesteron, androsteendion en testosteron. Aan de andere kant zullen de stoffen links van de pijlen in figuur 2 waar dit enzym aangrijpt in verhoogde mate geproduceerd worden. Dat zijn o.a. dehydro-epiandrosteron en androsteendiol, die beide vermannelijkende activiteit bezitten. Als zij in grote hoeveelheden gemaakt worden zullen zij vermannelijkende effecten teweegbrengen. Het zijn echter zwakke androgenen in vergelijking met testosteron. De totale vermannelijkende invloed die bij deze enzymstoring verkregen wordt uit de overproduktie van deze zwakke androgenen, is geringer dan wat tijdens de normale ontwikkeling van jongens gezien wordt. Het netto effect zal bij jongentjes zijn het in onvoldoende mate vermannelijkt worden in utero. Bij de geboorte zal er dan ook bij zulke jongens twijfel kunnen bestaan over de aard van het geslacht, omdat zij in onvoldoende mate vermannelijkt zijn. Meisjes die aan deze afwijking lijden zullen daarentegen gedeeltelijk vermannelijkt worden omdat voor hen de totale hoeveelheid vermannelijkende activiteit die geproduceerd wordt, abnormaal hoog is. We krijgen dan dus te maken met de merkwaardige situatie van jongetjes die onvoldoende vermannelijkt zijn (mannelijk pseudohermafrodi-

tisme) en van meisjes die in lichte mate vermannelijkt raken (vrouwelijk pseudohermafroditisme).

U zult zich afvragen of medische behandeling mogelijk is van lijdens aan deze enzymdefecten. Het tekort aan cortisol kan vanaf de geboorte, vanaf het moment dat de diagnose gesteld wordt, worden opgeheven door het toedienen van cortisol of van cortisol-achtige preparaten. Als gevolg van zulk een therapie zullen de verschijnselen van cortisol-tekort in termen van zoutverlies of hypertensie verdwijnen, terwijl tevens de overmatige secretie van ACTH zal ophouden. Dit laatste heeft dan weer tot gevolg dat de overmatige produktie aan stéroïden die vóór de plaats van het defect geproduceerd worden, zal ophouden. Daaronder vallen ook de androgenen. Verschijnselen van vermannelijking zullen vanaf dat ogenblik niet toenemen. Ook verschijnselen van pseudo pubertas praecox, bij jongens, zullen vanaf het ogenblik dat de cortisol-behandeling begonnen is, niet in ernst toenemen. Een andere vraag is wat er moet gebeuren met de geslachtstoewijzing. Bij meisjes die in sterke mate vermannelijkt zijn zal bij de geboorte twijfel bestaan aan de aard van het geslacht en wellicht zal in eerste instantie het geslacht bij de burgelijke stand nog niet worden opgegeven. Er zal een keuze gemaakt moeten worden, afhankelijk van de graad van vermannelijking bij het meisje of de graad van onvoldoende vermannelijking bij de jongen. Een praktische overweging is dan de vraag op welke wijze er eventueel operatieve correcties moeten worden aangebracht aan de uitwendige geslachtsorganen, zodat de patiënt later zal kunnen functioneren in de zin van het geslacht waartoe deze zal worden opgevoed.

Nog een paar slotopmerkingen over deze ziekten. Een van de belangrijke functies van de bijnierschors, via secretie van cortisol, is het beschermen van het lichaam tegen acute bedreigingen van de homeostase. Zulke bedreigingen zijn er met name ten tijde van grote lichamelijke kwetsuren (infecties, hoge koorts, trauma). De kans dat men onder zulke omstandigheden elektrolyten en/of water kwijt raakt en daarbij bloeddrukdaling ondergaat waardoor organen onvoldoende doorstroomd worden, maakt dat het lichaam dan buitengewoon kwetsbaar is en risico's loopt. Het is om deze reden dat patiënten die lijden aan tekort aan cortisol-produktie gedurende hun gehele verdere leven onder nauwgezette medische controle moeten blijven. Zij zijn in deze zin vergelijkbaar met mensen die lijden aan suikerziekte.

Slotopmerkingen

Ik heb geprobeerd duidelijk te maken dat de klinische endocrinologie zich bezighoudt met hormonen en hormoonachtige stoffen, met de organen door welke deze stoffen geproduceerd worden, en met de organen waarop deze hormonen hun werkingen uitoefenen. Tot de laatste categorie behoren bij het zich ontwikkelende individu de geslachtsorganen en het skelet. Uit deze opsomming van onderdelen van de klinische endocrinologie blijkt, dat de functies die men het endocriene stelsel kan toeschrijven heel algemeen van aard zijn. Met een variant op een bekend gezegde mag hier gesteld worden dat endocrinologie overal is, of dat hormonen overal zijn. In dit hoofdstuk is volkomen voorbijgegaan aan de invloed van hormonen op de hersenen, die enerzijds functioneren als regulerend systeem, voor endocriene en andere functies en anderzijds als bron van gedragingen, van gedrag. Ik heb verder gepoogd aan de hand van de modelvoorstellingen van de biosynthese van steroïden en van de embryogenese van het genitaal apparaat te schetsen langs welke soorten van lijnen de klinische endocrinoloog moet denken in zijn werk.

Bronst op bestelling bij landbouwhuisdieren

Th.A.M. Kruip

Inleiding

De voortplanting in het dierenrijk is vrijwel alleen een geslachtelijke, waarbij vrouwelijke en mannelijke geslachtscellen elkaar treffen, versmelten en een nieuw organisme vormen. Bij vele in het water levende dieren worden de geslachtscellen (de gameten) aan het water afgegeven, waar deze cellen enige tijd in leven kunnen blijven. De bevruchting geschiedt met een trefkans welke bepaald wordt door de hoeveelheid gameten van elke soort, de tijd en de plaats van afgifte. Deze vorm van bevruchting (uitwendige bevruchting) houdt een grote mate van verspilling van gameten in. De evolutie van een aantal dierlijke organismen heeft voor wat de bevruchting betreft gekozen voor de inwendige bevruchting en wel in het vrouwelijk lichaam. Deze vorm wordt beschouwd als een methode waarbij aan de gameten een zekere mate van bescherming wordt geboden en waarbij zeker geen vrouwelijke gameten worden verspild.

De inwendige bevruchting vereist op de eerste plaats een copulatie. Hiertoe is bij landbouwhuisdieren het mannelijk dier vrijwel altijd bereid; het vrouwelijke alleen tijdens bepaalde perioden. De periode waarin het vrouwelijk dier bereid is te copuleren met een mannelijke partner wordt de bronst (of oestrus) genoemd. Ook worden bij landbouwhuisdieren de namen tochtigheid, berigheid, hengstigheid en ramsheid gebezigd, respectievelijk bij rund, varken, paard en schaap. Naast de bereidheid tot copuleren vereist de inwendige bevruchting dat het milieu in het vrouwelijke geslachtsapparaat (de genitaaltractus) optimaal is voor het bijeenbrengen van de eicellen en de zaadcellen. De beperkte levensduur van beide celtypen, speciaal die van de eicel vereist bovendien dat de afgifte van de eicel(len) plaats vindt als de spermïen reeds in het vrouwelijk geslachtsapparaat aanwezig zijn.

Bij zoogdieren zoals het konijn, de kat en de fret, waarbij de ovulatie (ook wel eisprong genoemd) optreedt als reflex op de copulatie, wordt aan laatst genoemde voorwaarde voldaan. Bij onze landbouwhuisdieren treedt de ovulatie spontaan tijdens of kort na de bronst op. In acht genomen dat spermacellen in de genitaaltractus nog een rijpingsproces (kapacitatie) moeten doormaken, is dus ook hier het vrijkomen van de eicel(len) afgestemd op het aanwezig zijn van gekapaciteerde zaadcellen in de eileider.

Wanneer de landbouwhuisdieren onder natuurlijke omstandigheden samenleven, is er voortdurend contact tussen mannelijke en vrouwelijke exemplaren mogelijk, zodat de partners elkaar tijdens de bronst herhaaldelijk kunnen opzoeken. Deze situatie treffen we onder Nederlandse omstandigheden nog het meest aan bij schapen. Bij de meer gedomesticeerde dieren als paard, rund en varken worden de mannelijke exemplaren gescheiden gehouden van de vrouwelijke. In dat geval moet de eigenaar kunnen vaststellen of een vrouwelijk dier in bronst is zodat hij het dier op het juiste moment ter dekking of inseminatie kan aanbieden. Een goed inzicht in de uitwendig waarneembare tekenen en het gedragspatroon kort voor en tijdens de oestrus is onmisbaar. Ontbreekt dit inzicht en faalt de eigenaar in de bronstwaarneming, dan mag hij niet rekenen op een goede voortplanting bij zijn dieren. Heeft hij dit inzicht wél, dan kan hij naar wens de spontaan optredende bronsten benutten.

Anders wordt het wanneer de eigenaar de dieren in bronst wil hebben op tijden waarop deze normaal niet optreedt of wanneer de bronst om de een of andere reden langer dan normaal uitblijft. Om deze wens te kunnen vervullen moet op de eerste plaats bekend zijn welke factoren vooral een rol spelen bij het tot stand komen van bronst en ovulatie en in welke toestand de genitaaltractus moet verkeren voor het tot stand brengen van de bevruchting.

Bronst en ovulatie

Zowel het bronstgedrag, de fysiologische toestand van de genitaaltractus als de ovulatie zijn de resultaten van de interactie tussen het inwendig milieu (interne factoren) en de prikkels welke het dier van buitenaf bereiken (externe factoren). Deze wederzijdse beïnvloeding heeft plaats op het niveau van het centrale zenuwstelsel (figuur 1). Het is moeilijk te

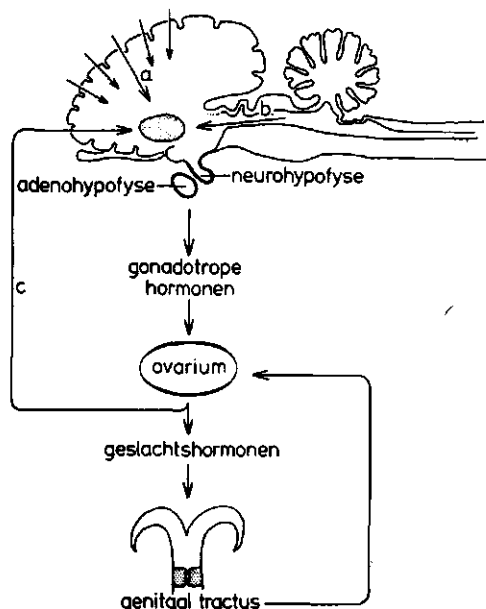


Fig. 1. Schematische weergave van enkele factoren die de hypothalamus beïnvloeden. a = externe stimuli (gezicht, reuk, gehoor), b = interne stimuli uit de periferie (huid, vagina, cervix), c = interne stimuli vanuit de endocriene organen, waaronder het ovarium.

bepalen welke van deze factoren een rol spelen bij het tot stand komen van oestrus en ovulatie. Zeker is dat voor het bronstgedrag het hormoon oestradiol een sleutelfunctie inneemt. Daarom is de naam van dit hormoon van dit effect afgeleid. Injecteren van oestradiol bij dieren waarbij het ovarium is weggenomen veroorzaakt bronst (tabel 1). Waar dit hormoon precies aangrijpt is bij landbouwhuisdieren niet bekend; bij ratten en konijnen is gebleken dat de hypothalamus de belangrijkste plaats is voor de inductie van bronst. Injecteren van oestradiol kan ook een plotselinge grote afgifte van LH (Luteïniseringshormoon) door de hypofyse (LH-piek) tot gevolg hebben (tabel 1). De afgifte van LH is een proces dat onder controle staat van de hypothalamus. Aldus heeft het hormoon gelijktijdig een effect op het neurale stelsel (brongstgedrag) en op het endocriene (LH-afgifte). Daarbij lijkt te gelden dat in dieren waarbij het ovarium is weggenomen meer oestradiol nodig is voor de

Tabel 1. Relatie tussen toegediende dosis oestradiolmonobenzoaat, de hoogte van de LH-piek en de oestrusduur bij een rund dat geen ovaria meer heeft. De LH-piek is bij alle doseringen van vrijwel gelijke hoogte. Bij toedienen van 0,5 mg oestradiolmonobenzoaat treedt geen bronst meer op.

Dosis oestradiol (mg)	Gevonden 'LH' release' (ng/ml bloed)	Tijdsverloop injectie/LH-piek (uren)	Duur oestrus (dagen)	Tijdsverloop LH-piek/begin oestrus (uren)
10,0	23 ± 1,7	18	5	4
2,5	18 ± 1,3	16	1,5	4
1,0	24 ± 1,8	15	1	3
0,5	19 ± 1,4	16	—	—

inductie van het bronstgedrag dan voor de inductie van een LH-piek (tabel 1).

Naast dit hormonale effect op de hypothalamus, zijn er ook effecten via de zintuigen vastgesteld. Het ruiken, horen of zien van een ram veroorzaakt bij de ooi een stijging van de LH-concentratie in het bloed (figuur 2). Als het ovarium er gevoelig voor is resulteert een plotselinge afgifte van LH in ovulatie.

Lijkt het bronstgedrag derhalve hormonaal gereguleerd te zijn, de afgifte van LH en de ovulatie kan door hormonen maar ook door prikkels van buiten geïnduceerd worden. Of we hier met één of twee regencentra in de hypothalamus te doen hebben is voor landbouwhuisdieren niet bekend. Uit onderzoek bij knaagdieren is geconcludeerd dat er in de hypothalamus twee centra zijn gelegen. Het ene regelt het bronstgedrag en staat vooral onder invloed van oestradiol, het tweede regelt LH-afgifte en het ovulatiemechanisme en staat vooral onder controle van externe stimuli. Bij onvoldoende LH-afgifte en/of onvoldoende receptoren voor LH in het ovarium is er niet voldoende oestrogensynthese (dit proces staat onder controle van LH) en is er dus geen bronst. Daaruit kan men concluderen dat externe factoren kunnen domineren bij het reguleren van de bronst en ovulatie. Daarom ook kan de wijze van bedrijfsvoering sterke invloed hebben op deze processen bij gedomesticeerde dieren.

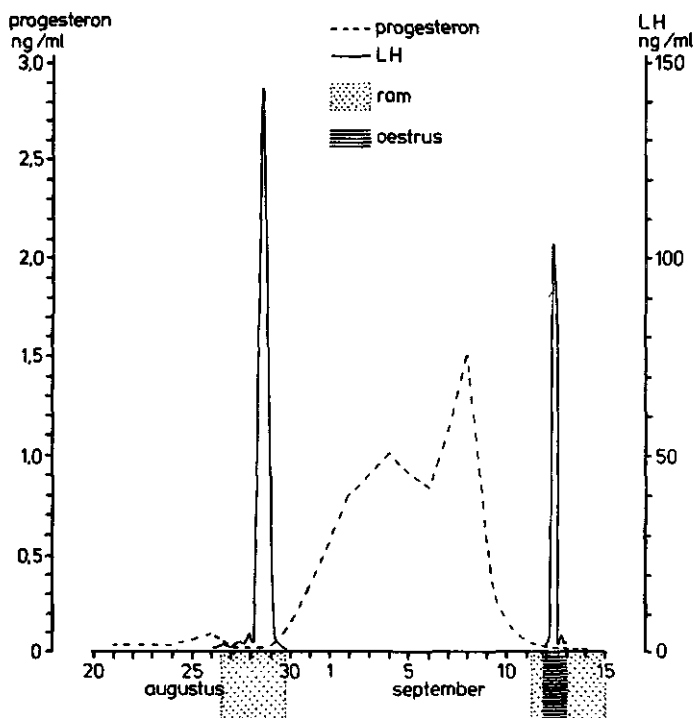


Fig. 2. Effect van de ramintroductie op het endocriene stelsel bij de ooi aan het eind van het anoestrusseizoen. Bij de eerste introductie van de ram stijgt plotseling de LH-concentratie zonder optreden van bronst (stille bronst). Blijkens de stijging van progesteron in het bloed heeft er ook een ovulatie plaats gehad. Bij de tweede ramintroductie (ca. 17 dagen later) treedt bronst e. stijging van LH-concentratie op.

Oestrus- en anoestrusseizoenen

Het verschijnsel bronst komt bij de in het wild levende dieren veelal niet het gehele jaar voor. Er zijn dieren waarbij dit maar eenmaal per jaar optreedt (edelhert) en dieren waarbij de bronst bij uitblijven van drachtigheid regelmatig terugkeert, maar dan slechts gedurende een bepaalde periode of te wel het oestrusseizoen (schapen). Buiten deze periode spreekt men van het anoestrusseizoen.

Er is reeds gesteld dat de externe factoren dit verschijnsel mede beheersen. Onder deze factoren worden obligate en modificerende factoren onderkend. Het licht (daglichtlengte) is bij vele dieren een obligate faktor, terwijl temperatuur en microklimaat modificerende factoren zijn. Naast deze externe factoren is er ook sprake van een soort-eigen ritme.

Op het noordelijk halfrond hebben een aantal schaperassen een brontstseizoen van september tot februari. Brengt men deze dieren naar het zuidelijk halfrond dan strekt het brontstseizoen zich uit van maart tot augustus. Deze twee perioden vallen samen met de perioden van afnemende daglichtlengte. Het schaap wordt daarom een 'short-day breeder' genoemd; d.w.z. een dier dat bij het korten der dagen in oestrus komt. Andere diersoorten, waaronder het paard zijn daarentegen 'long-day breeders'. De manier waarop de externe factoren inspelen op het brontstgedrag is misschien het resultaat van een selectie over miljoenen jaren, welke geleid heeft tot de huidige diersoorten met hun oestrus- en anoestrusseizoenen. Het voorradig zijn van voedsel kan bijvoorbeeld een belangrijk selectiemiddel zijn geweest. De jongen welke geboren worden in perioden waarin voldoende voedsel aanwezig is hebben een grotere overlevingskans. Bij paarden met een draagtijd van ca. 11 maanden waren alleen die dieren welke (genetisch bepaald) vroeg bij het lengen der dagen in oestrus kwamen in staat zich met succes te vermeerderen. Paarden die in november in oestrus kwamen brachten veulens in oktober, met een sterk verhoogde sterftেকans door de komende winter. Bij het schaap met een draagtijd van ca. 145 dagen moet het oestrusseizoen niet eerder aanvangen dan in september en niet langer uitlopen dan tot maart. Dit vormt een goede verklaring voor het feit dat in ons land het schaap op afnemende daglichtlengte en het paard op toenemende daglichtlengte reageert met brontst.

Domesticatie heeft o.a. de voeding als selectiemiddel aan kracht laten inboeten, maar al hebben rund en varken allang geen duidelijk oestrusseizoen meer, toch vertoont de fertiliteit bij beide een seizoen-variatie. Het rund met een draagtijd van ca. 9 maanden vertoont ook nu nog de hoogste fertiliteit bij dekking in het late voorjaar en vroege zomer. Het varken, met een draagtijd van ca. 4 maanden is in de wintermaanden het meest vruchtbaar. (Zie ook het hoofdstuk van Baggerman.)

Nu een optimale voeding van het jonge dier gedurende het gehele

jaar kan worden gewaarborgd, ligt de weg open te trachten bij paard en schaap brontst en ovulatie te induceren op een moment waarop dit normaal niet zou optreden. Inderdaad lukt het zowel bij paard als schaap in licht- en klimaatkamers brontst en ovulatie te induceren in het anoestrusseizoen. Zoals het spel met de externe stimuli leidt tot brontst en ovulatie op momenten waarop dit normaal niet voorkomt, zo zou dit ook moeten lukken door een spel met de interne stimuli. Dit laatste vereist echter een goed inzicht in de endocriene regulatie van de voortplanting bij landbouwhuisdieren. Dit inzicht is thans zo ver ontwikkeld dat reeds een aantal jaren gebruik gemaakt wordt van het toedienen van juist gedoseerde hoeveelheden hormoon op uitgekiende momenten om 'brontst op bestelling' te verzorgen.

Endocrinologie van de voortplanting

Zoals reeds gezegd, worden de voortplantingsprocessen mede door het endocriene stelsel gereguleerd. Bij het vrouwelijk organisme behoren hiertoe een aantal organen met een endocriene secretie, zoals de neuro-endocriene cellen in de hypothalamus, de hypofyse, de ovaria, de bijenieren en de placenta. Ook hebben we gezien dat het endocriene stelsel niet autonoom is, maar afhankelijk van het centraal zenuwstelsel en dat beide stelsels elkaar beïnvloeden op het niveau van de neuro-endocriene cellen in de hypothalamus. Zo heeft het zien, horen of ruiken van de ram bij de ooi een duidelijk effect op het endocriene stelsel (figuur 2), en heeft omgekeerd het verwijderen van een endocrien orgaan of het injecteren van een secreet uit een endocrien orgaan een duidelijk effect op het zenuwstelsel (brontsgedrag) (tabel 1).

Gesteld kan worden dat het voortplantingsmechanisme functioneert bij de gratie van een aantal in- en externe factoren (figuur 3) die de cellen in de hypothalamus beïnvloeden bij de vorming van de zogenaamde 'releasing hormones'. De invloed van de hypothalamus op het organisme verloopt o.a. via het al of niet aan de bloedbaan afgeven van de produkten (glycoproteïnen) van de adenohipofyse. Wat de voortplanting betreft zijn deze produkten vooral het follikelstimulerend hormoon (FSH) en het luteïniserend hormoon (LH). Deze twee hormonen, ook wel de gonadotrope hormonen genoemd, oefenen hun invloed op het organisme uit via receptoren in het ovarium. In hoeverre prolactine bij landbouwhuisdieren een gonadotroop hormoon genoemd kan wor-

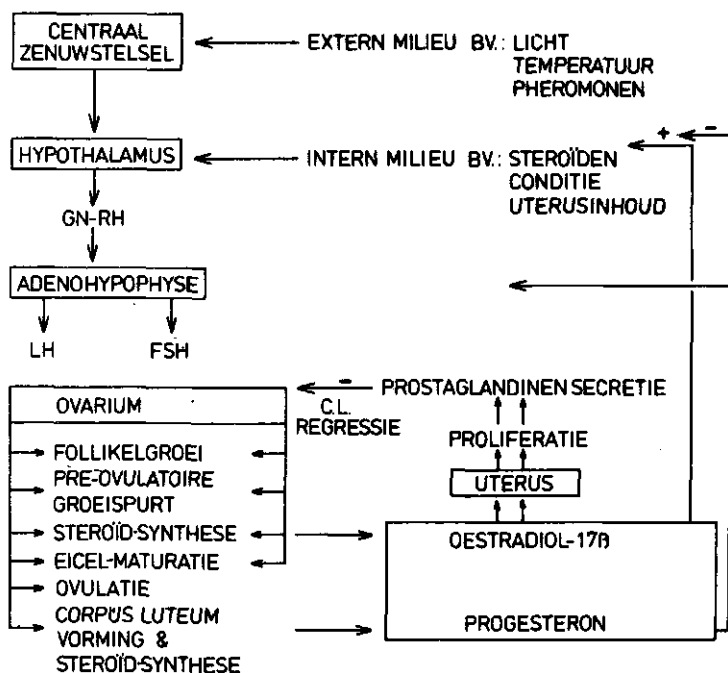


Fig., 3. Schema van de endocriene relaties met betrekking tot de voortplanting bij het vrouwelijke dier.

den is nog steeds een punt van discussie. FSH stimuleert in het ovarium de groei van eiblaasjes of follikels, het LH stimuleert vooral de steroidhormoon synthese en de préovulatoire groei van follikels. Gonadotrope hormonen en steroiden verzorgen samen de eicelrijping, de ovulatie en de vorming van het gele lichaam of corpus luteum uit de geovuleerde follikel. In de wand van de groeiende follikel wordt het steroidhormoon oestradiol gevormd tot kort voor de ovulatie. Daarna wordt in deze wand, die na de ovulatie uitgroeit tot corpus luteum, het steroidhormoon progesteron gesynthetiseerd. De invloed van het ovarium op het organisme uit zich o.a. in de werking van oestradiol en progesteron op de genitaaltractus om deze optimaal voor te bereiden op spermatransport, eiceltransport, de bevruchting, de aanhechting van de zygote in de baarmoeder en de vorming van de verbinding prostaglandine F2α in de

baarmoeder, die het progesteron producerende corpus luteum in regressie doet gaan bij afwezigheid van een zygote in de uterus. Progesteron speelt een rol bij de synthese en oestradiol bij de afgifte van PGF₂ α .

Naast de invloed op de genitaaltractus heeft het ovarium middels o.a. deze twee steroïden invloed op de afgifte van gonadotrope hormonen en op het fenomeen brontst. Progesteron remt het hypothalamo-hypofysaire systeem hetgeen resulteert in een basale lage concentratie LH in het perifere bloed. In aanwezigheid van een hoge concentratie progesteron (meer dan 1 ng ml⁻¹) komt de préovulatoire LH-piek niet voor en daarmee ook geen brontst en ovulatie. Bij een lage concentratie progesteron (lager dan 1 ng ml⁻¹) kan oestradiol een plotselinge afgifte van veel LH en daarmee ook een ovulatie induceren als het ovarium daarvoor gevoelig is. Zoals eerder besproken induceert oestradiol ook bij het schaap het brontstgedrag. Met een hoge dosering (ca. 80 μ g intramusculair) kan de brontst bij het schaap altijd worden geïnduceerd. Een lagere en misschien meer fysiologisch normale dosering kan alléén brontstgedrag induceren als het dier tevoren met progesteron gesensibiliseerd is.

Bovengenoemde elkaar beïnvloedende systemen zorgen ervoor dat ingeval geen drachtigheid ontstaat de brontst periodiek terugkeert. Dit wordt de oestrische cyclus genoemd.

De oestrische cyclus

De oestrische cyclus wordt doorgaans verdeeld in fasen. Naast de indeling 'pro-oestrus, oestrus, metoestrus en dioestrus' wordt ook gesproken van 'folliculaire fase en corpus luteum-fase', 'oestrogene- en progesteronfase' en 'proliferatie- en secretiefase'. Welke indeling men ook kiest, ze zijn alle weinig exact en niet goed bruikbaar voor een beschrijving van de precieze veranderingen welke tijdens een cyclus in het organisme optreden. Daarom is het beter een cyclus te verdelen in dagen, waarbij de eerste 24 uur van de brontst wordt aangeduid als D-0 (Dag-0), de daarop volgende als D1 en zo door tot de laatste dag van de cyclus. Bij permanente observatie kan men het begin van de brontst exact vaststellen; dit is namelijk het moment waarop het vrouwelijke dier de mannelijke partner bij dekking accepteert.

De verschillen tussen de diverse soorten landbouwhuisdieren voor wat betreft het in oestrus komen gedurende het jaar, de duur van de

oestrus en de oestrische cyclus moeten verklaard worden door verschillen in gevoeligheid van de hypothalamus voor de exogene factoren en door de verschillen in de endogene factoren. Aldus kan het voorkomen dat het paard en het schaap slechts een bepaalde periode van het jaar in oestrus komen; het paard in voorjaar en zomer elke 21 dagen gedurende ca. 4 dagen, het schaap van september tot februari elke 17 dagen gedurende 24 uur. Het varken en het rund komen gedurende het gehele jaar periodiek in oestrus. Het varken gedurende 1,5 tot 3 dagen elke 21 dagen, het rund elke 21 dagen slechts 18 uur. De dagen binnen deze perioden waarin geen bronst aanwezig is wordt dioestrus genoemd.

Deze en andere verschillen in endocrinologisch opzicht maken het onmogelijk de 'bronst op bestelling' bij alle genoemde landbouwhuisdieren in extenso te bespreken. De keuze bij het hierna beschreven onderzoek is gevallen op het schaap, omdat van dit dier endocrinologisch gesproken zeer veel bekend is, het vrijwel geen fertiliteitsproblemen kent en in de letterlijke betekenis van het woord misschien het minst gedomesticeerd is.

Het ritme van oestrus-dioestrus enerzijds en oestrusseizoen-anoestrusseizoen anderzijds is een resultaat van veranderingen in de activiteit van enkele endocriene organen. Deze veranderingen kunnen worden afgelezen aan de wisselende concentraties hormonen, die door deze organen aan de bloedbaan worden afgegeven.

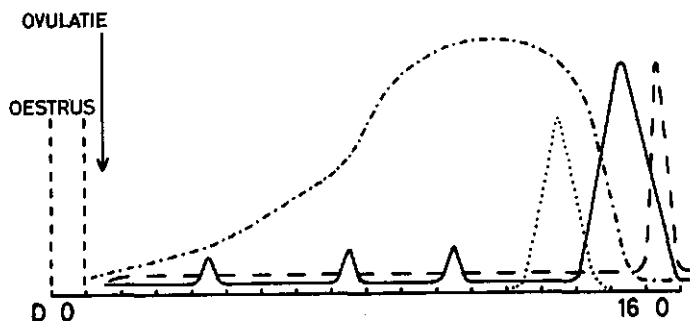


Fig. 4. Onderlinge relaties van de veranderende hormoonconcentraties in het bloed tijdens de oestrische cyclus (17 dagen) van het schaap. --- = progesteron, ---- = LH, — = oestradiol-17 β , ... = prostaglandine F2 α .

Hormonen uit de hypothalamus De 'releasing hormones' voor LH en FSH heeft men kunnen aantonen in het perifere bloed middels de radio-immunologische methoden. Variaties in de concentratie gedurende de oestrische cyclus zijn aangetoond, maar een directe relatie tussen de afgifte van deze hormonen en die uit de hypofyse is niet gevonden.

Hormonen uit de adenohipofyse

1. *Follikel-stimulerend hormoon* (FSH) Recente publikaties laten zien dat de afgifte van FSH wel met pulsaties verloopt gedurende de cyclus maar dat er geen sprake is van een cyclische variatie.

2. *Luteïnisatiehormoon* (LH) Het verloop van de concentratie LH gedurende de oestrische cyclus is als volgt samen te vatten. Van D1 tot en met D16 is de concentratie laag ($1-2 \text{ ng ml}^{-1}$). Op de daarop volgende dag (D0) treedt er een plotselinge stijging op, die nog dezelfde dag een maximum bereikt (LH-piek), en weer terugvalt tot het niveau van dag D15 of D16 er voor (figuur 4). Het tijdsinterval tussen het optreden van de LH-piek en de ovulatie is vrijwel constant en bedraagt 23-24 uur.

Geslachtshormonen uit het ovarium Onder invloed van de wisselende concentratie gonadotrope hormonen in het bloed hebben er allerlei veranderingen plaats in het ovarium gedurende de oestrische cyclus. De veranderingen welke macroscopisch aan het ovarium kunnen worden waargenomen, betreffen de groei van een aantal follikels aan het oppervlak van het ovarium, de ovulatie en het ontstaan, de groei en de regressie van het corpus luteum. Wat de follikels betreft kan men op elke dag van de cyclus wel grote follikels aantreffen, maar bij microscopisch onderzoek is gebleken dat dit geen homogene populatie follikels is. Men treft naast goede follikels, follikels in diverse graden van degeneratie aan. De veranderingen in het aantal goede follikels boven een bepaalde minimum grootte resulteren in twee follikelgroeiolven. De eerste loopt van D1 tot en met D9 of D10, de tweede van D6 tot en met D16 of D17 (= D0). De eerste groeigolf regresseert, de tweede eindigt in de ovulatie van één of meer follikels.

Oestradiol-17 β In de wand van de follikels en wel in de zogenaamde theca interna-cellen heeft de oestrogensynthese plaats. Daarbij geldt dat de groottoename van de follikel in de regel gepaard gaat met méér synthese, afhankelijk echter van de toestand of het aantal receptoren voor LH. In aanwezigheid van een corpus luteum, dat progesteron pro-

duceert, zijn er of weinig receptoren voor LH in de theca interna aanwezig, of de receptoren zijn niet in staat LH te binden, of de bezette receptoren kunnen de oestrogeensynthese in de cellen niet stimuleren. In het bloed dat het ovarium verlaat heeft men rond D4, D8 en D12 ca. 2 pg ml^{-1} oestradiol- 17β kunnen meten, maar grote hoeveelheden treden pas op wanneer het corpus luteum in regressie gaat, d.w.z. vanaf D14 of D15 tot en met de eerste acht uren van de bronst; de maximale concentratie echter steeds ca. 12 uur vóór de aanvang van de bronst (ca. $8\text{-}10 \text{ pg ml}^{-1}$) (figuur 4).

Progesteron Na de ovulatie ontwikkelt zich uit de wand van de ovuleerde follikel het corpus luteum. Het corpus luteum vertoont van D1 tot en met D3 een geringe en van D4 tot en met D10 een grote gewichtstoename. Daarna blijft het constant. Vanaf D14 zet de gewichtsdeling in en gaat het corpus luteum indien er geen graviditeit aanwezig is, in regressie. Parallel aan de ontwikkeling en de regressie van het corpus luteum verschijnt er vanaf D1 een meetbare hoeveelheid progesteron in het perifere bloed ($0,4 \text{ ng ml}^{-1}$). De concentratie gaat echter pas goed stijgen vanaf D4 om een maximum te bereiken op D9 of D10 ($1,5\text{-}2,5 \text{ ng ml}^{-1}$). Dit maximum blijft vrijwel tot D14 of D15 gehandhaafd, waarna er een snelle daling van de concentratie plaats heeft (figuur 4).

Hormonen uit de uterus Het is gebleken dat de afwezigheid van een embryo in de uterus op D12 bepalend is voor de regressie van het corpus luteum (luteolyse). Recentelijk is vastgesteld dat een deel van de uterus, en wel de oppervlakkige slijmlaag (endometrium), onder invloed van progesteron, prostaglandine $F2\alpha$ ($\text{PGF}2\alpha$) produceert en dat deze stof de verantwoordelijke luteolytische factor is bij het schaap. Een embryo in de uterus werkt luteotoop (corpus luteum stimulerend) zodat het $\text{PGF}2\alpha$ z'n uitwerking niet kan hebben. $\text{PGF}2\alpha$ is in het endometrium van niet drachtige dieren tussen D3 en D11 nog slechts in geringe mate aanwezig. Vanaf D12 neemt het gehalte toe tot een maximum op D14. Mogelijk staat daarom D12 centraal bij de regulering van de levensduur van het corpus luteum. In het utero-ovariële veneuze bloed komen tussen D13 en D17 een complex van $\text{PGF}2\alpha$ -piekjes (concentratieverhogingen) voor. De frequentie van de piekjes neemt toe van D13 tot en met D15, maar tijdens de oestrus is het aantal en de hoogte van de piekjes alweer sterk gereduceerd.

De genitaaltractus bij het schaap

De genitaaltractus van het vrouwelijk schaap bestaat uit een gepaarde eileider, een tweehoornige baarmoeder en een vagina. De baarmoeder wordt naar de buitenwereld afgegrensd door de cervix, deze is alleen tijdens de oestrus passabel.

In alle onderdelen van de genitaaltractus heeft men door microscopisch en biochemisch onderzoek, cyclische veranderingen gevonden die direct in verband gebracht kunnen worden met de hormonen in het bloed. Micromorfologisch en cytochemisch onderzoek van het epitheel dat de baarmoeder aan de binnenzijde bekleedt laat duidelijke uiteenlopende invloeden van progesteron en oestradiol-17 β zien. Het resultaat is dat het baarmoederepitheel op bepaalde dagen door het ene, op andere dagen door het andere cytochemische beeld getypeerd wordt. Aan de hand van slechts enkele criteria kan men binnen de oestrische cyclus niet minder dan 7 verschillende fasen onderscheiden (tabel 2). Daarbij wordt de oestrus door fase 1 en de pro-oestrus door fase 7 gemarkeerd. De relatie tussen het voorkomen van oestradiol-17 β en progesteron in het bloed en het voorkomen van de verschillende fasen in het baarmoederepitheel werd geanalyseerd door gebruik te maken

Tabel 2. Indeling van de endometriumcyclus in zeven fasen. Morfologische en cytochemische veranderingen in het oppervlakteëpitheel en stratum compactum gedurende de oestrische cyclus van het Texelse schaap. (Waarderingschaal 0 t/m 4: 0 = geen reactie, 4 = maximale reactie.)

	Fase in endometrium																
	1		2		3		4		5		6		7				
Cyclusedagen	16	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
In oppervlakteëpitheel:																	
Mitosefiguren	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glycogeen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	3
Lipiden	3	3	2	1	0	0	0	0	0	1	2	3	4	4	4	4	3
α -Naftylesterae-act.	0	0/1	2	3	4	4	4	3	2	1	0	0	0	0	0	0	0
Leucylaminopeptidaseact.	0	0	0	0	0	0	4	4	4	4	4	4	1	0	0	0	0
Zure fosfataseactiviteit	0	0	0	0	0	0	2	3	4	4	4	4	3	3	2	2	1
In stratum compactum:																	
Oedeem	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Alkalische fosfataseact.	0	0	0	0	0	0	3	3	4	4	4	4	3	3	3	3	2

van dieren die geen ovaria d.w.z. vrijwel geen endogene oestradiol-17 β -en progesteronproductie meer hadden. Deze dieren werden dagelijks behandeld met oestradiol-17 β of progesteron of kregen een opeenvolgende behandeling met deze hormonen zoals dat ook tijdens de cyclus het geval is. Na een voorbehandeling van het dier met progesteron brengt oestradiol-17 β het baarmoederepithel binnen twee dagen in fase 1, binnen drie dagen in fase 2 en binnen 4 of 5 dagen in fase 3. Na een voorbehandeling van het dier met oestradiol brengt progesteron het epithel in fase 4, 5 en 6. Wegebbende progesteroninvloed en toenemende oestrogene invloed resulteert in fase 7.

De toestand in de genitaaltractus tijdens de oestrus is derhalve heel duidelijk te onderscheiden van die op andere dagen in de cyclus. Zonder verder in te gaan op de fysiologische betekenis van de genoemde cytochemische karakteristiek van het baarmoederepithel mogen we veronderstellen dat fase 1 belangrijk is voor een optimaal spermatransport en een goede overlevingskans voor spermïën.

Endocriene regulatie van de bronst en ovulatie bij het schaap

Door erfelijke factoren bepaald, wordt bij een afnemende daglichtlengte op onze breedtegraad reeds vanaf augustus follikelgroei met oestrogeensynthese in het ovarium geïnduceerd. Bij een bepaalde concentratie oestradiol-17 β kan een piek van de LH-afgifte in het bloed optreden hetgeen ovulatie tot gevolg heeft. In deze periode kan ook de introductie van een ram een piek van de LH-afgifte bij de ooi ten gevolge hebben en bij voldoende follikelgroei ook een ovulatie (figuur 2).

Bronst treedt in beide gevallen dan nog niet op omdat het dier aan het eind van het anoestrusseizoen nog niet met progesteron voorbehandeld is. In het anoestrusseizoen worden er immers geen corpora lutea gevormd. Tengevolge van de eerste ovulatie zonder bronst (stille bronst) ontstaat er wel een corpus luteum met progesteron synthese. Daarmee treedt de blokkade van de piek van de LH-afgifte op. In het endometrium zal het progesteron de produktie van prostaglandine F2 α aanzetten. Aangezien er geen embryo in de uterus aanwezig kan zijn, zal onder invloed van een stijgende concentratie oestradiol-17 β de uterus aangezet worden tot de afgifte van PGF2 α , waardoor het corpus luteum op de 14e dag van haar bestaan in regressie gaat. Met deze regressie daalt de progesteronconcentratie in het bloed en geeft de basale LH-afgifte weer

aanleiding tot meer oestradiol-17 β -synthese in de tot ovulatie voorbestemde grote follikel. De concentratie oestradiol-17 β bereikt een maximale waarde, ca. 12 uur later gevolgd door brontsgedrag en ca. 24 uur later gevolgd door een piek van de LH-afgifte. Deze heeft dan 24 uur later de ovulatie tot gevolg. Daarmee is voor dit ene dier het bronts seizoen begonnen.

Individuele verschillen zijn er de oorzaak van dat in één kudde schapen het begin van het oestrus seizoen voor de afzonderlijke dieren zeer verschillend is. Dit verschil blijft zich voortzetten in het oestrus seizoen, waardoor de oestrus cycli niet synchroon verlopen en bront en ovulatie op verschillende dagen plaatshebben met een spreiding van maximaal 17 dagen. Deze spreiding, gesuperponeerd op de spreiding van ca. 8 dagen in de draagtijd, vindt men ook terug in de lammerperiode, deze duurt dan ca. 25 dagen. Neemt men daarbij ook nog de dieren die bij de eerste dekking niet concipieerden, dan kunnen de lammeren in de kudde geboren worden met een spreiding van $17 + 8 + 17 = 42$ dagen (figuur 5a).

De spreiding in het in-oestrus-komen bemoeilijkt de invoering van kunstmatige inseminatie (K.I.) bij schapen. De lengte van de lammerperiode (ca. 42 dagen) kan een groot bezwaar zijn bij schapen, zoals de Texelaar, waarbij partusbewaking noodzakelijk is in verband met een mogelijke moeilijke partus en de daarmee samenhangende perinatale sterfte van de lammeren. Men heeft daarom, vooral in landen als Australië en Nieuw Zeeland, gezocht naar methoden om de bront en ovulatie en daarmee ook de partus te synchroniseren. De methode moest goedkoop zijn en onder praktijkomstandigheden eenvoudig uit te voeren. De synchronisatie moest zó zijn, dat 'blind' insemineren mogelijk zou zijn. Hieronder wordt verstaan, insemineren zonder brontscontrole. De fertiliteit van de dieren zou daarbij natuurlijk niet gereduceerd mogen worden. Ook in Nederland bestond er belangstelling voor brontsynchronisatie, maar dan vooral in verband met de synchronisatie van de geboorte (figuur 5b).

De ontwikkeling van een methode voor brontsynchronisatie werd bespoedigd doordat een aantal stoffen in de handel kwam, zoals progesteron en met progesteron structureel gerelateerde steroïden (progestativa), oestradiol-17 β en oestradiolverwante stoffen (oestrogenen) en gonadotrope hormonen, waaronder het PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotrophin) uit het bloed van een drachtig paard, en het HCG

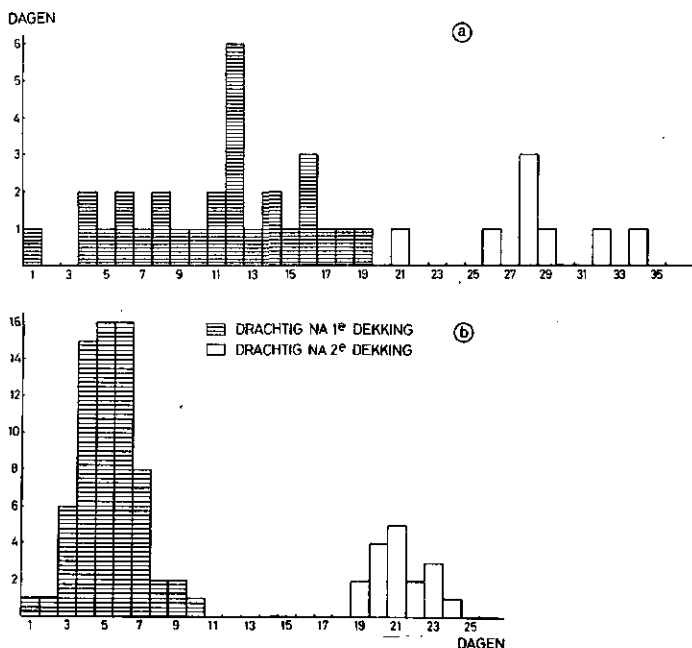


Fig. 5. Spreiding in het optreden van de partus in een kudde ooien die niet is gesynchroniseerd (a) en in een kudde ooien na oestrussynchronisatie (b).

(Human Chorionic Gonadotrophin), uit de urine van zwangere vrouwen. Recentelijk zijn ook prostaglandine F₂ α (PGF₂ α) en structureel daarmee gerelateerde stoffen en het gonadotroop hormoon-'releasing hormone' (Gn-RH) beschikbaar gekomen.

Bronstsynchronisatie met behulp van progestativa Zoals reeds aangegeven kan er in aanwezigheid van progesteron noch voldoende oestrogeensynthese plaatsvinden om bronst te induceren, noch een piek van de LH-afgifte en een ovulatie. In aanwezigheid van progesteron wordt follikelgroei niet verhinderd, maar de follikels produceren minder oestrogenen.

Van de bronst- en ovulatie-onderdrukkende werking van progesteron maakt men nu gebruik om bronstsynchronisatie bij landbouwhuisdieren

tot stand te brengen. Aanvankelijk gaf men de dieren dagelijks progesteron oraal of per injectie, maar deze beide methoden zijn te arbeidsintensief. Het implanteren van een stukje siliconenrubber geïmpregneerd met een progestativum onder de huid, of het aanbrengen van een sponsje geïmpregneerd met een progestativum in de vagina gaat eenvoudiger en beter. Men kan het implantaat of sponsje het beste beschouwen als een 'kunstmatig corpus luteum'. Implantaat en sponsje kan men naar believen en gemakkelijk verwijderen. In Nederland heeft het sponsje de voorkeur. Het inbrengen van het sponsje geschiedt met behulp van een plastic buis en een staaf (figuur 6a+b). Aan het sponsje zijn twee draadjes bevestigd. Men kan derhalve het sponsje verwijderen door aan de uit de schede hangende draadjes te trekken. Het aanbrengen

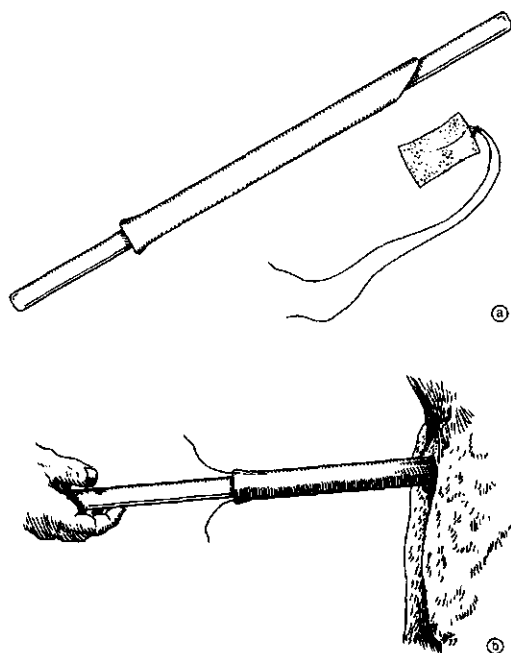


Fig. 6.

a. Polyurethaansponsje geïmpregneerd met een progestativum, en de buis waarmee het sponsje in de vagina wordt gebracht.

b. Het aanbrengen van het sponsje.

gen van implantaat of sponsje kan op elke willekeurige dag in het oestruseizoen geschieden. Het wegnemen moet plaatshebben op het moment waarop geen enkel dier meer over een eigen endogene progesteronbron in de vorm van het corpus luteum kan beschikken. Het corpus luteum bij een schaap in de oestruscyclus heeft een levensduur van 13-14 dagen. Wordt dus het sponsje na 14 dagen verwijderd dan is aan bovenstaande voorwaarde voldaan. Bij alle dieren, ongeacht de dag waarop de spons ingebracht is, is dan het eigen corpus luteum in regressie gegaan (figuur 7a).

Wanneer het implantaat of het sponsje bij alle dieren tegelijk wordt verwijderd, wordt de blokkade van progesteron op het ovarium en hypothalamus weggenomen. Dit impliceert een gelijke start van pré-ovulatoire groei van follikels, grotere oestradiol-17 β -synthese, bronst, optreden van een piek van de LH-afgifte en ovulatie. Vrijwel alle dieren komen binnen 48 uur na het verwijderen van spons of implantaat in oestrus (figuur 7a). De synchronisatie is zo sterk dat men, indien men K.I. wil toepassen, de bronst bij het individuele dier niet hoeft waar te

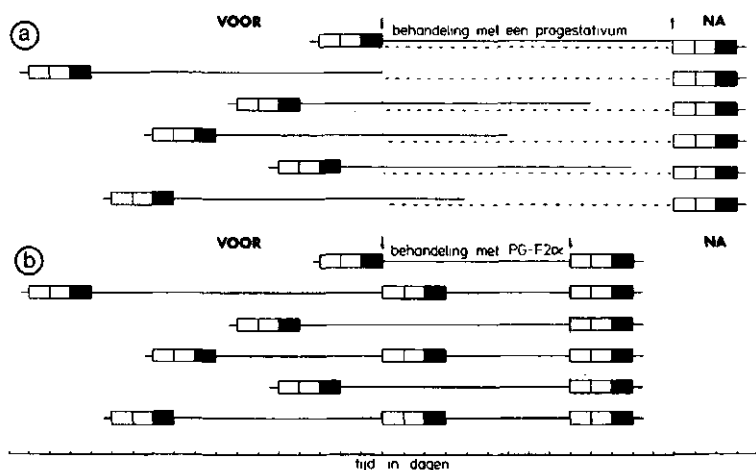


Fig. 7. Schema van de bronstsynchronisatie met progestativa (a) en (b) prostaglandine F2 α . De witte blokjes staan voor de follikelgroei met veel oestrogensynthese, de zwarte blokjes voor de bronst. De getrokken lijn staat voor de aanwezigheid van eigen corpus luteum, de gestippelde lijn de aanwezigheid van kunstmatig corpus luteum in de vagina.

nemen, maar inderdaad 'blind' kan insemineren (60-66 uur na verwijdering van de sponsjes).

Uit onderzoek bleek aanvankelijk, dat bij dekking, maar vooral bij inseminatie in de eerste oestrus na de behandeling, gesproken kon worden van een verlaagde fertiliteit. Een nadere analyse van het probleem was noodzakelijk. Daarbij leefde de vraag of het nadelig gevolg van de behandeling met progestativa het resultaat was van een directe invloed op het niveau van o.a. het ovarium of van de genitaaltractus. Een tweede vraag was of het nog verschil zou uitmaken of een dier aan het begin van de cyclus of in het midden van de cyclus het progestativum toegediend kreeg. In het ene geval is er nauwelijks sprake van een verlenging van de progestatieve fase, in het andere geval wel (figuur 7).

In de toen volgende onderzoeken werden als oorzaken voor de subfertiliteit aangegeven: veranderingen in de groei- en levensduur van follikels, de oestrogensynthese, de tijdsrelatie tussen het optreden van de bronst, de piek in de LH-afgifte en de ovulatie, alsmede nadelige effecten op de eicel en een nadelige invloed op het milieu van de genitaaltractus tijdens de oestrus, resulterend in een verstoring van het spermatransport. Dit laatste werd als belangrijkste oorzaak van subfertiliteit gebrandmerkt. Dit probleem kon men enigszins omzeilen door bij kunstmatige inseminatie te werken met zeer grote aantallen spermïën. Bij natuurlijke dekking was het percentage subfertiliteit gering, maar dáárvoor was de bronstsynchonisatie methode niet ontwikkeld.

De grootte van de verstoring en dus van de subfertiliteit hield zeker verband met de dag in de cyclus waarop met de behandeling werd gestart. De gedachte werd geopperd, dat bij gebruik van sponsjes de nadelige effecten het gevolg zouden kunnen zijn van de kwaliteit van de sponsjes en wel in die zin dat zij in de eerste dagen na applicatie te veel progesteron zouden afgeven en na enkele dagen een onvoldoende onderdrukking van de follikelgroei en steroïdsynthese in het ovarium zouden handhaven. Bij een dier dat vroeg in de cyclus (D2) een spons geapplianceerd krijgt zorgt het eigen corpus luteum, bij vroegtijdig onvolwaardig zijn van het kunstmatig corpus luteum, voor voldoende onderdrukking van follikelgroei en steroïdsynthese. Een dier dat later in de cyclus een spons geapplianceerd krijgt is de meeste tijd op het onvolwaardig kunstmatig corpus luteum aangewezen. Juist bij deze laatste dieren treden dan ongewenste effecten op in de genitaaltractus. In figuur 8 zijn de opeenvolgende veranderingen in ovarium en baarmoederpitheel tijdens

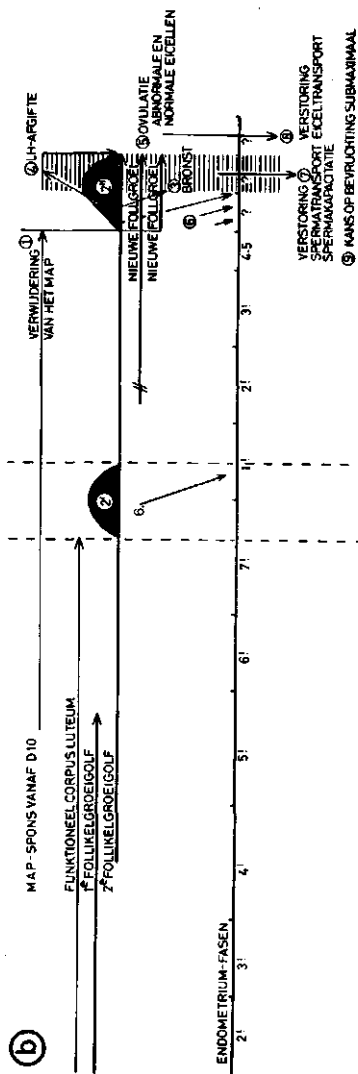


Fig. 8. Schematische weergave van de proefopstelling, de resultaten en de interpretatie van het onderzoek naar de relatie tussen ovarium- en endometriumepitheel tijdens de normale cyclus (a) en de door een sponsapplicatie op D10, verlengde cyclus (b). (MAP = 6 α -methyl-17 α -acetoxyprogesteron.)

Fig. 8a. (1). Achtenveertig uur vóór het optreden van de oestrus gaat het corpus luteum in regressie. Daardoor treedt er een groeispurt op in de aanwezige follikels, gepaard gaande met een toename van de oestradiol-17 β -concentratie in het bloed (2). Dit bereikt een maximale waarde op D16 en neemt daarna snel af. Twaalf uur na het optreden van de maximale waarde van de oestradiol-17 β -concentratie komt de ooi in oestrus (3). Vierentwintig uur na het optreden van bovengenoemd maximum heeft er een plotselinge stijging van de LH-concentratie plaats (4). Dit heeft 23-24 uur later de ovulatie (5) tot gevolg van oöcyten die zich ontwikkelden in follikels van de tweede follikelgroeigolf. De toename van de oestradiol-17 β -concentratie brengt gelijktijd het endometriumepitheel (6) van fase 7 naar fase 1. Deze fase maakt een normaal spermatransport en een goede spermakapacitatie (7) mogelijk. Na een ongestoord eiceltransport (8) is er een maximale kans op bevruchting (9).

Fig. 8b. Bij oestrussynchronisatie vanuit D10 gaat het normale corpus luteum op D14 in regressie. Bij aanwezigheid van een onvolwaardig kunstmatig corpus luteum (sponsje) produceren de follikels van de tweede follikelgroeigolf daarna oestradiol-17 β (2) en blijven persisteren. Op D23 wordt de MAP-spons verwijderd (1). Nu neemt de follikelgroei en oestrogensynthese grotere vorm aan (2). Dit induceert ongeveer 26 uur na het verwijderen van de spons de bronst (3) en ongeveer 12 uur na aanvang van de bronst de LH-piek (4). Hierdoor treedt na 24 uur de ovulatie (5) op van eicellen die afkomstig zijn van verschillende populaties follikels, waaronder persisterende follikels. Het endometrium (6) verkeert op het moment van de sponsverwijdering in fase 4/5 en komt onder invloed van de optredende oestrogensynthese in een andere fase, die echter niet overeenkomt met een fase uit de normale cyclus. Dit kan consequenties hebben voor het spermatransport en de spermakapacitatie (7). Bij het vrijkomen van oöcyten uit verschillende populaties follikels, waaronder persisterende follikels, en bij een mogelijk versneld eiceltransport (8) zal de kans op bevruchting (9) niet maximaal zijn.

de normale cyclus en bij sponsapplicatie op D10 in beeld gebracht. In figuur 8b is te zien dat tijdens de aanwezigheid van de spons een aanzienlijke oestrogeensynthese in het ovarium kan plaatshebben, dat follikels van de tweede follikelgroeigolf lang kunnen persisteren en dat het baarmoederepithel tijdens de eerste oestrus na de behandeling duidelijk kan afwijken van het normale beeld (???, zie figuur 8). Daardoor zouden de niet gewenste effecten op o.a. het spermatransport ontstaan.

Men heeft dan ook getracht de afgifte van het progestativum gelijkmatiger te laten geschieden door het in een ander oplosmiddel fijner te verdelen in het gehele sponsje. Bovengeschetste problemen zouden nu zijn opgelost zodat bronsynchronisatie met progestativa een goede methode is.

Bronssynchronisatie met behulp van PGF2 α Bij gebruik van prostaglandine F2 α om de brons bij schapen te synchroniseren moet men zich realiseren dat deze stof aangrijpt op het progesteron-producerend corpus luteum. Van D15 tot en met D0 is er geen progesteron-producerend corpus luteum en van D1 tot en met D4 is het corpus luteum zich aan het ontwikkelen en is dan nog ongevoelig voor PGF2 α .

Bij het synchroniseren van een kudde ooien zal het daarom noodzakelijk zijn twee injecties te geven met een tussenpose van 9 dagen. Immers:

- Injectie bij dieren tussen D14 en D4 heeft geen effect. Het dier vervolgt normaal zijn cyclus en zal zich na 9 dagen tussen D5 en D13 bevinden (fig. 7b).
- Injectie bij dieren tussen D5 en D14 zal leiden tot regressie van het corpus luteum en 48 uur later tot brons en ovulatie. Na 9 dagen bevinden deze dieren zich alle op D5 of D6 van de nieuwe cyclus.

Bij toedienen van de tweede injectie heeft elk dier een corpus luteum dat gevoelig is voor PGF2 α . De tweede injectie leidt dus in alle gevallen tot brons binnen 48 uur (figuur 7b). Duurt de behandeling met progestativa 14 dagen, bij gebruik van PGF2 α duurt de gehele procedure 9 dagen.

Over de fertiliteit na toepassing van PGF2 α is echter nog weinig bekend.

Bronssynchronisatie door introductie van rammen of injecteren van gonadotrope hormonen We hebben gezien dat onder invloed van de

afnemende daglichtlengte er op onze breedtegraad in augustus reeds follikelgroei met voldoende oestrogeensynthese aanwezig is om voor het eerst een piek van de LH-afgifte en ovulatie te induceren (stille bront). Indien we deze follikelgroei met oestrogeensynthese bij veel dieren tegelijk stimuleren of indien we bij reeds voldoende follikelgroei bij veel dieren tegelijk een piek van de LH-afgifte kunnen bewerkstelligen, dan hebben we ook een methode om de ovulatie te synchroniseren. Indien we dit kort voor de aanvang van het oestrusseizoen doen is de kans groot dat 17 dagen na de gesynchroniseerde piek van de LH-afgifte en ovulatie ook de bront gesynchroniseerd zal optreden. Follikelgroei en oestrogeensynthese kan men stimuleren door injecteren van gonadotrope hormonen (FSH en LH), LH-afgifte door de introductie van rammen (figuur 2). De introductie van rammen in de laatste helft van augustus is een lang bekende methode voor brontsynchronisatie. Zowel het toedienen van gonadotrope hormonen als de introductie van rammen zijn methoden die alleen beschikbaar zijn kort voor de aanvang van de periode waarin normaal reeds 'stille bronten' optreden. Is men te laat, dan zal de aanwezigheid van een corpus luteum de synchronisatiegraad negatief beïnvloeden. Deze beide methoden vereisen een goede tijdsbepaling. Het injecteren van gonadotrope hormonen alleen ter verkrijging van gesynchroniseerde bront is weinig toegepast. Bij synchronisatie met behulp van ramintroductie (bio-stimulatie) kan men nog een redelijke synchronisatiegraad halen (ca. 50%) te beoordelen aan de lammertijd. Toch is deze methode veel minder effectief dan synchronisatie met progestativa of PGF 2α .

Met behulp van progestativa en prostaglandinen, gonadotrope hormonen en rammen kunnen we nu onder Nederlandse omstandigheden 'bront op bestelling' verzorgen van september tot februari. Resteert er echter nog een heel seizoen waarin schapen niet in bront komen. Bij een draagtijd van 5 maanden en een lactatieperiode van ca. 2 maanden zou het echter mogelijk moeten zijn elke 7 à 8 maanden lammeren te krijgen. Dit impliceert dat getracht moet worden bront en ovulatie te induceren in een periode waarin dit normaal niet voorkomt, d.w.z. brontinductie.

Brontinductie

Het anoestrusseizoen bij het schaap ontstaat mede door het lengen der

dagen en het stijgen van de temperatuur. Het wordt gekenmerkt door afwezigheid van brons en ovulatie. Brons en ovulatie kan men dus induceren door o.a. in licht- en klimaatkamers de temperatuur te verlagen maar vooral door de lichtperiode te verkorten. Deze methode is arbeidsintensief maar vindt toch steeds meer toepassing.

Men kan echter ook anders te werk gaan, namelijk door toedienen van een progestatium en van gonadotrope hormonen. Het is niet moeilijk een brons op te wekken in het anoestrusseizoen door het injecteren van een hoge dosis oestradiol. Men induceert dan wel brons maar meestal geen ovulatie. De hoeveelheid oestradiol die endogeen in de follikels gesynthetiseerd wordt kan echter wel brons induceren, maar dan moet het dier tevoren met progesteron voorbehandeld zijn geweest zoals tijdens het oestrusseizoen. Het is evenmin moeilijk een ovulatie te induceren in het anoestrusseizoen door het injecteren van PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotrophin), een gonadotroop hormoon gewonnen uit het bloed van een drachtig paard en dat zowel een FSH- als een LH werking heeft. De PMSG-injectie zal de follikelgroei stimuleren, alsmede de oestrogen synthese in deze follikels. Ook zal dit leiden tot een ovulatie, maar evenals bovenomschreven zal de PMSG-gestimuleerde oestrogen-synthese niet in staat zijn oestrus te induceren wanneer de dieren niet voorbehandeld zijn met progesteron.

Het injecteren van een hoge dosis oestradiol voorafgegaan door, vergezeld van of gevolgd door een injectie PMSG zal niet altijd leiden tot een juiste opeenvolging van gebeurtenissen als follikelgroei, brons, LH-afgifte en ovulatie. Het heeft zeer gevarieerde resultaten ten gevolge. Deze methode wordt dan ook niet toegepast. Het tweemaal injecteren van PMSG met een tussentijd van ca. 17 dagen heeft na de tweede injectie wel vaak brons en ovulatie ten gevolge, wanneer na de eerste injectie een functionerend corpus luteum is gevormd. Daaruit wordt geconcludeerd dat voor inductie van brons en ovulatie middels een PMSG-injectie een voorbehandeling met progesteron noodzakelijk is.

De meest voor de hand liggende methode is dan ook de applicatie van het progesteronsponsje in de vagina gedurende tenminste 9 dagen en een PMSG-injectie op het moment dat de sponsjes verwijderd worden. Het PMSG stimuleert de follikelgroei en de oestradiol-synthese. Deze laatste blijkt nu voldoende te zijn voor inductie van brons en ovulatie aan het begin (maart-april) en het eind (juli-augustus) van het anoestrusseizoen. In het midden van het anoestrusseizoen (mei-juni)

komen minder dieren in oestrus terwijl ze vrijwel alle ovuleren. Voor deze groep moet de bestaande methode nog verbeterd worden.

De fertiliteit na bronsinductie is van veel factoren afhankelijk. Bij oestrusinductie in het vroege anoestrusseizoen heeft men veelal te doen met lacterende dieren. Niet alleen het stadium van de lactatie is van belang, maar bovendien het feit of één of twee lammeren worden gezoogd. Goede resultaten worden verkregen wanneer de oestrusinductie wordt toegepast na het verwijderen van de lammeren en buiten de maanden mei en juni.

Over de fertiliteit van de ram in het anoestrusseizoen behoeft men zich geen zorgen te maken. Alhoewel deze ook onderhevig is aan veranderingen in daglichtlengte en temperatuur, blijven libido en spermakwaliteit zodanig dat een ooi in oestrus gedekt en bevrucht kan worden. In het anoestrusseizoen plaatst men eenvoudig meer rammen per kudde (1 op 7 oaien) of men ziet nauwkeurig toe dat elke ooi wel een of meer keren gedekt wordt waarna ze verwijderd wordt. Dit laatste is altijd goed omdat rammen een sterke voorkeur voor één ooi kunnen hebben, zodat er zonder ingrijpen een aantal oaien niet gedekt wordt.

In de praktijk wordt ook bij bronsinductie de spons gedurende 13-14 dagen in de vagina gelaten. Het enige verschil in de methode voor bronsynchronisatie en bronsinductie is dan dat bij laatstgenoemde aan het einde van de behandeling een PMSG-injectie noodzakelijk is. Men dient zich echter goed te realiseren dat een behandeling van 13-14 dagen met een progestativum bij bronsynchronisatie tijdens het bronsseizoen noodzaak is terwijl bij bronsinductie met minder dagen kan worden volstaan.

Met de aangegeven methoden heeft men voldoende mogelijkheden om het gehele jaar bij schapen 'brons op bestelling' te leveren.

De voordelen zijn vooral:

- Meer lammeren per ooi per jaar.
- Eerder gebruik van jonge oaien (normaal worden de meeste oilammeren pas op $1\frac{1}{2}$ -jarige leeftijd gedekt, nu kan dat binnen 1 jaar). Arbeidsbesparing rond de partus met beperking van de perinatale sterfte.
- Een uniforme opfok van lammeren, hetgeen voordeel biedt bij verzorging, ziektepreventie en later bij bronsinductie.
- Geprogrammeerde toepassing van K.I., hetgeen arbeidsbesparing meebrengt door het wegvallen van de oestrusdetectie.

De nadelen zijn:

- De behandelingskosten.
- Grotere huisvestings-, voedings- en verzorgingskosten, vooral in de wintermaanden.
- Mogelijk enige negatieve beïnvloeding van de fertiliteit.
- Hogere kosten bij toepassing van K.I. of meer rammen bij toepassing van de natuurlijke dekking.

Zolang K.I. met diepvriessperma nog niet op grote schaal en met groot succes kan worden toegepast blijft het aantal rammen dat nodig is om na oestrussynchronisatie en gesynchroniseerde oestrusinductie het grote aanbod bronstige oöien te bevruchten, een groot nadeel!

Toepassingen bij varken, rund en paard

Was de vraag naar bronst bij het schaap vooral een vraag naar gelijktijdig optreden van bronst en ovulatie in een grote groep dieren, anders is dit gelegen bij varken, rund en paard. De principes van bronsynchronisatie en bronsinductie zijn ook voor deze dieren vrijwel gelijk, maar de vraag naar bronst kan zeer uiteenlopende redenen hebben.

Bronstsynchonisatie De vraag naar bronsynchronisatie bij rund en varken beperkt zich tot de jonge fokrijpe dieren die nog niet eerder drachtig geweest zijn. De behandeling met progestativa leidt bij het rund nog tot een verlaging van de fertiliteit, bij het varken resulteert het in ernstige ontsporingen in de follikelontwikkeling. Bij het rund wordt daarom de behandeling met prostaglandine toegepast. Daarbij worden twee injecties met PGF₂ α of analoga met een tussenpoos van 11 dagen toegediend. Zowel synchronisatie als de fertiliteit na een PGF₂ α -behandeling zijn bij pinken goed.

Het corpus luteum van het varken is tot D12 ongevoelig voor de effecten van PGF₂ α . Een corpus luteum persistens of een corpus luteum graviditatis zijn hiervoor echter wel gevoelig. Het laten persisteren van het corpus luteum door het toedienen van oestadiol-17 β tijdens de corpus luteum-fase en het daarna toedienen van PGF₂ α gaat misschien tot de mogelijkheden behoren. Op dit moment wordt bronsynchronisatie bij jonge fokrijpe varkens (gelten) derhalve nog niet op grote schaal toegepast. In geval bronsynchronisatie bij zeugen na het spenen gewenst is, kan dit alleen verkregen worden door op eenzelfde dag bij alle zeugen tegelijk de biggen weg te nemen. Het varken kent namelijk

een lactatie anoestrus. Vijf tot acht dagen na het wegnemen van de biggen komen de meeste dieren in oestrus.

Bij het paard is er geen vraag naar brontsynchronisatie in een grote groep. Incidenteel kan het voorkomen dat een eigenaar enkele dieren op dezelfde dag in oestrus wil hebben bijvoorbeeld in verband met dekking door een hengst elders in het land. In dat geval kan aan de wens tegemoet gekomen worden door één injectie met PGF2 α op de daarvoor gevoelige dagen. De fertiliteit van het paard na een PGF2 α -behandeling is ongewijzigd.

Bronstinductie Zoals het schaap heeft ook het paard een duidelijk anoestrusseizoen. Toename van de daglichtlengte is de belangrijkste stimulus voor de inductie van het brontseizoen. Deze stimulus kan men in licht- en klimaatkamers met succes nabootsen, zodat de aanvang van het brontseizoen aanzienlijk vervroegd wordt.

De vraag naar bronstinductie bij dieren die geen anoestrusseizoen kennen, zoals varken en rund, komt meestal pas aan de orde wanneer de bront niet optreedt op momenten waarop ze normaal verwacht mag worden. Hieraan kunnen vele oorzaken ten grondslag liggen. Gedacht wordt aan nadelige effecten die donkere behuizing en inadequate voeding bij een grote melkgift kunnen hebben op de follikelgroei en oestrogeensynthese. Het gevolg kan zijn dat dieren niet meer in oestrus komen (anoestrus) of té frequent in oestrus komen (nymphomanie). Vaak echter tast men volledig in het duister. Dit geldt speciaal bij het varken, waarbij inwendig onderzoek van de ovaria onmogelijk is. Bij het rund kan men via het rectum de ovaria aftasten. Na een dergelijk individueel onderzoek kan men vaak de juiste therapie kiezen voor bronstinductie.

Slotopmerking

Dank zij endocrinologisch onderzoek, dat bij landbouwhuisdieren vaak moeizaam verloopt door de bijzondere eigenschappen van de diverse diersoorten en door hun grote economische waarde, kunnen nu bront en ovulatie, en daarmee ook de tijdstippen van de geboorte van jonge dieren, van te voren worden geregeld. Daardoor kan de moderne veehouderij efficiënter worden uitgeoefend en het aantal nakomelingen per dier per jaar worden vergroot.

Hormonen en insectenbestrijding

G.B. Staal

Inleiding

De mogelijkheid, endocrinologische principes toe te passen in de insectenbestrijding heeft aan het fundamentele entomologische onderzoek een nieuwe, zeer boeiende dimensie gegeven. De communicatie tussen de beoefenaren van fundamentele wetenschap en de door realiteit van economische principes geleide ontwikkelaar van bestrijdingsmiddelen is echter veelal ietwat moeizaam. Vele aanvankelijk hooggespannen verwachtingen zijn door commerciële overwegingen tot meer reële proporties teruggebracht. Ondanks ongeveer tien jaren van vrij intens onderzoek, heeft geen algemene revolutie in de insectenbestrijding plaatsgevonden. Toch zijn er een aantal nuttige praktische toepassingen ontwikkeld en ook is duidelijk geworden, dat een rationele aanpak in de ontwikkeling van nieuwe bestrijdingsmiddelen gebaseerd op een verdere ontplooiing van het onderzoek naar de regulatie van levensprocessen in insecten, nog vele perspectieven biedt.

De land- en tuinbouw zullen waarschijnlijk in nog grotere mate dan nu afhankelijk blijven van chemische bestrijdingsmiddelen, omdat de teeltmethoden steeds intensiever worden en de monocultures daardoor steeds minder lijken op evenwichtige biologische gemeenschappen. De 'geïntegreerde' bestrijding waartoe specifieke cultuurmaatregelen, het eenmalig of continu introduceren van biologische bestrijdingsvormen, het gebruik van zeer selectieve middelen en een meer rationeel gebruik van conventionele middelen behoren, is in opmars en verdient zeer zeker onze voortdurende aandacht en steun, maar in de totaliteit van het wereldlandbouwbestel speelt hij vooralsnog geen rol van betekenis.

Naast de nadelen van bestrijdingsmiddelen met breed werkingspectrum voor de mens en het milieu kan er nog sprake zijn van een verstorend effect op de biologische evenwichten rond het plaaginsekt.

Hierdoor kunnen de primaire plagen zeer snel en in versterkte mate terugkeren en kunnen voordien niet hinderlijke secundaire plagen de kop opsteken. Dit resulteert dan in een toenemende afhankelijkheid van deze chemische middelen. Niettemin worden de nadelen meestal nog gecompenseerd door de lage prijs, de snelle werking, de goede voorspelbaarheid van het effect en de betrouwbare verkrijgbaarheid. Het vermogen van insectenpopulaties om resistentie op te bouwen tegen chemische bestrijdingsmiddelen maakt een voortdurende ontwikkeling van essentieel nieuwe middelen noodzakelijk en het streven om hierbij een grotere selectiviteit in te bouwen kan duidelijk worden onderkend.

Selectiviteit, die gevonden kan worden op verschillende niveaus, is vrijwel altijd een wenselijke eigenschap als het een werking op de mens en op 'non-target'-organismen betreft. Selectiviteit binnen de orde Insecta is echter vaak vergelijkbaar met een zwaard dat snijdt aan twee kanten. Een te beperkte selectiviteit voor één of enkele plaagsoorten is meestal niet wenselijk, omdat ze de afschrijvingskosten van de huidige zeer hoge ontwikkelingskosten belemmert en daardoor een redelijke consumentenprijs onmogelijk maakt. De ontwikkelingskosten voor een bestrijdingsmiddel, waarin zijn begrepen kosten van research, veldproeven, toxicologisch onderzoek, investeringen in productiecapaciteit en het opbouwen van een distributieapparaat, zijn nu zodanig hoog geworden (ca. 15 tot 25 miljoen gulden per bestrijdingsmiddel), dat het aan-de-markt-komen van nieuwe middelen sterk wordt afgeremd. Bovendien wordt het investeringsrisico sterk vergroot door de lange periode die nodig is om alleen nog maar de gemaakte onkosten terug te winnen (8 tot 10 jaar), waarbij concurrentiefactoren, het optreden van resistentie en niet-voorzien lacunes in de exclusiviteit verkregen door patenten de gehele investering kunnen vernietigen (Djerassi et al., 1974; Green, 1976).

De overgrote meerderheid van de huidige bestrijdingsmiddelen zijn snelwerkende zenuwvergiften, behorend tot enkele chemische hoofdgroepen (organische fosforverbindingen, gechloreerde koolwaterstoffen, carbamaten en pyrethroïden), die geen twijfel laten bestaan aan de onmiddellijke efficiëntie van een bestrijding. Middelen die voortkomen uit het onderzoek naar de regulatie van de ontwikkeling van insecten zijn in principe langzaam in hun uitwerking en vereisen een meer intelligente benadering in hun toepassing, omdat veelal niet alle stadia gevoelig zijn en de beoordeling van de uitwerking moeilijker is.

Het gebruik van de term insektgroeiregulators (IGR) is ingevoerd voor stoffen die door hun hormonale werking op insecten praktische toepassing kunnen vinden, aangezien het woord hormonen verwarrende associaties opwekt met de hormonen van vertebraten. De tot dusverre ontwikkelde IGR hebben inderdaad geen verwantschap met vertebratenhormonen. IGR in de meest ruime zin zijn stoffen die groei en differentiatie van insecten beïnvloeden. Hiertoe behoren dus niet de stoffen die de functie van het motorische zenuwstelsel beïnvloeden of stoffen met algemeen biocide werking. Omdat veel van de groeiprocessen en formatieve processen in insecten essentieel verschillen of op essentieel verschillende wijze worden gereguleerd in vergelijking met andere diergroepen, impliceert de IGR-definitie een hoge mate van selectiviteit ten aanzien van insecten.

Toch zijn de IGR waarop deze definitie van toepassing is, een heterogene verzameling die in de toekomst waarschijnlijk nog sterk zal worden uitgebreid. Het is daarom belangrijk een verdere kwalificatie toe te voegen die de werkingswijze nader specificiert, bijvoorbeeld IGR met de werking van juveniel hormoon. Ook dan nog zijn generaliserende conclusies zonder verdere specificatie van de chemische identiteit meestal niet gerechtvaardigd omdat resultaten met een bepaald juveniel-hormoon-analoon niet behoeven te gelden voor *alle* analoga van dit type.

Stoffen met een IGR-werking kunnen ofwel op rationele wijze worden ontwikkeld uit lichaamseigen stoffen, waarbij meestal de werkingswijze enigszins kan worden voorspeld, ofwel bij toeval worden gevonden en herkend als IGR. In dit laatste geval kan het uitwerken van de werkingswijze meer tijd vragen. Ook is het mogelijk dat stoffen worden gevonden waarbij sprake is van meer dan één werkingswijze in één molecuul (kinopreen); één van de werkingswijzen is dan meestal een toevallige vondst.

De toepassing van lichaamseigen stoffen als bestrijdingsdoeleinden kan alleen succes hebben als er perioden voorkomen in de ontwikkeling van het insect waarin de afwezigheid van deze stof van essentieel belang is voor een normale ontwikkeling. Het is ook tevens noodzakelijk dat het effect van de toediening irreversibel is ten aanzien van de levensvatbaarheid, of althans ten aanzien van de schade die het insect kan veroorzaken.

Juveniel hormonen

Aan de genoemde voorwaarden wordt duidelijk voldaan door het juveniel hormoon (JH). Normale metamorfose vereist een periode aan het einde van de larvale ontwikkeling waarin het JH afwezig is (onder normale omstandigheden wordt deze lage JH-titer bewerkstelligd door het ophouden van de secretie en door de toename van afbraakenzymen). Toediening van JH of van bepaalde chemische analoga verhindert de metamorfose geheel of gedeeltelijk en meestal is het resultaat een morfologische tussenvorm tussen larve en pop of tussen larve en imago, die geen verdere levensvatbaarheid meer heeft. De sleutel tot de irreversibiliteit van het effect is hier de periodieke vervelling van het exoskelet die de expressie van een abnormale JH-titer onherroepelijk fixeert.

In de praktijk is het niet altijd zo eenvoudig; vele soorten hebben het vermogen om verdere vervellingen uit te stellen als een vorm van zelfbehoud indien abnormaal hoge JH-titers worden waargenomen. Duurt de hormoondruk evenwel te lang, dan vindt de abnormale vervelling toch plaats ofwel de dood treedt in zonder verdere vervelling. Deze reactie wordt voornamelijk geconstateerd bij bepaalde inseksoorten met volledige gedaanteverwisseling (kevers en vlinders) en is een voorbeeld van een echte of schijnbare interactie tussen JH en vervellingshormoon.

Juveniel hormonen doen meer dan alleen het sturen van de metamorfose; zij hebben ook een embryocide werking op jonge eieren, kunnen bepaalde vormen van diapauze (rusttoestand) verbreken en kunnen de normale kasten-, fasen-, en morfendeterminatie in bepaalde soorten verstoren. Maar alleen de werking op de metamorfose is direct genoeg om perspectieven te bieden t.a.v. de bestrijding.

Vervellingshormonen

De bloedtiters van vervellingshormonen (MH) vertonen periodieke pieken gedurende elk onvolwassen stadium en algemeen wordt aangenomen dat deze pieken het tijdstip voor de volgende vervellingscyclus bepalen. De kennis van de fysiologische betekenis van de lage titers tussen de pieken is echter verder nog onvoldoende. Extra toedieningen van vervellingshormonen gedurende de perioden van actieve ontwikkeling van insecten in min of meer fysiologische doses hebben meestal

geen bijzonder ingrijpende verstoringen tot gevolg, maar d.m.v. toediening van een overdosis kan soms het verdere ontwikkelingsprogramma worden veranderd of de volgende vervelling op letale wijze worden verstoord.

Andere insektengroeiregulatoren

Anti-juveniel hormonen (AJH) zouden theoretisch vrijwel onmiddellijk optredende metamorfose kunnen veroorzaken en zo het insect voor goed kunnen uitschakelen. Ook een iets minder onherroepelijk effect op de productie van eieren door het volwassen dier is zeer goed denkbaar. Enkele stoffen met een AJH-werking zijn nu bekend.

Anti-vervellingshormonen (AMH) zouden de verdere ontwikkeling van onvolwassen stadia kunnen stilzetten, maar het is vooralsnog de vraag of een dergelijk effect irreversibel zou zijn omdat zich een diapauze-achtige toestand instelt die zich mogelijkerwijze herstelt als het AMH wordt afgebroken. Tot dusverre is slechts één groep AMH-verbindingen bekend, de azosterolen (figuur 2), die de conversie van cholesterol in vervellingshormoon tegenwerken (Robbins et al., 1975). Aangezien deze stoffen ook het cholesterolmetabolisme van hogere dieren in de war sturen en zij de meerderheid van de insectesoorten niet beïnvloeden, omdat meestal ook andere sterolen uit de voeding voor MH-synthese kunnen worden gebruikt, hebben deze stoffen vooralsnog geen toepassing gevonden. Aangezien meer specifiek werkende AMH tot dusverre niet zijn gevonden, zullen deze hier niet verder worden besproken.

Volledigheidshalve moet hier ook een stof worden genoemd die tot de IGR wordt gerekend en die voor zover bekend niet op het endocriene systeem inwerkt, namelijk diflubenzuron. Deze en verwante stoffen sturen de synthese van chitine in de war en leiden zo tot letale abnormaliteiten van het exoskelet in de volgende vervellingen. Deze stoffen zijn zodanig specifiek voor insecten, dat zij goede perspectieven bieden voor de bestrijding. Een verdergaande bespreking valt buiten het kader van dit hoofdstuk.

Het is zeer waarschijnlijk dat in de toekomst nog vele andere typen IGR zullen worden gevonden, gebaseerd ofwel op hormonen die nog op hun identificatie wachten ofwel op meer toevallige ontdekkingen tijdens insecticidentoetsingen. Met enige verwachting kan bijvoorbeeld de

identificatie van bepaalde neurohormonen, die het endocriene systeem reguleren, worden tegemoetgezien. De geringe hoeveelheden waarin deze stoffen voorkomen, maar ook het vooralsnog ontbreken van bevredigende biologische toetsmethodieken, zijn de oorzaak van de achterstand op dit gebied. Zelfs als de identiteit vastgesteld is, is het uiteraard zeer de vraag of ze eigenschappen bezitten die hun gebruik als bestrijdingsmiddel mogelijk maken.

De praktische toepassing van IGR met JH-werking

De huidige ervaringen met IGR op hormonale basis zijn voornamelijk gebaseerd op het gebruik van JH-analoga. De fundamentele biologische aspecten hiervan zullen verder worden toegelicht waarbij voortdurend de economische realiteit waaraan de ontwikkeling van bestrijdingsmiddelen is onderworpen in overweging wordt genomen. Deze beschouwing maakt het ook mogelijk te speculeren over de verdere toekomst van de IGR.

De drie natuurlijk voorkomende juveniel hormonen (JH-I, JH-II en JH-III; figuur 1), die in de onderzochte soorten ofwel afzonderlijk ofwel in diverse combinaties voorkomen (Judy et al., 1976), zijn echter nimmer serieuze kandidaten geweest voor de ontwikkeling tot bestrijdingsmiddel, ofschoon met één van deze stoffen wel veldproeven zijn uitgevoerd (Bagley & Bauernfeind, 1972). Industriële interesse in dit nieuwe principe heeft geleid tot de synthese en toetsing van vele duizenden analoga tussen 1967 en 1975. Hierdoor zijn een aantal stoffen gevonden die veelal een veel hogere specifieke activiteit bezitten ten aanzien van bepaalde insectengroepen (dus meer selectieve werking), die veel stabiel zijn in het milieu dan het zeer lichtgevoelige natuurlijke JH, dat veel minder kostbaar is in zijn synthese en die enige patentbescherming kon verschaffen aan de industrie die de stof zou moeten ontwikkelen. Dit laatste is een absolute voorwaarde voor elke ontwikkeling van nieuwe bestrijdingsmiddelen.

Al deze analoga van JH hebben één eigenschap gemeen, de JH-werking, die kwantitatief gemeten kan worden met biologische toetstechnieken. Het is verbazingwekkend, dat duizenden verschillende Verbindingen, die weliswaar structurele verwantschap vertonen maar toch alle chemisch verschillen, één enkele hormoonwerking kunnen imiteren, zij het dan ook dat hun specifieke activiteit kan variëren van uitermate

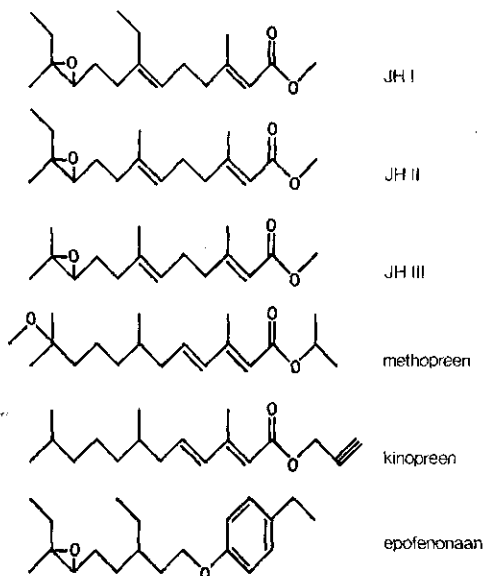


Fig. 1. Structuurformules van natuurlijke juveniel hormonen en van enige van de meest actieve, praktisch toepasbare analoga.

gering tot zeer groot.

De breedte van het activiteitsspectrum, vaak 6 of meer orden van grootte, wordt bepaald door de toetsmethodiek (Staal, 1972). Een verklaring van de betrekkelijke aspecificiteit van de JH-doelwit-organen is nog niet gegeven; de kennis van de (hypothetische) JH-receptoren is vrijwel nihil. Er moet echter worden opgemerkt dat de JH-receptoren wel zeer goed onderscheid kunnen maken tussen optische isomeren van natuurlijk JH en van de analoga. De tot dusverre waargenomen activiteitsverschillen tussen enantiomeren zijn zodanig groot dat aangenomen kan worden dat één van de beide optische vormen geheel inactief is. Helaas is het met de huidige stand van de chemische synthese nog niet mogelijk gebleken om absoluut zuivere enantiomeren te bereiden of deze zuiverheid zeer nauwkeurig te meten (althans voor JH); een één-procentige bijmenging van de actieve vorm in de andere vorm is voldoende om een absolute meting te verstoren. Ongeacht de biologische

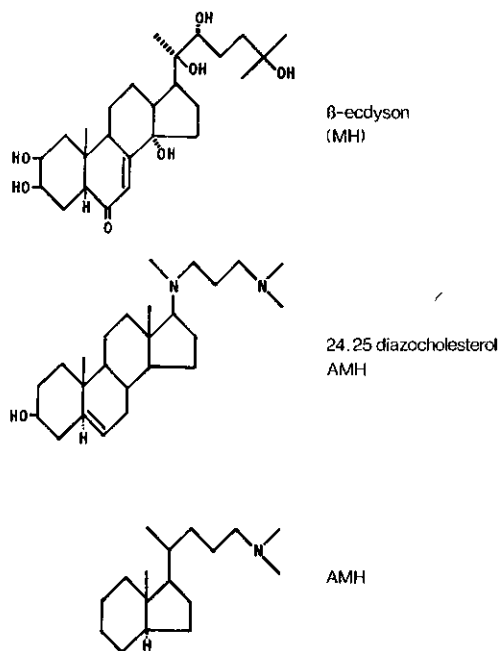


Fig. 2. Structuurformules van β -ecdyson en enige vervellingshormoonantagonisten.

interessante eigenschappen van enantiomeren staat wel vast dat zij geen praktische betekenis kunnen verkrijgen.

Bij alle uitwendige toedieningen van JH en JH-analoga moet worden aangetekend, dat de dosis die nodig is om een bepaald effect te verkrijgen meestal hoger dient te zijn dan voorspeld zou kunnen worden uit de bepalingen van de hormoon-titers in insecten. Klaarblijkelijk heeft het insect wegen gevonden om zeer zuinig te zijn met inwendig geproduceerd JH; wegen die niet automatisch ter beschikking staan van uitwendig toegediend hormoon. Endogeen JH kan zich bijvoorbeeld door binding met bloedproteïnen beschermen tegen katabolische enzymen.

Het is nog steeds niet zeker of de drie natuurlijk voorkomende juveniel hormonen die alleen chemisch verschillen in de lengte van de C-7 en de C-11 zijtakken van het molecuul, een meer gespecialiseerde functie

hebben, hetzij tegelijkertijd, hetzij door hun voorkomen in verschillende verhoudingen gedurende verschillende stadia van de ontwikkeling. Wel weten we dat in alle biologische toetstechnieken JH-III circa 200 maal minder actief is dan JH-I en JH-II, die weinig in activiteit verschillen. Afgezien van uitzonderingen op deze regel, die worden aangetroffen bij insecten met onvolledige gedaanteverwisseling, rijst er dan twijfel aan de fysiologische betekenis van JH-III als dit in stoichiometrisch equivalente hoeveelheden in de hemolymf worden gemeten. Deze stoichiometrisch kwantitatieve onvolwaardigheid van JH-III in holometabola wordt ook waargenomen in substitutie toetstechnieken, waarbij de JH-producerende klieren, de corpora allata, worden verwijderd, waarna toetsstoffen éénmalig of continu worden toegediend. Onvoldoende onderzoek met combinaties van JH maakt conclusies omtrent een eventueel sparend of synergistisch effect niet mogelijk.

In vele series van chemische analoga van JH spelen de ethylzijgroepen aan C-7 en C-11 geen belangrijke rol voor wat betreft de biologische activiteit, hetgeen een voordeel is in de synthese (bijvoorbeeld methopreen in de 2,4 dienoaatserie; figuur 1). Anderzijds is in een andere serie gebleken dat de ethylzijgroepen een zeer grote mate van stabiliteit verlenen (vooral in residuen op planten), terwijl de activiteit t.a.v. insecten nauwelijks wordt beïnvloed. Dit heeft geleid tot grote verwachtingen voor insectengroei-regulator-epofenonaan (figuur 1). Voor een meer gedetailleerde beschrijving van de typen van JH-analoga, de activiteit en selectiviteit ervan wordt verwezen naar het hoofdstuk van De Wilde en de bestaande uitgebreide literatuur (Menn & Pallos, 1975; Sehnaal, 1976; Slama et al., 1974).

Alle praktische toepassingen van IGR met JH-werking waren tot dusverre gericht op het verstoren van de metamorfose, omdat alleen op dit mechanisme een duidelijk irreversibel effect kan worden verkregen met lage doses. Aan toepassingen gebaseerd op andere goed gedocumenteerde, maar soms nog niet begrepen effecten van JH, blijken vooralsnog praktische tekortkomingen te kleven, bijvoorbeeld door een te grote selectiviteit, een te lange wachttijd tussen toediening en effect, en te hoge dosering, ontoegankelijkheid van het gevoelige stadium, reversibiliteit van het effect. Als voorbeeld kan hier worden genoemd de veelal spectaculaire ovicide werking van JH, zoals deze in het laboratorium kan worden gemeten. Ofschoon de letale dosis per ei van sommige analoga lager is dan voor de beste conventionele middelen, geldt dit

alleen voor directe toediening en gedurende de eerste dag van een meer dagen durende embryonale ontwikkeling. Dit zou allemaal nog niet zo hinderen als een op het ovipositiegewas aanwezig residu de ontwikkeling van de eieren die hierop later worden afgezet zou kunnen verstoren. Helaas is gebleken dat in dit opzicht zelfs een vers residu meestal faalt, waarschijnlijk omdat niet voldoende contact met de eieren plaatsvindt.

Echter ook aan de werking op de metamorfose kleven bezwaren die alles bij elkaar vrij onoverkomelijk lijken. In een aantal gevallen falen de conventionele middelen waardoor de relatieve positie van de IGR sterker wordt. Deze bezwaren kunnen als volgt worden samengevat:

- Door de langzame werking kan de schade veroorzaakt door de reeds aanwezige onvolwassen stadia niet gestopt worden. Een gevolg hiervan is dat het eventuele succes van een behandeling pas kan worden beoordeeld als het te laat is voor andere corrigerende behandelingen.

- De gevoelige periode voor succesvolle JH-behandeling is zeer beperkt, waardoor behandelingen zeer nauwkeurig getimed moeten worden. Om de efficiëntie van conventionele middelen in dit opzicht ook maar enigszins te benaderen, zou de persistentie van bladresiduen in feite veel groter moeten zijn.

- Directe effecten op volwassen insecten, die meestal wél gevoelig zijn voor conventionele middelen zijn afwezig.

- Ofschoon selectiviteit ten aanzien van bepaalde insectegroepen een voordeel kan zijn bij de geïntegreerde bestrijding doordat parasieten en predatoren vaak minder gevoelig zijn dan het doelinsekt, kan de commerciële ontwikkeling worden geremd of gestopt als andere belangrijke plaaginsecten minder gevoelig blijken te zijn. Sommige insectegroepen, zoals snuitkevers, sprinkhanen en kakkerlakken, zijn duidelijk minder gevoelig voor conventionele middelen, maar ook en in relatief nog sterkere mate, ongevoelig voor IGR in ruime zin.

- De prijs van de meeste JH-analoga is relatief hoog. Dit kan alleen worden gecompenseerd door een betere werking, waarbij de kosten voor de gebruiker vergelijkbaar blijven.

Ondanks deze weinig hoopgevende opsomming zijn er toch een aantal praktische toepassingen ontwikkeld waarin de voordelen de doorslag geven. Zoals uit de voorbeelden zal blijken, hebben deze toepassingen betrekking op plaaginsecten die ofwel geen schade veroorzaken in hun onvolwassen stadia (muggen en vliegen), ofwel voornamelijk voorkomen

in min of meer besloten en beschermde ruimten, zoals kassen en voorraadsilo's.

De toepassingen van de produkten vinden meestal eerst in de Verenigde Staten plaats. Zo is de marktpositie in andere landen veelal veel kleiner, terwijl als aan de registratievoorwaarden in de Verenigde Staten is voldaan, secundaire registraties elders vaak met weinig extra moeite te verkrijgen zijn.

De bestrijding van muggelarven met methopreen

Methopreen is momenteel met meest actieve bestrijdingsmiddel voor muggelarven. Concentraties van minder dan 10^{-3} mg l⁻¹ in water verhinderen het uitkomen van de volwassen muggen, mits de larven in het laatste stadium hieraan worden blootgesteld. Het popstadium als zodanig is niet gevoelig. Vele muggesoorten zoals de gele koortsmug (*Aedes aegypti*) en de Califormische irrigatiemug (*Aedes nigromaculus*) leggen diapauze eieren op de grenslijn van water en land, die in rust blijven tijdens perioden van droogte. Als het water tot het niveau van deze eieren stijgt komen zij gesynchroniseerd uit, hetgeen een IGR-toediening tijdens de gevoelige periode vergemakkelijkt. Toch is in de praktijk nog een langere persistentie vereist dan die verkregen kan worden door de stof op zichzelf. Dit is op bevredigende wijze verkregen door micro-inkapseling, waarbij elk deeltje door een semipermeabel plastic membraan wordt omsloten (ALTOSID SR10).

Het is nog niet geheel duidelijk of de verhoogde efficiëntie van dit produkt uitsluitend te danken is aan de vertraagde afscheiding van de actieve stof in het water, of wellicht voornamelijk of ten dele aan het feit dat muggelarven de microcapsules (diameter 1-10 μ m) met hun voedsel opnemen.

Een andere techniek bleek nodig te zijn voor de bestrijding van muggelarven in stilstaand water en sloten waarvoor een nog langduriger persistentie is gewenst. Toepassing in de vorm van briketten die gedurende enkele weken hun actieve stof langzaam afgeven, maakt het mogelijk ook andere muggesoorten, zoals de gewone steekmug (*Culex irritans*), met succes te bestrijden. De IGR-bestrijding is vooralsnog niet aantrekkelijk voor toepassing op grote schaal in tropische gebieden waar muggen de vector zijn voor ziekten als malaria. Onder deze omstandigheden zijn larviciden niet economisch toe te passen en wordt voorna-

melijk gebruik gemaakt van residuvormende spuitmiddelen die worden aangebracht op de wanden van behuizingen waarin de muggen verblijven. Methopreen is hiervoor niet bruikbaar. Het succes van methopreen als larvicide is niet alleen gebaseerd op de werkzaamheid, maar vooral ook op de selectiviteit ten opzichte van bepaalde insecten. Ongewenste nevenwerkingen op andere insecten en hogere dieren, waaronder vissen, zijn vrijwel afwezig.

Biologisch gezien is de werking van methopreen en andere IGR geen ideaal voorbeeld van IGR-werking. Het werkingsmechanisme van het niet-uitkomen van de imago's bij een lage dosis is niet bekend en morfologische abnormaliteiten die dit zouden kunnen verklaren worden niet waargenomen. Deze werking is echter zo sterk gecorreleerd met JH-werking op andere insecten, dat er geen twijfel aan bestaat dat hij met de JH-werking verband houdt. In vliegen worden wel intermediairen waargenomen tussen poppen en imago's die duidelijk te correleren zijn met JH-werking, maar ook hier kan het uitkomen van de imago's worden verhinderd door doses die enkele orden van grootte lager zijn dan de doses die morfologische abnormaliteiten veroorzaken.

De bestrijding van vliegelarven met methopreen

Toepassingen in de vliegenbestrijding hebben zich geconcentreerd op vliegesoorten die schadelijk zijn in de veeteelt. De larven van deze vliegesoorten leven in mest en in mindere mate ook in plantenafval. De gevoelige periode ligt hier in de fase waarin de voedselopname ophoudt en de larve een plaats om te verpoppen opzoekt. Meestal is dit aan de periferie van het substraat, maar als dit niet vochtig is kan verpopping ook hierbinnen plaatsvinden. Helaas is het niet mogelijk gebleken IGR op zodanige wijze in het substraat te brengen dat alle larven worden bereikt.

De doorbraak kwam toen bleek dat methopreen met succes kon worden toegediend aan het vee met de voeding, mineralen, water, enz. en bleek dat een dergelijke toediening in voldoende activiteit in de mest resulteerde (Beadles et al., 1975; Chamberlain, 1975). Minerale likblokken met een supplement van 0.02% methopreen in een vorm die langzame afgifte en bescherming tijdens de spijsvertering waarborgt worden nu op grote schaal toegepast, voornamelijk tegen de 'hornfly' (*Haematobia irritans*) in de Verenigde Staten waar in 1976 meer dan 1 miljoen

stuks vee met methopreen werden behandeld. Van de zo toegediende methopreen passeert ongeveer 2 tot 4% het maagdarmsstelsel intact en alleen een verbetering van deze verhouding kan de bestrijding van andere vliegsoorten succesvol maken. Zoals blijkt uit tabel 1, zijn andere belangrijke soorten die ook in de mest voorkomen, zoals de 'facefly' (*Musca autumnalis*) en de stalvlieg (*Stomoxys calcitrans*), aanzienlijk minder gevoelig en de benodigde hogere dosis is economisch niet aantrekkelijk. Bovendien is de 'facefly' sterk migratoir, waardoor het resultaat van lokale bestrijding vaak wordt tenietgedaan door immigratie van naburige veehouderijen.

Ook de pluimveeteelt heeft vliegenproblemen, maar deze worden hoofdzakelijk veroorzaakt door de huisvlieg (*Musca domestica*), die de mest als substraat gebruikt (Morgan et al., 1975). Ofschoon ook hier dezelfde orale toediening aanvankelijk mogelijk leek, bleek al snel dat huisvlieglarven veelal hun substraat verlaten en elders verpoppen, waarbij de kans op contact met de IGR in de gevoelige periode wordt geminimaliseerd. Deze toepassing was daarom niet economisch te verwezenlijken voor JH-analoga.

Diptera waarvan de larven in mest leven zijn in dit stadium niet schadelijk en daarom een goed doelwit voor IGR. Vliegelarven die parasitair leven in wonden of in het maagdarkanaal kunnen niet met succes worden bestreden. Een systemische werking hebben de meeste IGR niet, zoals al vermeld kan slechts zeer weinig van het opgenomen methopreen in de weefsels van behandelde koeien worden teruggevonden.

Tabel 1. Vliegenbestrijding in mest bij vee door toepassing van methopreen via het voedsel. Gegevens van Moormans Mgf. Co., Quincy, Illinois, USA.

Soorten ¹	LC ₅₀	LC ₉₀	Berekende effectieve minimale concentratie in het voedsel in mg/1000 lbs per dag ²
hoornvlieg <i>Haematobia irritans</i>	0,0046	0,0193	7,5
stalvlieg <i>Stomoxys calcitrans</i>	0,1170	0,2110	82,0
face fly <i>Musca autumnalis</i>	0,1010	0,2250	87,0
huisvlieg <i>Musca domestica</i>	2,2800	7,600	3000,0

1. Alle vliegsoorten worden gematigd OP-resistent, behalve de face fly.
2. Feitelijke concentratie toegediend via minerale likblokken.

Diptera die schade aanbrengen aan gewassen zijn evenmin een goed doelwit voor IGR om bovengenoemde redenen, bovendien leiden zij meestal een tamelijk verborgen leven en zijn zeer moeilijk te bereiken voor uitwendig toegediende stoffen.

Bestrijding van voorraadinsekten

Voorraadinsekten, die voornamelijk behoren tot de kevers (Coleoptera) en de motten (Lepidoptera), brengen enorme verliezen toe aan landbouwprodukten tijdens opslag en transport. Vele soorten zijn zo gespecialiseerd, dat zij zich continu kunnen vermenigvuldigen in gesloten ruimten. De relatief hoge werkzaamheid van vele IGR op de meeste soorten voorraadinsekten is uitvoerig vastgesteld en deze toepassing heeft dan ook lange tijd zeer veelbelovend geleken (Loschiavo, 1976; McGregor & Kramer, 1975; Strong & Diekman, 1973). De relatieve ongevoeligheid van twee zeer belangrijke snuitkeversoorten, de graanklander (*Sitophilus granarius*) en de rijstklander (*Sitophilus oryzaephilus*) bleek het struikelblok te zijn. Effectieve onderdrukking van deze soorten is mogelijk met doseringen met een concentratie van 50 mg l⁻¹ methopreen, maar dit is economisch niet aantrekkelijk; een tienmaal lagere concentratie is voldoende voor de meeste andere soorten. Uit onderzoek is gebleken, dat de mindere gevoeligheid van deze kevers niet in de eerste plaats is te wijten aan het feit dat de larven een zeer verborgen bestaan leiden in het binnenste van de graankorrels, maar veeleer aan een intrinsieke ongevoeligheid van snuitkevers in het algemeen (Rowlands, 1976).

Voor sommige opgeslagen produkten zijn andere insectesoorten de enige schadeveroorzakers en kan bestrijding met IGR een rol spelen. Tabak bijvoorbeeld wordt voornamelijk aangetast door de tabakskever (*Lasioderma serricorne*) terwijl tabak geen behandeling met persistente insecticiden verdraagt. In 1976 werd 1,6 miljoen kg tabak met methopreen behandeld op experimentale basis. De efficiëntie van alle IGR in deze en andere toepassingen bij voorraadbescherming hangt sterk af van het aantal voorafgaande en voortdurende hygiënische maatregelen nodig om de immigratie van volwassen dieren zodanig af te remmen, dat de IGR alleen nodig zijn om populatie-explosie te voorkomen.

De bestrijding van kasinsekten

Bladluizen, schildluizen, wolluizen en witte vlieg (die alle behoren tot de suborde Homoptera) zijn de voornaamste plagen in de kassenteelt. IGR, zoals methopreen, zijn redelijk actief t.a.v. deze soorten door een combinatie van effecten op de metamorfose en de reproductie (Staal, 1975; Staal et al., 1973). Zo blijken IGR een embryocide werking te hebben op zich parthenogenetisch voortplantende bladluizenmorfen, die uiteindelijk tot de dood van het moederdier leidt (Nassar et al., 1973). Ook de inductie van bladluizenmorfen (ongevleugelde of gevleugelde, zich parthenogenetisch en sexueel voortplantende) kan door IGR worden verstoord, maar de hierdoor verkregen bestrijdingseffecten zijn te indirect om van praktische betekenis te zijn.

Voor deze Homoptera is de IGR kinopreen (figuur 1) beter geëigend dan methopreen omdat in deze verbinding een zeer hoge en vrij selectieve JH-werking is gecombineerd met een evenzeer selectieve, direct toxische werking. Het werkingsmechanisme van deze toxiciteit, die in de propynylester zetelt, is niet goed bekend. De toxische werking is meestal hoger bij de imago's dan bij de onvolwassen stadia, hetgeen zeer uitzonderlijk is. Ook de latere embryonale stadia in eieren van bijvoorbeeld witte vlieg zijn gevoelig voor dit middel, terwijl methopreen alleen effect heeft op jonge embryo's.

In de praktijk kunnen de meeste kasinsekten op economische wijze worden bestreden met conventionele middelen; er is nog weinig behoefte aan duurdere en minder direct werkende middelen. De uitzondering hierop is witte vlieg, een alom verbreide plaag van siergewassen en groentegewassen, zowel in als buiten de kas. Deze plaag, althans de soort *Trialeurodes vaporariorum*, heeft een zekere resistentie tegen conventionele middelen verworven en is ook gekenmerkt door een eistadium dat ongevoelig is voor deze middelen. Kinopreen kan door zijn gecombineerde werking effectief zijn in elk ontwikkelingsstadium, met inbegrip van het eistadium en de imago's en heeft zijn bruikbaarheid in de praktijk bewezen. Dit middel wordt in de Verenigde Staten onder de naam ENSTAR in de handel gebracht voor de sierteelt in kassen. Helaas is het niet uitvoerbaar gebleken om toelating voor dit middel te verkrijgen voor de groenteteelt onder glas, omdat het hiervoor benodigde toxicologische onderzoek te kostbaar is in vergelijking met het beperkte afzetgebied. (Kinopreen is, zoals vele andere IGR, niet stabiel genoeg

om buiten de kassen met succes gebruikt te kunnen worden.) Economisch beter haalbaar is het gebruik van een methopreen in combinatie met een betrekkelijk nonpersistent adulticide, zoals een pyrethroïde. De nog resterende resistente elementen bij de ontwikkelingscyclus, zoals de oudere embryonale stadia, kunnen dan door residuwerking en herhaalde toepassing worden bestreden.

Een andere benadering van het probleem bij witte vlieg is het gebruik van een sluipwesp, *Encarsia formosa*. Deze parasiet kan als bestrijdings-agens met enig succes worden toegepast. Toch is de parasiet alleen niet geheel afdoende. Praktijkexperimenten hebben uitgewezen, dat IGR, zoals methopreen, voldoende selectief zijn om in combinatie met deze biologische bestrijdingsmethode te worden ingezet, waarbij de resultaten van de combinatie die van de afzonderlijke methode overtreffen en voor de praktijk aanvaardbaar zijn (Degheele et al., in voorbereiding). Het gebruik van minder selectieve middelen, zoals de reeds genoemde pyrethroïden, moet hierbij uiteraard wel worden vermeden.

Ten aanzien van de selectiviteit moet nog worden opgemerkt, dat deze zelden geheel absoluut is; vrijwel altijd kan een overmatige dosis ook schade doen aan andere dan het doelinsekt. Het is daarom van belang dat deze relatieve selectiviteit wordt bestudeerd onder de meest natuurlijke omstandigheden met speciale aandacht voor de dynamiek van de insektenpopulaties. Een rationele verklaring voor waargenomen selectiviteit binnen de orde Insecta is in de meeste gevallen niet te geven; daarvoor weten we nog te weinig van de eigenlijke werking van JH-analoga, de eventuele receptoren en de verschillen in katabolisme van vreemde en lichaamseigen stoffen. Wel weten we met enige zekerheid dat de hoge werkzaamheid van methopreen op Diptera berust op het onvermogen van de esterases om isopropylesters te inactiveren (zonder de estergroep zijn alle JH-analoga volkomen inactief), terwijl isopropylesters klaarblijkelijk eveneens grote intrinsieke activiteit bezitten ten aanzien van de receptoren binnen deze insektenorde.

De bestrijding van insekten in de landbouw, tuinbouw en bosbouw

Niets zou een verdere opmars in het gebruik van IGR meer ten goede komen dan succes in de bestrijding van plagen bij één of meer economisch belangrijke gewassen. Zo wordt in de Verenigde Staten meer dan

30% van de totale produktie van bestrijdingsmiddelen in de katoenteelt gebruikt en het is dan ook niet verwonderlijk dat de ontwikkeling van nieuwe middelen zich op enkele van dergelijke gewassen concentreert, omdat alleen deze de hoge ontwikkelingskosten kunnen rechtvaardigen. Geïntegreerde bestrijding heeft in deze gewassen nog geen belangrijke rol gespeeld en het gebruik van niet-selectieve middelen domineert. IGR zijn uitvoerig onderzocht voor mogelijke toepassingen maar hebben tot dusverre hun superioriteit ten opzichte van conventionele middelen niet kunnen bewijzen. De ironie wil, dat de eigenschap van vrij geringe stabiliteit, die aanvankelijk als een voordeel werd gezien in een tijdperk waarin DDT zijn populariteit verloor, hiertoe het meest heeft bijgedragen. Ofschoon het vertraagde en indirecte effect wellicht nog aanvaardbaar had kunnen worden door succes op enigszins langere termijn, bleek het andere aspect van de korte gevoeligheidsperiode, namelijk de onmogelijkheid om alle aanwezige insecten met één behandeling te beïnvloeden, doorslaggevend. Zelfs een zeer goede persistentie kan deze tekortkoming niet geheel compenseren omdat bij gebrek aan systemische translokatie binnen de plant de nieuwe groei onbeschermd blijft. Aangezien vele plaaginsecten zich hierop concentreren, kunnen alleen contactinsecticiden en systemische middelen vooralsnog voldoende bescherming geven (Bagley & Bauernfeind, 1972).

In de bosbouw wordt meer belang gehecht aan selectiviteit en de persistentie van bladresiduen is hier door minder directe zonbestraling beter. Zodoende ligt de situatie hier iets gunstiger. Helaas is vrijwel nergens ter wereld de economische situatie in de bosbouw zodanig, dat de ontwikkeling van nieuwe middelen speciaal hiervoor verantwoord is. Bovendien hebben bosbouwplagen meestal een zodanig cyclisch karakter, dat bestrijding met chemische middelen slechts nu en dan wenselijk is. Wel kan in de bosbouw de nadruk worden gelegd op meer preventatieve bestrijding met behulp van een goed monitorsysteem en IGR bieden hier goede perspectieven.

De IGR epofenonaan (figuur 1) kan wellicht enkele toepassingen opleveren die voorheen niet geschikt leken voor IGR (Hangartner et al., 1976). Epofenonaan dat een tot dusverre ongekende persistentie blijkt te hebben in bladresiduen, kan met succes worden toegepast voor de bestrijding van schildluizen in de fruitteelt. Behalve de persistentie is hierbij ook van belang, dat schildluizen behorende tot de Diaspididae in elk onvolwassen ontwikkelingsstadium een gevoeligheid voor IGR blijken te

bezitten. IGR verstoren de normale ontwikkeling en leiden tot abnormale en doorgaans letale schildsecretie. De eventueel endocriene basis hiervan is niet bekend. Ook is het van belang, dat schildluizen weinig mobiel zijn (alleen imago's kunnen vliegen bij sommige soorten) en dat conventionele middelen niet volledig effectief zijn. Voor andere landbouwtoepassingen, bijvoorbeeld op Lepidoptera en Coleoptera, zal ook deze IGR waarschijnlijk niet voldoen om reeds genoemde redenen.

IGR in de zijderupsenteelt

Buiten het kader van hormonale bestrijding, maar binnen de definitie IGR, valt de toepassing van JH- en MH-analoga in de zijderupsenteelt in Japan. Methopreen (onder de naam MANTA) wordt gebruikt voor verhoging van de zijdeproductie per larve. Een bespuiting van de rupsen op het juiste moment gedurende het laatste larvestadium veroorzaakt een toename in groei, gepaard gaande met iets grotere voedselopname en een meer volledige lediging van de spinklieren van de coconspinnende rups. Een spuitconcentratie van $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ kan zo resulteren in een toename in zijdeproductie van 10%, hetgeen economisch zeer belangrijk is. De zijderupsencultuur is ook gebaat bij een betere synchronisatie van de rupsen in het coconspinnen. Hierbij kan een nauwkeurig 'getimed' en gedoseerde toediening van MH-analoga (fyto-ecdysonen) een praktisch hulpmiddel zijn. De ontwikkeling van deze toepassing is momenteel in Japan in studie.

Andere toepassingen van JH-analoga

De in het laboratorium gevonden effecten van JH-analoga op sociale insecten (mieren, termieten, bijen, wespen), hebben veel aanleiding gegeven tot speculaties over mogelijke toepassingen. Buiten de directe effecten op de metamorfose en de reproductie, blijkt dat ook de ontwikkeling van de kasten verstoord kan worden. Zo worden in termietenkolonies onder matige JH-druk voornamelijk soldaten geproduceerd, hetgeen op de duur de sociale structuur van het nest kan vernietigen. Vergeleken met de directe bescherming van hout gebruikt in de constructiebouw met zeer persistente contactinsecticiden is dit echter nauwelijks van praktisch belang. Het is tot dusverre ook niet mogelijk gebleken termieten te bestrijden met lokaas.

Voor mieren ligt dit allemaal iets gunstiger. Lokaasbestrijding is hier een aanvaardbare techniek. Essentieel is echter, dat als actief bestanddeel van het lokaas een stof wordt gekozen die niet afstotend werkt en die ook niet een direct dodende werking heeft op de werkers die met het lokaas in aanraking komen. De bruikbare lokaasmiddelen bevatten traagwerkende middelen, zoals arsenaten of bepaalde langzaamwerkende gechlloreerde koolwaterstoffen. De werkers brengen de lokaasdeeltjes terug in het nest, waar zij hun actieve bestanddelen afgeven aan alle andere leden van de sociale hiërarchie die dan ten gevolge van de trage werking uiteindelijk alle bezwijken. Beide genoemde conventionele middelen zijn echter weinig selectief, zijn daarom gevaarlijk voor de mens en het milieu en zullen waarschijnlijk binnen korte tijd niet meer beschikbaar zijn.

Proeven met methopreen als actief bestanddeel van lokaas hebben een volledig succes opgeleverd bij de bestrijding van de faraomier. Dit insect veroorzaakt een plaag die in opmars is in de gematigde gebieden in gebouwen zoals ziekenhuizen, maar ook in woningen. Deze methoediek is inmiddels voor algemeen gebruik ter beschikking gekomen (Edwards, 1975). Soortgelijke successen zijn ook geboekt bij de bestrijding van de 'fireant' (Cupp & O'Neal, 1973; Troisi & Riddiford, 1974) en de Argentijnse mier in de Verenigde Staten, hoewel meer methopreen nodig blijft.

Hormoonantagonisten

Ofschoon er tot dusverre geen lichaamseigen stoffen zijn geïdentificeerd die de produktie of de werking van endogene hormonen kunnen tegenwerken, zijn er toch een aantal stoffen gevonden die de mogelijkheid van een dergelijke antagonisme aantonen. Vooral ten aanzien van antagonisten van JH geldt, dat deze, althans in theorie, een werking kunnen hebben die hoge verwachtingen voor wat betreft de insektenbestrijding wekt. Een optimaal werkende JH-antagonist zou hetzelfde kunnen doen als allatectomie, de chirurgische ingreep waarbij de corpora allata worden verwijderd. Het gevolg is dat bij de volgende vervelling metamorfose optreedt, hetgeen vrijwel altijd letaal is; de schade door het insect veroorzaakt houdt dan op korte termijn op.

Bovendien kan ook een remmende werking op de voortplanting worden verwacht, omdat bij de meeste insektesoorten JH nodig is voor de

eierrijping. Deze remming is echter niet noodzakelijkerwijze irreversibel; het ontbreken van JH in het volwassen wijfje is in vele soorten de factor die een tijdelijke diapauze induceert.

JH-antagonisme zou theoretisch op een zeer groot aantal wijzen tot stand kunnen komen. Stoffen met deze werking zouden we in grote lijnen als volgt kunnen indelen:

- Stoffen die de activering van de corpora allata verhinderen of doen uitblijven. Deze activering vindt ofwel langs nerveuze, ofwel neurohormonale weg plaats.
- Stoffen die de biosynthese van JH in de corpora allata afremmen of die de secretie van JH uit de corpora allata verhinderen. Intensieve studie van deze biosynthese heeft de kennis hiervan vergroot, maar antagonisten zijn hieruit tot op heden niet voortgekomen.
- Stoffen die de binding van JH aan de in het bloed circulerende proteïnen in de war sturen. Hierdoor worden de JH direct blootgesteld aan de in de hemolymfe circulerende afbraakenzymen en kunnen de JH wellicht niet effectief aan de receptoren worden gekoppeld.
- Stoffen die met JH zouden kunnen concurreren bij het activeren van de receptoren.
- Stoffen die de afbraakenzymen activeren of hun synthese stimuleren.

Binnen elk van deze categorieën zou zeker nog een verdere differentiatie gemaakt kunnen worden, maar dit is op dit moment nog zinloos omdat van de antagonisten die nu bekend zijn zelfs niet vaststaat tot welke hoofdgroep zij behoren.

Het onderzoek naar antagonisten wordt op verschillende niveaus uitgevoerd. Betere kennis van de regulerende processen en identificatie van hormonen, neurohormonen en biosynthetische wegen zou tot praktische resultaten kunnen leiden, maar tot op dit moment is dit speculatie. Meer pragmatisch onderzoek heeft zich tot dusverre geconcentreerd op het toetsen van plante-extracten en van de vele JH-analoga die zijn gesynthetiseerd; uit deze beide bronnen zijn stoffen met antagonistische werking voortgekomen die overigens geen praktische betekenis als bestrijdingsmiddel zullen kunnen krijgen. Wel hebben deze vonden duidelijk aangetoond, dat chemische JH-antagonisten geen hersenschim zijn en dat verder zoeken in deze richting gerechtvaardigd is. De volgende antagonisten zijn bekend:

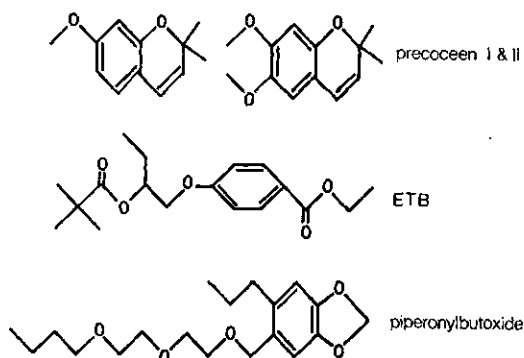


Fig. 3. Structuurformules van precocceen I en II en van verbindingen met een anti-JH-werking.

De precocenen Deze verbindingen, die chemisch behoren tot de ageratochromenen (figuur 3), werden in 1975 door Bowers geïsoleerd als het werkzame bestanddeel uit de extracten van *Ageratum houstonianum*, een veel voorkomend siergewas (Bowers, 1976). De meest werkzame variant, precocceen II, veroorzaakt vroegtijdige metamorfose in het toetsdier, de wants *Oncopeltus fasciatus* (milkweed bug) en *Dysdercus* spp. (katoenwantsen). Beide zijn zaadetende wantsen van geen of zeer weinig economisch belang. In *Oncopeltus* kan inderdaad ook de eierrijping in volwassen wijfjes worden verhinderd. Alle antagonistische effecten kunnen worden opgeheven door tijdige toediening van een actief JH-preparaat, hetgeen het bewijs van een echt JH-antagonisme afrondt. Precocceen II heeft tot dusverre nog geen spectaculaire effecten opgeleverd bij insecten met volledige gedaanteverwisseling. Toch is de werking niet beperkt tot de wantsen, want voortijdige metamorfose kon ook worden geïnduceerd in *Locusta migratoria*. Overigens is precocceen II een voor insecten over het algemeen vrij toxische stof die vaak al letaal is in 100 µg dosis zelfs bij soorten die niet met karakteristieke antagonisme-symptomen reageren.

De werkingswijze van precocceen II is nog een mysterie. Zeker is dat de werking plaatsvindt ofwel direct op de corpora allata, ofwel op de regulatie hiervan. Een nog niet geheel begrepen aspect is, dat vroegtijdige metamorfose met deze stof altijd pas na twee vervellingen optreedt, waardoor het pas op zijn vroegst in het derde larvestadium kan

worden waargenomen. (Na allatectomie is meestal slechts één vervelling nodig.)

JH-analoga met anti-JH-werking Twee groepen stoffen zijn tot dusverre gevonden die een duidelijk antagonistische werking hebben op enkele Lepidoptera, maar die tegelijkertijd een duidelijk aantoonbare JH-werking op deze doelinsekten kunnen hebben, vooral bij overdosering. Deze combinatie agonist-antagonist is overigens een niet onbekend verschijnsel in de endocrinologie en versterkt de mening dat het hier gaat om concurrenten van JH ten aanzien van de receptoren.

Toetsmethodieken voor JH-antagonisme maken met succes gebruik van insectesoorten die behalve met vroegtijdige metamorfose bij volledige tegenwerking van JH ook met bepaalde symptomen kunnen reageren op een matig JH-gebrek. Zulk een soort is *Manduca sexta*, de tabakspijlstaart, die onder normale omstandigheden lichtgroene larven heeft, maar JH-gebrek doet de larven tot diepzwart verkleuren. Deze diepzwarte kleur treedt niet op bij volledige uitschakeling van JH, maar alleen bij matig verlaagde JH-spiegel (bijvoorbeeld door allatectomie en vervolgens gedeeltelijke restitutie van de JH-spiegel). Ook is er een spontane zwarte mutant die met JH weer de normale groene kleur aanneemt en die om die reden wel voor JH-toetsingen is gebruikt.

De verbinding ETB (figuur 3) is een typisch voorbeeld van deze klasse van JH-antagonisten. Deze stof is aanvankelijk als JH-agonist herkend en inderdaad heeft zij op vele insectesoorten uitsluitend een sterk agonistische werking. In *Manduca* evenwel vindt bij een zeer bepaalde dosis een karakteristiek antagonistische werking plaats. Betrekkelijk onafhankelijk van de wijze van toediening (injectie, éénmalige dosis uitwendig of continu toegediend met het voedsel) worden de larven aanvankelijk zwart en ondergaan tenslotte een voortijdige metamorfose in de vervelling tot het vijfde stadium, normaliter het laatste larvestadium. Alle pogingen om de voortijdige metamorfose nog vroeger te doen plaatsvinden zijn tot dusverre zonder resultaat gebleven. Ook is het niet mogelijk gebleken om de zwarte kleur eerder dan in het derde larvestadium te induceren, hetgeen ook geldt voor de spontane zwarte mutant die in de eerste twee larvestadia groen is. De vroegtijdige metamorfose blijft in de normale stam beperkt tot de uitwendige cuticula van de centrale segmenten en de kop, poten, inwendige organen, etc. blijven geheel larvaal. Bij dezelfde behandeling van de zwarte mutant, die waar-

schijnlijk al een verlaagde JH-spiegel bezit is de voortijdige metamorfose weer compleet. De reagerende larven van het vierde stadium graven zich in en vervellen tot vrijwel complete kleine poppen. Soms ontstaan in de normale stam ook larven van het vijfde stadium, die alleen bij zeer nauwkeurig onderzoek popcuticula blijken te hebben gevormd in de nog inwendige vleugelprimordia. Het gevolg van deze zeer selectieve reactie is, dat de poppen die volgens het normale schema worden gevormd defecten in de vleugels vertonen die duidelijk verband houden met het onvermogen om de gedeeltelijke gesclerotiseerde vleugelschijven uit te stulpen tijdens het verpoppingsproces.

Alle antagonistische verschijnselen veroorzaakt door ETB verdwijnen indien er een overdosis van de stof wordt gegeven (meestal is een driedovoudige dosis al voldoende) of indien gelijktijdig een andere JH-agonist wordt toegediend. ETB is een zeer selectieve antagonist voor *Manduca sexta*; op alle andere tot dusverre getoetste insecten is ETB slechts een agonist. Deze selectiviteit, de betrekking hoge dosis (3 tot 100 μg , afhankelijk van de wijze van toediening) en bovenal het feit dat overdosis het effect teniet doet, doen uiteraard alle hoop op een praktisch bruikbaar bestrijdingsmiddel teniet. De werkwijze van ETB is niet bekend en tot dusverre is zelfs de theorie, dat zij door receptorconcurrentie werkt, speculatief. Allereerst zullen JH-bloedspiegelmetingen moeten worden verricht (afzonderlijk voor de beide tot nu toe geïdentificeerde juveniel hormonen, JH-II en JH-III).

Een andere groep van JH-antagonisten die nog niet is benoemd, werkt geheel volgens hetzelfde patroon op *Manduca sexta* en bovendien op het economisch meer belangrijke insect *Heliothis virescens*, de tabacco budworm, een zeer schadelijke plaag vooral in de katoenteelt in de Verenigde Staten. *Heliothis* reageert op dezelfde wijze met voortijdige metamorfose in het vijfde en laatste larvestadium en ook hier bestaat dezelfde relatie tot de grootte van de dosis. Het enige verschil met ETB is dus de iets geringere selectiviteit; de werking van ETB blijkt zich overigens niet tot vele andere insectesoorten uit te strekken.

Piperonylbutoxide (PB) Deze derde verbinding met duidelijke anti-JH-werking in *Manduca* (figuur 3) wordt in de praktijk als synergist voor bepaalde insecticiden (pyrethroiden) gebruikt, omdat zij de microsomale oxydasen kan afremmen die de afbraak van xenobiotica bewerkstelligen. Dezelfde oxydasen breken ook mede de endogene juveniel

hormonen af. De sparende werking van PB hierop kan dan ook in doelgerichte experimenten worden aangetoond. PB kan echter ook zwart pigment in *Manduca*-larven indiceren en ook soms een matige graad van voortijdige metamorfose. Waarschijnlijk heeft PB geen intrinsieke JH-agonistische werking. Overdosering in *Manduca* leidt niet tot minder antagonisme, omdat de antagonistische dosis altijd zeer dicht onder de letale dosis ligt. Wel doet gelijktijdige toediening van een JH-preparaat het antagonisme teniet, hetgeen wederom het bewijs van antagonisme afrondt. Zelfs ETB kan zo als agonist dienen. De tegenstrijdige werkingswijzen van PB zijn ook nog niet afdoende verklaard. Wel is bekend dat PB onder bepaalde omstandigheden niet alleen de microsomale oxydasen kan afremmen, maar hiervan ook grotere hoeveelheden kan induceren die dan klaarblijkelijk niet meer afdoende worden afgeremd. De tot dusverre magere successen op het gebied van praktische JH-antagonisten mogen ons niet weerhouden om met volle inzet verder te zoeken naar het begeerde einddoel: stoffen die zeer selectief werken op insektesoorten en die in geringe hoeveelheden een irreversibel letale werking hebben op jonge larvestadia van economisch belangrijke plaaginsekten.

Conclusie

Insektgroeiregulatoren (IGR) met hormoonwerking zijn tot dusverre geen panacee gebleken bij de insektenbestrijding, maar hebben zich toch in een aantal gespecialiseerde gevallen een plaats weten te veroveren. Het gebruik ervan wordt beheerst door dezelfde grondregels die gelden voor het gebruik van conventionele middelen; magische kwaliteiten mogen hen niet worden toegeschreven. Zo is aanvankelijk wel gepostuleerd, dat insekten geen resistentie tegen lichaamseigen stoffen zoals hormonen zouden kunnen verwerven, maar hierbij is over het hoofd gezien, dat de altijd aanwezige afbraakenzymsystemen in insekten waarschijnlijk een bloedspiegelregulerende functie hebben, dat deze enzymen niet in het lichaam zelf geproduceerde hormonen gemakkelijk aan kunnen tasten en dat dezelfde enzymen ook verantwoordelijk zijn voor de resistentie tegen vele typen conventionele bestrijdingsmiddelen. Ofschoon in de praktijk nog geen verworven resistentie tegen JH-analoga is waargenomen, bleken toch enige laboratoriumstammen die resistent waren tegen bepaalde insecticiden een kruisresistentie met JH-ana-

loga te vertonen. Ook is het mogelijk gebleken om populaties van muggen (*Aedes aegypti*) in resistentie te doen toenemen gedurende vele generaties door matige blootstelling aan methopreen (Brown & Brown, 1974). Van een eventuele resistentietoename onder meer natuurlijke omstandigheden is nu nog weinig bekend.

Het is zeer waarschijnlijk, dat vele praktische ideeën zullen blijven voortkomen uit het min of meer pragmatische onderzoek, dat zich evenwel steeds meer richt op meer gewenste werkingswijzen van de te toetsen stoffen door een betere keuze van toetsingsmethodieken. Anderzijds kan steeds meer worden verwacht van de rationele benaderingen, waarvan de praktische verwezenlijking echter veelal onmogelijk zal blijken, doordat de methoden veel verder van de praktijk van de insektenbestrijding staan verwijderd. Het is wellicht goed er nog eens op te wijzen, dat men met de juveniel hormonen in dit opzicht bepaald geluk heeft gehad. Voor deze groep van stoffen bleek de insekten-cuticula geen barriere te zijn. Bovendien konden de natuurlijke hormonen zodanig worden gemodificeerd, dat ze niet alleen een veel hogere activiteit, maar ook in andere opzichten meer gewenste eigenschappen verkregen. Het is zeer waarschijnlijk dat deze gang van zaken zich niet licht zal herhalen na de identificatie van andere regulerende stoffen.

Slotbeschouwing

P.J. Gaillard

In de voorgaande hoofdstukken werd kennis gemaakt met vele aspecten van de endocrinologie. Tussen de diergroepen werden daarbij aanzienlijke verschillen aangetroffen, maar ook werd aandacht gevraagd voor enkele algemene principes, zoals de betekenis van de neuro-endocriene regulatie en de processen die betrokken zijn bij de synthese, de secretie en het werkingsmechanisme van hormonen.

In het kader van deze algemene principes meen ik nog even aandacht te mogen vragen voor een drietal zaken. Dit zijn in de eerste plaats het werkingsmechanisme van steroïdhormonen op cellulair niveau en in de tweede plaats de mogelijke betekenis van kleine peptiden en van fragmenten van grotere proteïnaire hormonen. Tenslotte zal worden gewezen op enkele facetten van de endocrinologie die van 'maatschappelijk' belang zijn.

Wat betreft de 'herkenning' van steroïdhormonen door doelwit-cellen, heb ik altijd enige moeite met de opvatting dat zij, wel of niet gebonden aan eiwitten, in beginsel *alle* cellen 'ongestoord' kunnen binnenkomen om vervolgens in het cytoplasma te ontdekken of aldaar naast specifieke, wellicht ook specifieke receptorstoffen aanwezig zijn. Vooral in de laatste jaren verschenen er echter van verschillende zijden mededelingen die erop wijzen dat steroïdhormonen, evenals proteïnaire hormonen, eerst specifiek aan bepaalde celmembranen worden gebonden om vervolgens door de celmembraan heen te worden geloodst volgens processen die verzadigbaar en temperatuurafhankelijk zijn. Een dergelijke specifieke herkenning zou een groot deel van mijn moeilijkheden oplossen. Onlangs verscheen een artikel over de binding van een steroïdhormoon aan celmembranen door Pietras & Szego (1977), dat handelt over specifieke bindingsplaatsen voor oestrogeen aan de celmembraan van geïsoleerde doelwit-cellen. De auteurs maakten bij hun onderzoek

gebruik van een methode waarbij nylondraden zijn omgeven door een dun laagje albumine, waarbij per mg albumine minimaal 1 ng oestradiol is gekoppeld. Deze draden worden 30 minuten geïncubeerd in suspensies van hormoongevoelige cellen afkomstig van het endometrium en van de lever of wel afkomstig van hormoonon~~gevoelige~~ cellen van het darmepitheel van ratten. Vastgesteld werd dat ongeveer 40% van de endometriumcellen, 7% van de levercellen en slechts 0,3% van de darmepitheelcellen covalent aan de nylondraden werd gebonden. Het bindingsproces was bovendien temperatuurgevoelig. Bij verlaging van de temperatuur werden namelijk minder cellen gebonden. Overwegende, dat ongeprepareerde nylondraden, ofwel draden die alleen met albumine zijn bekleed, geen cellen binden en dat de cellen weer vrijkomen bij een competitieve binding van een overmaat 17 β -oestradiol, terwijl dit niet gebeurt met 17 α -oestradiol, werd geconcludeerd dat specifieke herkenningsplaatsen op de membranen van de hormoongevoelige cellen aanwezig moeten zijn. Over de aard van de receptoren werd echter geen uitspraak gedaan. De resultaten van dit onderzoek lijken mij belangwekkend genoeg om nader te worden bekeken. Wellicht zou het de moeite lonen om vergelijkbaar onderzoek te doen met andere steroidhormonen en met andere celsoorten van verschillende diergroepen om na te gaan of er wellicht een algemeen principe aan ten grondslag ligt! In dit verband wil ik verwijzen naar de mededeling van *Beenackers*, dat ook bij ecdyson door sommigen gedacht wordt aan een primaire inwerking op de celmembranen van daarvoor gevoelige cellen.

In de tweede plaats wil ik aan de hand van een aantal mededelingen in de vorige hoofdstukken en op grond van eigen ervaringen nog enkele punten bespreken die betrekking hebben op de betekenis van kleine peptiden. *Joosse* vermeldde dat het onderzoek naar de chemische samenstelling van neurohormonen belangrijke resultaten had geboekt en dat deze hormonen over het algemeen peptiden bleken te zijn die uit een beperkt aantal aminozuren zijn opgebouwd. Voorts deelde hij mede dat de neurohormonen die bij zoogdieren in de neurohypofyse worden afgegeven (vasopressine en oxytocine) elk uit 8 aminozuren bestaan. Ook bij evertibraten zijn de neurohormonen kleine peptiden. Een neurohormoon dat de chromatoforen van de garnaal beïnvloedt bleek eveneens uit 8 aminozuren te zijn opgebouwd.

Beenackers vermeldde dat de corpora cardiaca bij sprinkhanen een

hyperglycaemisch en adipokinetisch hormoon afscheiden dat wederom uit 8 aminozuren is opgebouwd. Dit hormoon veroorzaakt in zijn doelwit-cellen die zich in het 'vetlichaam' bevinden een verhoging van het cAMP, hetgeen inhoudt dat het hormoon zich eerst aan de celmembraan moet hebben gebonden.

Naar aanleiding hiervan dient de vraag te worden gesteld hoe deze kleine peptiden worden gemaakt. Worden ze als zodanig opgebouwd of ontstaan ze bijvoorbeeld t.g.v. preferentiële splijting uit grotere moleculen? In dit verband zijn de mededelingen van *Van Wimersma Greidanus* en *De Wied* van bijzondere betekenis. Zij gingen namelijk vrij uitvoerig in op een groter peptide, het ACTH, dat in intacte toestand uit 39 aminozuren is opgebouwd. Een deel van dit molecuul, namelijk de sequentie 1-20, bleek echter bij zoogdieren essentieel te zijn voor de werking op de bijnierschors. Het aminoterminal brokstuk 1-13 is in dit opzicht niet meer actief, maar heeft nog wel zijn invloed op de besproken vluchtreactie. Ook het ACTH 1-10 en zelfs het stuk 4-10 bleken in dit opzicht actief te zijn. Bovendien werd vastgesteld dat de 7 aminozuren van het ACTH 4-10, dat door sommige onderzoekers als een soort 'oerhormoon' wordt bestempeld, ook voorkomt in α -MSH, β -MSH en β -LPH. De vraag was echter of een dergelijk peptide, dat als neuropeptide werd gedoopt, als zodanig door de hypofyse wordt geproduceerd. In ieder geval kon wel uit hypofyse-voorkwabweefsel van het varken een klein actief peptide worden geïsoleerd. Dit bleek lysine-vasopressine te zijn waaraan het eindstandige glycinamide ontbrak. Deze stof had een sterke invloed op het aanleren van de voorwaardelijke vluchtreactie en het had nauwelijks een perifere endocriene activiteit op de bloeddruk en de waterhuishouding.

Van Wimersma Greidanus en *De Wied* deelden vervolgens mee dat ook bij intacte dieren invloeden van kleine peptiden op het gedrag zijn aangetoond. α -MSH, β -MSH, ACTH 1-10 en ACTH 4-10 remden namelijk de uitblussing van de voorwaardelijke vluchtreactie in de paalspringtest. Bovendien hoorden we dat het tetrapeptide ACTH 4-7 buiten de bijnierschors om nog een volledige invloed op het gedrag uitoefende.

In het hoofdstuk van *Van Wimersma Greidanus* en *De Wied* werd vermeld dat deze onderzoeken vanzelfsprekend een aantal vragen oproepen, bijvoorbeeld of de hypofyse werkelijk de neuropeptiden maakt en zo ja, hoe ze worden afgescheiden en wat er verder met hen in de circulatie en eventueel bij de doelwit-cellen gebeurt. Vergelijkbare

vragen rezen en rijzen ook bij andere proteïnaire hormonen en over één van deze hormonen zou ik gaarne enige ervaringen bespreken. Het gaat hierbij om het bijschildklierhormoon dat normaliter is opgebouwd uit 84 aminozuren. *Hekkelman* heeft in zijn voordracht reeds medegedeeld dat een synthetisch brokstuk van dit hormoon, het PTH 1-34, als het biologisch actieve gedeelte van het hormoonmolecuul dient te worden beschouwd. (Daarbij dient echter wel te worden vermeld dat het immunoreactieve deel van het PTH niet identiek is aan het biologisch actieve deel.) Bij zoogdieren doet een synthetisch PTH 1-34, evenals het PTH 1-84, het calciumgehalte in het serum en het cAMP-gehalte in de urine stijgen. Bovendien stimuleert het de adenylcyclaseactiviteit van een suspensie van celmembranen afkomstig van de schors van de nieren in vitro. Naar aanleiding hiervan wil ik drie aspecten nader toelichten. In de eerste plaats komt ook hier de vraag aan de orde of de bijschildklieren werkelijk brokstukken van het hormoon maken en afscheiden. In de tweede plaats wil ik aandacht vestigen op het bestaan van specifieke bindingsmogelijkheden van het PTH 1-34 aan enkele doelwit-weefsels in vitro. In de derde plaats wil ik nader ingaan op de reeds door *Hekkelman* genoemde kwalitatieve verschillen in de reactie van sommige doelwit-cellen op toediening van hoge of lage doses PTH 1-34.

Wat betreft de synthese van PTH in de cellen van de bijschildklieren is bij een aantal zoogdieren vastgesteld dat deze afhankelijk is van de calciumspiegel in het bloed. Een hoge calciumspiegel leidt tot een toevloed van calciumionen naar het cytoplasma en via een nog onvolledig bekend mechanisme leidt dit tot verhoogde secretie (figuur 1). Uit deze figuur volgt tevens dat er sprake is van twee calciumionen-afhankelijke syntheses, namelijk die van het overigens veel te grote (115 aminozuren?) Pre-Pro-PTH en die van een zogenaamd 'secretory protein', een eiwit waaraan het PTH zou worden gebonden om te kunnen worden afgescheiden. Via een reeks enzymatische splijtingen van het Pre-Pro-PTH ontstaat het Pro-PTH en vervolgens het PTH 1-84. De vraag rijst nu hoe de afgesplitste stukken of stukjes er precies uit zien en wat er met hen gebeurt. Worden ze als zodanig afgescheiden of worden ze intracellulair verder afgebroken? En indien ze afgescheiden worden is de levensduur in het circulerend bloed dan zódanig dat een werking op doelwitweefsels kan worden verwacht?

Uit figuur 1 blijkt verder dat wordt aangenomen, dat het PTH 1-84 ook intracellulair kan worden afgebroken, ofwel dat het via de intercel-

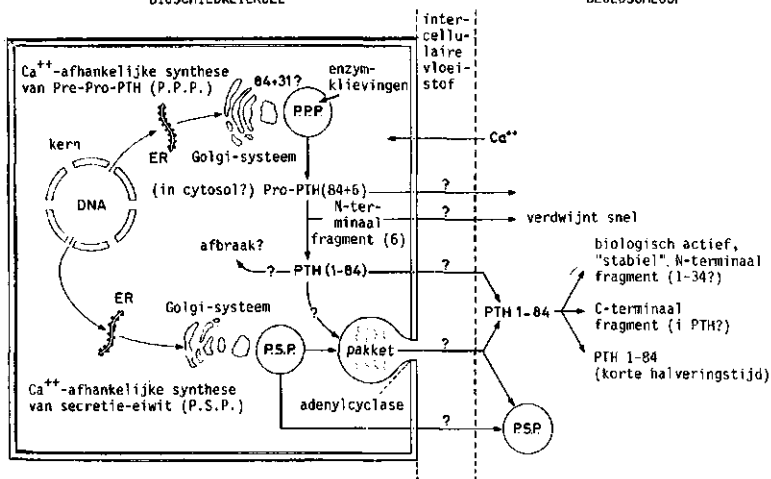


Fig. 1. Schema van het secretiemechanisme van de bij schildklier cel.

lulaire vloeistof in de bloedbaan terecht komt. Daarbij is nog niet met zekerheid bekend of het PTH daarbij aan het 'secretory protein' gebonden is of niet.

Uit het bovenstaande volgt dat er ondanks grote inspanning nog te veel onzekerheden zijn om de vraag te beantwoorden of biologisch actieve brokstukken zoals het PTH 1-34 in de bij schildklier cellen worden opgebouwd en afgescheiden. De mogelijkheid lijkt echter wel aanwezig te zijn. Nader onderzoek is hier zonder twijfel gewenst, omdat we zeker weten dat PTH 1-34 in vitro aan geïsoleerd beenweefsel dat direct uit bindweefsel wordt gevormd (bijvoorbeeld het schedeldak) en aan bot en kraakbeen van embryonale pijpbeentjes kan worden gebonden en deze weefsels specifiek kan beïnvloeden.

Hiermede zijn we bij mijn eigen ervaringen beland. Geïsoleerd desmaals beenweefsel van bijna voldragen embryo's van de Swiss albinomuis bleek reeds enkele seconden na de toediening van 4×10^{-9} mol l^{-1} PTH 1-84 te reageren met een verhoging van het cAMP, hetgeen op een activering van het adenylaacyclase in de celmembranen wijst. Vrijwel tegelijkertijd trad er een verhoging van de lactaatproductie op. Voor een reeks andere cellulaire processen zijn nog lagere hormoon doses mo-

gelijk, hetgeen *Hekkelman* ertoe bracht om twee types receptoren te postuleren, namelijk één met een lage en één met een hoge affiniteit.

In geïsoleerde radii van 15-dagen oude muizeëmbryo's traden vele reacties op die na 24-48 uur zelfs histologisch waarneembaar zijn. Evenals het natuurlijke PTH 1-84 bleek het PTH 1-34 bij toediening van relatief *hoge* doses in deze orgaanculturen een aantal veranderingen te veroorzaken. Wat het perichondrale beenweefsel betreft waren dit: een remming van de botvorming en een bevordering van de botresorptie alsook een toename van het aantal meerkernige osteoclasten. Het kraakbeen reageerde met een *dedifferentiatie* van de hypertrofische cellen, met een remming van de vorming van nieuwe hypertrofische cellen en met een afscheiding van een kraakbeentussenstof met minder sulfaatgroepen.

Figuur 2 toont de betrekkingen tussen de dosis en de reactie van het PTH 1-34 in vergelijking met het PTH 1-84. Daaruit blijkt dat de zojuist genoemde reacties het sterkst zijn bij toediening van relatief hoge doses (10^{-7} - 10^{-6} mol l^{-1}), dat zij sterk verminderen bij doses tussen 10^{-8} en 10^{-7} mol l^{-1} en dat zij nagenoeg afwezig zijn bij de laagste doseringen. Bovendien is het duidelijk dat het PTH 1-34 ook bij de hoogste concentraties minder sterk werkt dan het natuurlijke hormoon, hoewel na herhaalde toediening, voornamelijk bij de hogere doseringen, enige versterking van het effect kan optreden.

Overweegt men echter dat dergelijke hoge concentraties, althans bij de mens, slechts bekend zijn bij ernstige ziekte toestanden die gepaard gaan met een sterke hyperfunctie van de bijnierschlieren, bij aanwezigheid van bijnierschliertumoren ofwel bij enkele kwaadaardige gezwellen, dan is het van het grootste belang te weten of PTH 1-84 en het PTH 1-34 bij onze laagste doseringen, d.w.z. bij concentraties die aan het fysiologische grenzen, inderdaad precies hetzelfde doen.

Bij zorgvuldige bestudering van de preparaten bleek dat bij deze laagste doseringen de eerder genoemde, overwegend catabole, effecten op bot- en kraakbeen niet alleen minder sterk of afwezig waren, maar dat er nu zelfs een stimulering van de botvorming en een stimulering van de kraakbeenrijping d.w.z. anabole effecten optraden! Wat de botvorming betreft kwam het daarbij merkwaardigerwijze tot een osteoïd-vorming buiten de normale plaatsen en wel in de primitieve beenmergholte en niet tot een stimulering van de normale botvorming rondom de kraakbeenvormige aanleg van de pijpbeentjes. Ook bij een lage dosis

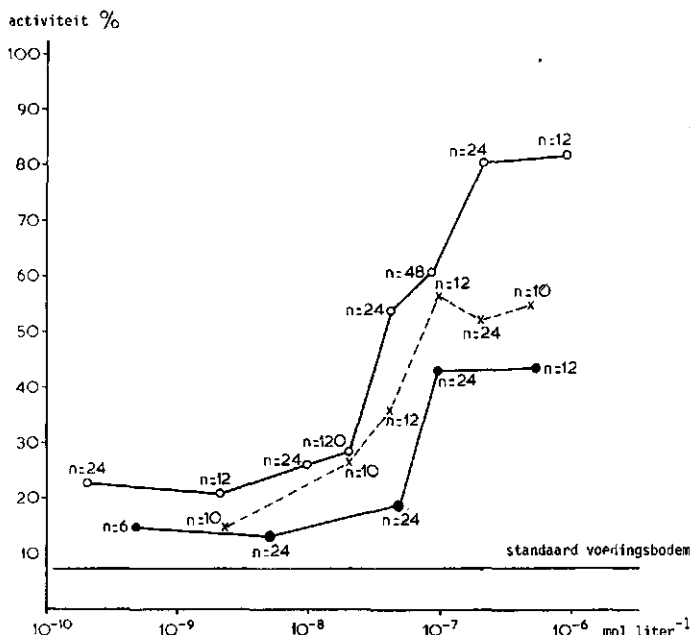


Fig. 2. Veranderingen in de activiteit van twee verschillende stoffen. De activiteiten zijn uitgedrukt als percentage van de maximale activiteit die ooit is waargenomen van een bijschildklier-produkt op de histologische veranderingen in de weefselsoorten die voorkomen in de embryonale pijpbeentjes. o = PTH 1-84, ● = PTH 1-34, x = PTH (voedingsbodem éénmaal ververst).

PTH 1-84 en na toediening van een betrekkelijk lage dosis van een commercieel verkrijgbaar bijschildklierextract (PTE, gefabriceerd door Lilly) kwam een overigens bescheiden ectopische botvorming voor. Op grond van deze waarnemingen lijkt het van bijzonder belang te zijn om te weten of zulke biologisch actieve brokstukken ook onder fysiologische omstandigheden een rol spelen. In dit verband dient vermeld te worden dat mijn waarnemingen aansluiten bij een aantal mededelingen in de literatuur die met regelmatige tussenpozen sinds 1932 werden gepubliceerd. Op grond van één en ander publiceerde *Parsons* (1976) onlangs een overzicht in Vol. IV van een serie geschriften over de biochemie en de fysiologie van beenweefsel en hij verdedigde daarbij de opvatting, dat de belangrijkste fysiologische activiteit van het bijschild-

klierhormoon inderdaad als anabool dient te worden beschouwd. Een nieuwe visie op de endocriene regulatie van bot en kraakbeen is dus bezig tot stand te komen! In dit verband is het nog van belang te weten dat proteïnaire hormonen ook ter plaatse van hun doelwit-weefsel enzymatisch kunnen worden afgebroken en de vraag rijst of daarbij ook, eventueel kort levende, biologisch actieve brokstukken kunnen ontstaan.

In figuur 3 is aangegeven dat in ieder geval het PTH 1-84 aan de doelwit-cellen kan worden gebonden en dat daarbij de eerder genoemde twee soorten receptoren kunnen worden gepostuleerd. Daarnaast is aangegeven dat het biologisch actieve PTH 1-34 een rol zou kunnen spelen. Daarbij is de mogelijkheid open gelaten dat een dergelijk brokstuk ofwel uit het bloed komt, ofwel ter plaatse kan ontstaan. In dit geval is het dan wel de vraag wat er met het resterende stuk (PTH 35-84) gebeurt.

Tenslotte wil ik opmerken dat het bovine PTH 15-25 grote overeenkomst bezit met het ACTH 1-11 en dat het ook de sequentie van het ACTH 4-10 bevat, d.w.z. een stuk dat reeds eerder als een soort 'oerhormoon' werd bestempeld.

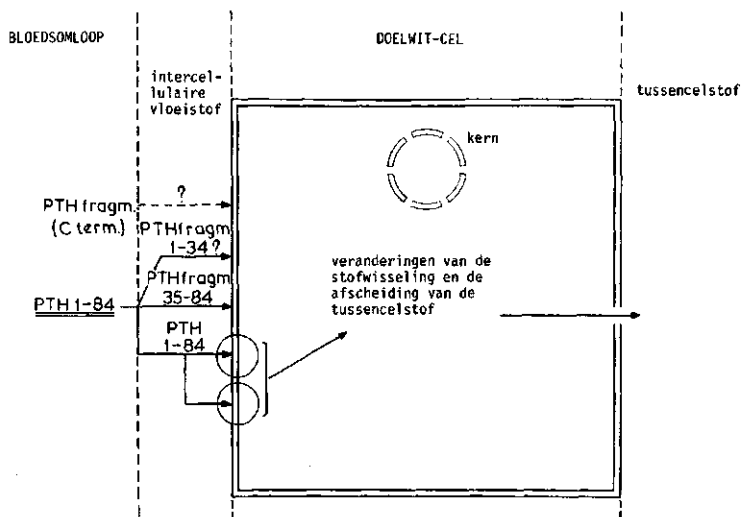


Fig. 3. Schema van de werking van bij schildklier-produkten op een doelwit-cel.

Uit het voorgaande zal het duidelijk zijn dat het onderzoek naar de mogelijke fysiologische betekenis van PTH-brokstukken in volle gang is en het leek daarom de moeite waard om ons af te vragen of wellicht bij *alle* proteïnaire hormonen biologisch actieve brokstukken fysiologisch van belang zijn en zo ja, hoe en waar zij worden gevormd.

Tenslotte wil ik uw aandacht vragen voor enkele facetten van de endocrinologie die van maatschappelijk belang zijn.

Van Oordt wees er reeds op dat de groei van de wereldbevolking een toenemende vraag naar eiwitrijk voedsel met zich mee brengt. De wereldzeeën zijn echter ondanks hun uitgestrektheid niet onuitputtelijk. 'Eigen kweek' van vis op grote schaal zou daaraan in belangrijke mate tegemoet kunnen komen. Voor een aantal zoetwatervissen vormt dit geen groot probleem. Maar voor enkele voor de voeding belangrijke zeewatervissen bestaan in dit opzicht wel grote problemen. Harders en bandengs plegen bijvoorbeeld in gevangenschap géén rijpe eicellen te vormen. Dank zij de toediening van een hormoon, het LH-achtige chorion-gonadotropine, is hierin een verandering gekomen. Dit resultaat wordt beschouwd als een sterke stimulans voor verder onderzoek naar de regulatie van de voortplanting van beenvissen. Zulk voortgezet onderzoek zou er toe kunnen leiden 'dat de natuur wordt gespaard en de hongerigen toch van eiwitrijk voedsel kunnen worden voorzien'.

Staal stond uitvoerig stil bij de resultaten van, en de verwachtingen ten aanzien van de toepassing van endocrinologische principes bij de bestrijding van insecten die direct schadelijk zijn voor de landbouw ofwel verantwoordelijk zijn voor het overbrengen van ziekten. In dit opzicht stelde hij dat er ondanks ongeveer tien jaren van vrij intensief onderzoek helaas geen algemene revolutie in de insectenbestrijding heeft plaatsgevonden. Er zijn echter wel een aantal nuttige praktische toepassingen ontwikkeld. Hij noemde in dit verband de mogelijkheid om plaaginsecten met behulp van een hormoon in een onvolwassen toestand te houden d.w.z. dat er geen imago en dus geen voortplanting optreedt zodat er vrijwel geen schade wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er endocrinologische methoden ontwikkeld voor de bestrijding van insecten die voornamelijk voorkomen in besloten en beschermde ruimten zoals plantekassen en voorraadsilo's. Op grond hiervan lijkt intensieve voortzetting van dit soort onderzoek verantwoord en dus geboden, gezien ook de grote problemen bij de toepassing van vele andere bestrij-

dingsmiddelen.

Kruip gaf een uiteenzetting van de mogelijkheid om met behulp van hormonen de brontst en de ei-uitstoting bij landbouwhuisdieren te regelen. Dit betekent dat daarmee tevens het tijdstip van de geboorten kan worden gepland en dit is voor een efficiënte bedrijfsvoering maar ook voor de bevolking die veeteeltprodukten gebruikt, van betekenis.

Tenslotte werden in de hoofdstukken van *Van der Werff ten Bosch*, *Van Wimersma Greidanus* en *De Wied* en ook *Van der Molen et al.* op duidelijke wijze aandacht besteed aan de nog steeds toenemende betekenis van de endocrinologie voor de diagnostiek en de behandeling van een aantal aandoeningen die onder andere bij de mens voorkomen. In dit verband werd vanzelfsprekend verwezen naar de behandeling van suikerzieken met het hormoon insuline en naar de behandeling van endemische krop met schildklierprodukten. Ook werd gewezen op de betekenis van de orale anticonceptie met hormonen in verband met bijvoorbeeld problemen rondom de groei van de wereldbevolking. Voorts werd aandacht besteed aan de behandeling van verschillende vormen van kanker met hormonen en in het bijzonder aan de mogelijkheid om te trage of te lang voortdurende lengtegroei van het skelet met behulp van hormonen te corrigeren. Tenslotte werd in het bijzonder door *Van Wimersma Greidanus* en *De Wied* gewag gemaakt van de betekenis van de zogenaamde 'kleine peptiden' voor de behandeling van patiënten met een beschadiging van de hypofyse. In de laatste jaren wordt ook onderzocht of dergelijke peptidehormonen bij de mens een heilzame werking hebben op concentratie- en/of geheugenstoornissen zoals die bij mensen op oudere leeftijd kunnen voorkomen. Overziet men deze samenvatting van 'facetten die van maatschappelijk belang zijn' dan stellen we vast dat een aantal belangrijke resultaten is geboekt, maar ook dat er in de naaste toekomst nog belangrijke vooruitgang te verwachten is.

Literatuur¹

Het neuro-endocriene systeem

(J. Joosse)

- *Barrington, E.J.W., 1975. An introduction to general and comparative endocrinology. Clarendon Press, Oxford, 281 p.
- *Bentley, P.J., 1976. Comparative vertebrate endocrinology. Cambridge University Press, Cambridge, 415 p.
- Bern, H.A. & I. Hagadorn, 1965. Neurosecretion. In: Th.H. Bullock & G.A. Horridge (Eds): Structure and function in the nervous systems of invertebrates. Freeman en Co., London.
- Carlisle, D.B. & F. Knowles, 1959. Endocrine control in crustaceans. Cambridge University Press.
- Frye, B.E., 1967. Hormonal control in vertebrates. Macmillan Company, London, 122 p.
- Geraerts, W.P.M., 1975. Studies on the endocrine control of growth and reproduction in the hermaphrodite pulmonate snail *Lymnaea stagnalis*. Dissertatie V.U. Amsterdam, Drukkerij Elinkwijk, Utrecht.
- *Highnam, K.C. & L. Hill, 1977. The comparative endocrinology of the invertebrates. Edward Arnold, London, 357 p.
- Maddrell, S.H.P., 1974. Neurosecretion. In: J.E. Treherne (Ed.): Insect neurobiology. North-Holland Publishing Company, Amsterdam, p. 308-357.
- Peute, J. & J.C. van de Kamer, 1967. On the histochemical differences of aldehydfuchsin positive material in the fibres of the hypothalamo-hypophysial tract of *Rana temporaria*. *Z. Zellforsch. mikrosk. Anat.* 83: 441-448.
- Roubos, E.W., 1976. Regulation of neurosecretion in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* (L.). Dissertatie V.U. Amsterdam, Drukkerij Elinkwijk, Utrecht.
- Schaller, H.C., 1976. Action of a neurohormone from *Hydra*. In: Actualités sur les hormones d'invertébrés. *Colloques int. Cent. Nat. Res. Scient.* 251: 33-38.
- *Scharrer, E. & B. Scharrer, 1963. Neuroendocrinology. Columbia University Press, New York en London, 289 p.
- Schooneveld, H., 1970. Structural aspects of neurosecretory and corpus allatum activity in the adult colorado beetle, *Leptinotarsa decemlineata* Say, as a function of daylength. *Neth. J. Zool.* 20: 151-237.
- Stone, J.V., W. Mordue, K.E. Batley en H.R. Morris, 1976. Structure of adipokinetic hormone, a neurohormone that regulates lipid utilisation during flight. *Nature, Lond.* 263: 207-211.

1. De met * aangegeven referenties geven een algemeen overzicht.

- Swindale, N.V. & P.R. Benjamin, 1976. The anatomy of neurosecretory neurones in the pond snail *Lymnaea stagnalis* (L.). *Phil. Trans. R. Soc., series B* 274: 169-202.
- Wendelaar Bonga, S.E., 1970. The neurosecretory cells in the central nervous system of the pulmonate *Lymnaea stagnalis*, studied by histochemical techniques and by quantitative electron microscopy. Dissertatie V.U. Amsterdam.
- Westphall, J.A., 1973. Ultrastructural evidence for a granula-containing sensory-motor-interneuron in *Hydra littoralis*. *J. Ultrastruct. Res.* 42: 268-282.

Het binnenspel van vissen en derzelver voortplanting² (P.G.W.J. van Oordt)

- Abraham, M., N. Blanc & A. Yashouv, 1966. Oogenesis in five species of grey mullets (Teleostei, Mugilidae) from natural and landlocked habitats. *Israel J. Zool.* 15: 155-172.
- Abraham, M., A. Yashouv & N. Blanc, 1967. Induction expérimentale de la ponte chez *Mugil capito* confiné en eau douce. *C.r. hebdomadaire Séances Acad. Sci., Paris* 265: 818-821.
- *Ball, J.N. & B.I. Baker, 1969. The pituitary gland: anatomy and histophysiology. In: W.S. Hoar & D.J. Randall (Eds): *Fish physiology. II. The endocrine system*. Academic Press, New York/London, p. 1-110.
- Ball, J.N., M. Oliverau, A.M. Slicher & K.D. Kallman, 1965. Functional capacity of ectopic pituitary transplants in the teleost *Poecilia formosa*, with a comparative discussion on the transplanted pituitary. *Phil. Trans. R. Soc. (B)* 249: 69-99.
- *Barr, W.A., 1968. Patterns of ovarian activity. In: E.J.W. Barrington & C. Barker Jørgensen (Eds): *Perspectives in endocrinology. Hormones in the lives of lower vertebrates*. Academic Press, New York/London, p. 163-237.
- Billard, R., B. Breton & M.P. Dubois, 1971. Immunocytologie et histochimie des cellules gonadotropes et thyroïdotropes hypophysaires chez la carpe, *Cyprinus carpio*. *C. r. hebdomadaire Séances Acad. Sci., Paris* 272: 981-983.
- Colombo, L., H.A. Bern, J. Pieprzyk & D.W. Johnson, 1973. Biosynthesis of 11-desoxy-corticosteroids by teleost ovaries and discussion of their possible role in oocyte maturation and ovulation. *Gen. comp. Endocrin.* 21: 168-178.
- Donaldson, E.M., F. Yamazaki, H.M. Dye & W.W. Philleo, 1972. Preparation of gonadotropin from salmon (*Onchorhynchus tshawytscha*) pituitary glands. *Gen. comp. Endocrin.* 18: 469-481.
- Eckstein, B., 1975. Possible reasons for the infertility of grey mullets confined to fresh water. *Aquaculture* 5: 9-17.
- Ekgren, B., 1975. Structural aspects of the hypothalamo-hypophysial complex of the roach, *Leuciscus rutilus*. Dissertatie Stockholm.

2. Onder verantwoordelijkheid van de redactiecommissie bekort

- *Follénus, E., 1965. Bases structurales et ultrastructurales des correlations hypothalamo-hypophysaires chez quelques espèces de poissons téléostéens. *Ann. Sci. Natur. Zool.* (12) 7: 1-150.
- *Fontaine, M., 1976. Hormones and the control of reproduction in aquaculture. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 33: 922-939.
- Fontaine, Y.-A., E. Burzawa-Gérard, C. Salmon, E. Fontaine-Bertrand & N. Dele-rue-Le Belle, 1974. Pituitary gonadotropins and their stimulation of ovarian adenylcyclase activity, comparative studies in fish and mammals. In: G.K. Ras-togi (Ed.): Proc. fifth Asia & Oceania Congr. Endocrin. Publ. Endocrin. Soc. India, p. 351-360.
- Goos, H.J.Th. & O. Murathanoglu, 1977. Localization of gonadotropin releasing hormone (GRH) in the forebrain and neurohypophysis of the trout (*Salmo gairdneri*). An immunofluorescence study. *Cell Tissue Res.* 181: 163-168.
- Goos, H.J.Th., R. Seldenrijk & J. Peute, 1976. The gonadotropic cells in the pitu-itary of the black molly, *Mollienisia latipinna*, and other teleosts identified by the immunofluorescence technique in normal and androgen-treated animals. *Cell Tissue Res.* 167: 211-219.
- *Hoar, W.S. & D.J. Randall, 1969. Fish physiology. II. The endocrine system. Aca-demic Press, New York/London, 446 p.
- *Holmes, R.L. & J.N. Ball, 1974. The pituitary gland. A comparative account. Cambridge University Press, 397 p.
- Hurk, R. van den, 1975. Morphological and functional aspects of the testis of the black molly (*Mollienisia latipinna*). Dissertatie Utrecht.
- Hurk, R. van den & H. van de Kant, 1975. The effect of methyl testosterone, 11-ketotestosterone and methallibure on gonadotropic cells, Leydig cells, sper-matogenesis and the epithelium of the intratesticular efferent duct system of the juvenile male black molly (*Mollienisia latipinna*). *Proc. K. ned. Akad. Wet. Amsterdam (C)* 78: 275-286.
- Idler, D.R., L.S. Bazar & S.J. Hwang, 1975. Fish gonadotropin(s). III. Evidence for more than one gonadotropin in chum salmon pituitary glands. *Endocrine Res. comm.* 2: 237-249.
- *Jalabert, B., 1976. In vitro oocyte maturation and ovulation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*), Northern pike (*Esox lucius*), and goldfish (*Carassius auri-tus*). *J. Fish. Res. Bd. Can.* 33: 974-988.
- Kaul, S. & L. Vollrath, 1975a. The goldfish pituitary. I. Cytology. *Cell Tissue Res.* 154: 211-230.
- Kaul, S. & L. Vollrath, 1975b. The goldfish pituitary. II. Innervation. *Cell Tissue Res.* 145: 231-249.
- *Korringa, P., 1976. Farming marine fishes and shrimps. Developments in aquacul-ture and fisheries science, vol. 4. Elsevier Scientific Publ. Comp., p. 5-90.
- Lambert, J.G.D., 1969. Steroidproductie in het ovarium van *Poecilia reticulata*. Dissertatie Utrecht.
- *Lambert, J.G.D. & P.G.W.J. van Oordt, 1974. Ovarian hormones in teleosts. *Forstchr. Zool.* 22: 340-349.

- Lambert, J.G.D. & M.G.E. Pot, 1975. Steroidogenesis in ovarian tissue of a viviparous teleost, the guppy *Poecilia reticulata*. *Comp. Biochem. Physiol.* 50B: 585-589.
- *Liley, N.R., 1969. Hormone and reproductive behaviour in fishes. In: W.S. Hoar & D.J. Randall (Eds): Fish physiology. III. Reproduction and growth, bioluminescence, pigments and poisons. Academic Press, New York/London, p. 73-116.
- Olivereau, M., 1971. Structure histologique de quelques glandes endocrines de l'anguille après autotransplantation de l'hypophyse. *Acta zool. (Stockholm)* 52: 69-83.
- Olivereau, M., 1976. Les cellules gonadotropes hypophysaires du saumon de l'atlantique: Unicité ou dualité? *Gen. comp. Endocrinol.* 28: 82-95.
- *Oordt, P.G.W.J. van, 1968. The analysis and identification of the hormone-producing cells of the adenohypophysis. In: E.J.W. Barrington & C. Barker Jørgensen (Eds): Perspectives in endocrinology. Hormones in the lives of lower vertebrates. Academic Press, New York/London, p. 405-467.
- *Peter, R.E., 1970. Hypothalamic control of thyroid gland activity and gonadal activity in the goldfish, *Carassius auratus*. *Gen. comp. Endocrinol.* 14: 334-356.
- Peter, R.E. & Y. Nagahama, 1976. A light and electron microscopic study of the structure of the nucleus preopticus and nucleus lateralis tuberis of the goldfish, *Carassius auratus*. *Can. J. Zool.* 54: 1423-1437.
- Peute, J., M.G.A. de Bruyn, R. Seldenrijk & P.G.W.J. van Oordt, 1976. Cytophysiology and innervation of gonadotropic cells in the pituitary of the black molly (*Poecilia latipinna*). An electron microscopical study. *Cell. Tissue Res.* 174: 35-54.
- *Pickford, G.E. & J.W. Atz, 1957. The physiology of the pituitary gland of fishes. New York Zoological Society, New York, 613 p.
- Plack, P.A. & D.J. Pritchard, 1968. Effect of estradiol 3-benzoate on the concentrations of retinal and lipids in cod plasma. *Biochem. J.* 106: 257-262.
- Plack, P.A., D.J. Pritchard & N.W. Fraser, 1971b. Egg proteins in cod serum. Natural occurrence and induction by injections of estradiol 3-benzoate. *Biochem. J.* 121: 847-856.
- Ree, G.E. van, 1976. Effects of methallibure (I.C.I. 33,828) and ovine luteinizing hormone on the ovary and the pituitary of the female zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Proc. K. ned. Akad. Wet. Amsterdam (C)* 79: 150-170.
- *Reinboth, R., 1972. Hormonal control of the teleost ovary. *Am. Zool.* 12: 307-324.
- *Sage, M., 1973. The evolution of thyroidal function in fishes. *Am. Zool.* 13: 899-905.
- Samuelson, B., B. Fernholm & G. Fridberg, 1968. Light microscopic studies on the nucleus lateralis tuberis and the pituitary of the roach, *Leuciscus rutilus*, with reference to the nucleus-pituitary relationship. *Acta zool. (Stockholm)* 49: 141-153.

- Stacey, N.E. & S. Pandey, 1975. Effects of indomethacin and prostaglandins on ovulation of goldfish. *Prostaglandins* 9: 597-608.
- *Sterba, G., 1967. Neurosekretion und Hydrenzephalokrinie der Wirbeltiere. *Biol. Rundschau* 5: 57-70.
- Sundararaj, B.T. & S.V. Goswami, 1971. Effects of desoxycorticosterone and hydrocortisone singly and in various combinations on in vitro maturation of oocytes of the catfish *Heteropneustes fossilis* Bloch. *Gen. comp. Endocrin.* 17: 570-573.
- Watts, E.G., D.H. Copp & L.I. Deftos, 1975. Changes in plasma calcitonin and calcium during the migration of salmon. *Endocrinology* 96: 214-218.
- Wereld Voedsel- en Landbouworganisatie, 1976. Summary of the FAO technical conference on aquaculture Kyoto, Japan 26 May-2 June 1976, 39 p.
- Zambrano, D., 1970. The nucleus lateralis tuberis system of the gobiid *Gillichthys mirabilis*. I. Ultrastructure and histochemical characterization of the nucleus. *Z. Zellforsch.* 110: 9-26.

Het endocriene systeem en aanpassingen van stekelbaarzen aan hun milieu (B. Baggerman)

- Baggerman, B., 1957. On the timing of breeding and migration in the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. *Archs. néerl. Zool.* 12: 105-317
- *Baggerman, B., 1961. Over de veroorzaking van trek bij vissen. *Vakbl. Biol.* 2/3: 21-39.
- *Baggerman, B., 1968. Hormonal control of reproductive and parental behaviour in fishes. In: E.J.W. Barrington & C. Barker Jørgensen (Eds): Perspectives in endocrinology, Academic Press, London/New York, p. 351-404.
- Baggerman, B., 1972. Photoperiodic responses in the stickleback and their control by a daily rhythm of photosensitivity. *Gen. comp. Endocrinol., Suppl.* nr. 3, p. 466-475.
- *Beck, S.D., 1963. Animal photoperiodism. Relationship of daylength to animal growth, development and behaviour. Holt, Rinehart en Winston, Inc. N. York.
- *Bentley, P.J., 1971. Endocrines and osmoregulation. A comparative account of the regulation of water and salt in vertebrates. Springer Verlag, Berlin.
- Bentley, P.J., 1976. Comparative vertebrate endocrinology. Cambridge University Press.
- *Brown, F.A., J. Woodland Hastings & J.D. Palmer, 1970. The biological clock (two views). Academic Press, London/New York.
- *Bünning, E., 1963. Die physiologische Uhr (Zeitmessungen in Organismen mit ungefähr tagesperiodischen Schwingungen). Springer Verlag, Berlin.
- Farner, D.S., 1975. Photoperiodic control in the secretion of gonadotropins in birds. *Am. Zool.* 15 (Suppl. 1): 117-135.
- *Grzimek, B., 1976. Het leven der dieren. [deel over 'Gedrag']. Spectrum.

- Gwinner, E., 1972. Adaptive functions of circannual rhythms in birds. Proceedings of the XVth International Ornithology Congress, p. 218-236.
- Hamner, W.M., 1964. Circadian control of photoperiodism in the House Finch demonstrated by interrupted-night experiments. *Nature, Lond.* 203: 1400-1401.
- *Hasler, A.D., 1971. Orientation and fish migration. In: W.S. Hoar & D.J. Randall (Eds): Fish physiology, Vol. VI, Environmental relations and behaviour. Academic Press, London/New York.
- *Jarman, C., 1972. Atlas of animal migration. Heineman, London.
- *Koch, H.J.A., 1968. Migration. In: E.J.W. Barrington & C. Barker Jørgensen (Eds): Perspectives in endocrinology. Academic Press, London/New York, p. 305-350.
- Leatherland, J.F., 1970. Seasonal variation in the structure and ultrastructure of the pituitary of the marine form (trachurus) of the threespine stickleback, *Gasterosteus aculeatus* L. I. Rostral pars distalis. *Z. Zellforsch. mikrosk. Anat.* 104: 301-317.
- *Palmer, J.D., 1976. An introduction to biological rhythms. Academic Press.
- *Pengelley, E.T. & S.J. Asmundson, 1971. Annual biological clocks. *Sci. Amer.* 224: 72-79.
- Ruiter, A.J.H. de, 1976. A combined structural and biochemical analysis of the effect of testosterone on kidney function of the three-spined stickleback. *Gen. comp. Endocrinol.* 2: 283-284.
- Wendelaar Bonga, S.E. 1973. Morphometrical analysis with the light- and electron microscope of the kidney of the anadromous three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus*, form *trachurus* from fresh water and from sea water. *Z. Zellforsch. mikrosk. Anat.* 137: 563-588.
- Wendelaar Bonga, S.E., 1976. The effect of prolactin on kidney structure of the euryhaline teleost *Gasterosteus aculeatus* during adaptation to fresh water. *Cell Tissue Res.* 166: 319-338.
- Wendelaar Bonga, S.E., J.A.A. Greven & M. Veenhuis, 1976. The relationship between the ionic composition of the environment and the secretory activity of the endocrine cell types of Stannius corpuscles in the teleost *Gasterosteus aculeatus*. *Cell Tissue Res.* 175: 297-312.
- Wendelaar Bonga, S.E. & M. Veenhuis, 1974a. The membranes of the basal labyrinth in kidney cells of the stickleback *Gasterosteus aculeatus*, studied in ultrathin sections and freeze-etch replicas. *J. Cell Sci.* 14: 587-609.
- Wendelaar Bonga, S.E. & M. Veenhuis, 1974b. The effect of prolactin on the number of membrane-associated particles in kidney cells of the euryhaline teleost *Gasterosteus aculeatus* during transfer from seawater to freshwater: a freeze-etch study. *J. Cell Sci.* 16: 687-701.
- *Wootton, R.J., 1976. The biology of the sticklebacks. Academic Press.

Het werkingsmechanisme van peptidehormonen (J.W. Hekkelman)

- Appleman, M.M., W.J. Thompson & T.R. Russell, 1973. Cyclic-nucleotide phosphodiesterases. In: P. Greengard & G.A. Robison (Eds.): *Advances in cyclic nucleotide research*, vol. 3. Raven Press, New York, p. 73.
- Beavo, J.A., J.G. Hardman & E.W. Sutherland, 1971. Stimulation of adenosine 3', 5'-monophosphate hydrolysis by guanosine 3',5'-monophosphate. *J. biol. Chem.* 246: 3841-3846.
- Bilezikian, J.P. & G.D. Aurbach, 1974. The effects of nucleotides on the expression of β -adrenergic adenylate cyclase activity in membranes from turkey erythrocytes. *J. biol. Chem.* 249: 157-161.
- Booij, H.L. & W.Th. Daems, 1976. *Biomembranen; 50 jaar na Gorter en Grendel*. Biologische Raad Reeks. Pudoc, Wageningen, 166 p.
- Brostrom, M.A., E.M. Reimann, D.A. Walsh & E.G. Krebs, 1970. A cyclic AMP-stimulated protein kinase from cardiac muscle. *Adv. Enzyme Regulation* 8: 191.
- Cuatrecasas, P., 1974. Membrane receptors. *A. Rev. Biochem.* 43: 204.
- Gaillard, P.J., A.M. Wassenaar & M.E. van Wijhe-Wheeler, 1977. Effects of parathyroid hormone and synthetic fragment (PTH 1-34) on bone in vitro. *Proc. K. ned. Akad. Wetensch. Series C*, 80: 267-280.
- Goldberg, N.D., M.K. Haddox, S.E. Nicol, D.B. Glass, C.H. Sanford, F.A. Kuehl, Jr. & R. Estensen, 1975. Biologic regulation through opposing influences of cyclic GMP and cyclic AMP: The yin yang hypothesis. In: G.I. Drummond, P. Greengard & G.A. Robison (Eds): *Advances in cyclic nucleotide research*, vol. 5. Raven Press, New York, p. 307-330.
- Goldberg, N.D., R.F. O'Dea & M.K. Haddox, 1973. Cyclic GMP. In: P. Greengard & G.A. Robison (Eds): *Advances in cyclic nucleotide research*, vol. 3. Raven Press, New York, p. 155-223.
- Hekkelman, J.W. & M.P.M. Herrmann-Erlee, 1976. Interrelations of ion transport and some cellular effects of parathyroid hormone. *Israel J. med. Sci.* 12 (12): 11.
- Hekkelman, J.W., M.P.M. Herrmann-Erlee, J.N.M. Heersche & P.J. Gaillard, 1975. Studies on the mechanism of parathyroid hormone action on embryonic bone in vitro. In: R.V. Talmage, M. Owen & J.A. Parsons (Eds): *Calcium regulating hormones*. Excerpta Medica, Amsterdam, p. 185-194.
- Herrmann-Erlee, M.P.M., J.N.M. Heersche, J.W. Hekkelman, P.J. Gaillard, G.W. Tregear, J.A. Parsons & J.T. Potts Jr., 1976. Effects on bone in vitro of bovine parathyroid hormone and synthetic fragments representing residues 1-34, 2-34 and 3-34. *Endocrine Res. Commun.* 3: 21-35.
- Johnson, C.B., M. Blecher & N.A. Giorgio Jr., 1972. Hormone receptors: Activation of rat liver plasma membrane adenyl cyclase and fat cell lipolysis by agarose-glucagon. *Biochem. biophys. Res. Commun.* 46: 1035-1041.
- Kakiuchi, S., R. Yamazaki & Y. Teshima, 1971. Cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase. IV. *Biochem. biophys. Res. Commun.* 49: 968-974.

- Konijn, Th.M., 1974. Cyclisch AMP als schakel en hormoon. In: P. van Duijn (Red.): *Celbiologie*. Biologische Raad Reeks. Pudoc, Wageningen, p. 199-219.
- Krebs, E.G., 1973. The mechanism of hormonal regulation by cyclic AMP. In: R.O. Scow (Ed.): *Endocrinology*. Excerpta Medica, Amsterdam, p. 17-29.
- Langan, T.A., 1973. Protein kinases and protein kinase substrates. In: P. Greengard & G.A. Robison (Eds): *Advances in cyclic nucleotide research*, vol. 3. Raven Press, New York, p. 99-153.
- Mears, D.C., 1971. Effects of parathyroid hormone and thyrocalcitonin on the membrane potential of osteoclasts. *Endocrinology* 88: 1021-1028.
- Parsons, J.A., 1976. Parathyroid physiology and the skeleton. In: G.H. Bourne (Ed): *The biochemistry and physiology of bone*, vol. 4. Academic Press, New York, p. 159-226.
- Rasmussen, H., P. Jensen, W. Lake, N. Friedmann & D.B.P. Goodman, 1975. Cyclic nucleotides and cellular calcium metabolism. In: G.I. Drummond, P. Greengard & G.A. Robison (Eds): *Advances in cyclic nucleotide research*, vol. 5. Raven Press, New York, p. 375-394.
- Rasmussen, H., K. Kurokawa, J. Mason & D.B.P. Goodman, 1972. Cyclic AMP, calcium and cell activation. In: R.V. Talmage & P.L. Munson (Eds): *Calcium, parathyroid hormone and the calcitonins*. Excerpta Medica, Amsterdam, p. 492-591.
- Robison, G.A., R.W. Butcher & E.W. Sutherland, 1971. *Cyclic AMP*. Academic Press, New York, 531 p.
- Singer, S.J. & G.L. Nicholson, 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science N.Y.* 175: 720-731.

Het werkingsmechanisme van steroïdhormonen (H.J. van der Molen et al.)

- Baulieu, E.E., A. Alberga, I. Jung, M.C. Lebeau, C. Mercier-Bodard, E. Milgrom, J.P. Raynaud, C. Raynaud-Jamet, H. Rochefort, H. Truong & P. Robel, 1971. Metabolism and protein binding of sex steroids in target organs: an approach to the mechanism of hormone action. *Recent Prog. Horm. Res.* 27: 351-419.
- Baxter, J.D. & G.M. Tomkins, 1971. Specific cytoplasmic glucocorticoid hormone receptors in hepatoma tissue culture cells. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* 68: 932-937.
- Bresciani, F., E. Nola, V. Sica & G.A. Puca, 1973. Early stages in estrogen control of gene expression and its dearrangement in cancer. *Fedn. Proc.* 32: 2126-2132.
- Buller, R.E., R.J. Schwartz, W.T. Schrader & B.W. O'Malley, 1976. Progesterone-binding components of chick oviduct. In vitro effect of receptor subunits on gene transcription. *J. biol. Chem.* 251: 5178-5186.
- Clark, J.H. & J.J. Peck, 1976. Nuclear retention of receptor-oestrogen complex and nuclear acceptor sites. *Nature, Lond.* 260: 635-637.

- Davies, P. & K.J. Griffiths, 1974. Further studies on the stimulation of prostatic ribonucleic acid polymerase by 5 α -dihydrotestosterone-receptor complexes. *J. Endocr.* 62: 385-400.
- Feigelson, P., M. Beato, P. Colman, M. Kalini, L.A. Killewich & G. Schutz, 1975. Studies on the hepatic glucocorticoid receptor and on hormonal modulation of specific mRNA levels during enzyme induction. *Recent Prog. Horm. Res.* 31: 213-239.
- Gruber, M., E.S. Bos & G. AB, 1976. Hormonal control of vitellogenin synthesis in avian liver. *Molec. cell Endocr.* 5: 41-50.
- Harris, S.E., J.M. Rosen, A.R. Means & B.W. O'Malley, 1975. Use of a specific probe for ovalbumin messenger RNA to quantitate estrogen-induced gene transcription. *Biochemistry* 14: 2072-2081.
- Jacob, F. & J. Monod, 1961. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. molec. Biol.* 3: 318-330.
- Jensen, E.V. & E.R. DeSombre, 1972. Mechanism of action of the female sex hormones. *A. Rev. Biochem.* 41: 203-230.
- Kalimi, M., S.Y. Tsai, M.J. Tsai, J.H. Clark & B.W. O'Malley, 1976. Effect of estrogen on gene expression in the chick oviduct. Correlation between nuclear-bound estrogen receptor and chromatin initiation sites for transcription. *J. biol. Chem.* 251: 516-523.
- Karlson, P., 1962-63. New concepts on the mode of action of hormones. *Perspect. Biol. Med.* 6: 203-210.
- King, R.J.B. & W.I.P. Mainwaring, 1974. Steroid-Cell interactions, Butterworth, London.
- Kuhn, R.W., W.T. Schrader & R.G. Smith, 1975. Progesterone binding components of chick oviduct. X. Purification by affinity chromatography. *J. biol. Chem.* 250: 4220-4228.
- McGuire, W.L., G.C. Chamness & R.E. Sheperd, 1974. Molecular effects of hormones in breast cancer: Estrogen receptors. *Life Sciences* 14: 19-33.
- McKnight, C.S., P. Pennequin & R.T. Schimke, 1975. Induction of ovalbumin mRNA sequences by estrogen and progesterone in chick oviduct as measured by hybridization to complementary DNA. *J. biol. Chem.* 250: 8105-8110.
- Monahan, J.J., L.A. McReynolds & B.W. O'Malley, 1976. The ovalbumin gene. In vitro enzymatic synthesis and characterization. *J. biol. Chem.* 251: 7355-7362.
- O'Malley, B.W., W.L. McGuire, P.A. Kohler & S.G. Korenman, 1969. Studies on the mechanism of steroid hormone regulation of synthesis of specific proteins. *Recent Prog. Horm. Res.* 25: 105-160.
- O'Malley, B.W. & A.R. Means, 1974. Female steroid hormones and target cell nuclei. *Science N.Y.* 183: 610-620.
- Palmiter, R.D., P.B. Moore, E.R. Mulvihill & S. Emtage, 1976. A significant lag in the induction of ovalbumin messenger RNA by steroid hormones: a receptor translocation hypothesis. *Cell* 8: 557-572.

- Schimke, R.T., G.S. McKnight, D.J. Shapiro, D. Sullivan & P. Palacios, 1975. Hormonal regulation of ovalbumin synthesis in the chick oviduct. *Recent Prog. Horm. Res.* 31: 175-208.
- Schwartz, R.J., M.J. Tsai, S.Y. Tsai & B.W. O'Malley, 1975. Effect of estrogen on gene expression in the chick oviduct. V. Changes in the number of RNA polymerase binding and initiation sites in chromatin. *J. biol. Chem.* 250: 5175-5182.
- Szego, C.M., 1974. The lysosome as a mediator of hormone action. *Recent Prog. Horm. Res.* 30: 171-223.
- Tata, J.R., 1976. The expression of the vitellogenin gene. Review. *Cell* 9: 1-14.
- Tsai, M.J., M.J. Schwartz, S.Y. Tsai & B.W. O'Malley, 1975. Effects of estrogen on gene expression in the chick oviduct. IV. Initiation of RNA synthesis on DNA and chromatin. *J. biol. Chem.* 250: 5165-5174.
- Tsai, M.J., S.Y. Tsai, H.C. Towle & B.W. O'Malley, 1976. Effect of estrogen on gene expression in the chick oviduct. Studies on the initiation of RNA synthesis on chromatin in vitro. *J. biol. Chem.* 251: 5565-5574.
- Tsai, S.Y., M.J. Tsai, R. Schwartz, M. Kalimi, J.H. Clark & B.W. O'Malley, 1975. Effects of estrogen on gene expression in chick oviduct: nuclear receptor levels and initiation of transcription. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* 72: 4228-4232.
- Williams, D. & J. Gorski, 1972. Kinetic and equilibrium analysis of estradiol in uterus. A model of binding-site distribution in uterine cells. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* 69: 3464-3468.
- Yamamoto, K.R. & B. Alberts, 1975. The interaction of estradiol-receptor protein with the genome: an argument for the existence of undetected specific sites. *Cell* 4: 301-310.
- Yamamoto, K.R., U. Gehring, M.R. Stampfer & C.H. Sibley, 1975. Genetic approaches to steroid hormone action. *Recent Prog. Horm. Res.* 31: 3-32.

Hormonale invloed op voortplanting en milieurelaties van insecten (J. de Wilde)

- Bernard, Cl., 1878-1879. Leçons sur les phénomènes de la vie communs aux animaux et aux végétaux. Baillière, Paris, 2 delen.
- Engelmann, F., 1970. The physiology of insect reproduction. Pergamon Press, Oxford.
- Kort, C.A.D. de, 1969. Hormones and the structural and biochemical properties of the flight muscles in the Colorado beetle. *Meded. Landb. Hogesch. Wageningen* (69-2), 63 p.
- Kramer, S.J. & C.A.D. de Kort, 1977. Juvenile hormone carrier lipoprotein in the hemolymph of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Insect Biochem.* (in druk).
- Kramer, S.J. & C.A.D. de Kort, 1976. Age-dependent changes in juvenile hormone esterase and general carboxyesterase activity in the hemolymph of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Molec. cell. Endocr.* 4: 43-53.

- Lees, A.D., 1955. The physiology of diapause in arthropods. Cambridge University Press, 151 p.
- Minks, A.K., 1967. Biochemical aspects of juvenile hormone action in the adult *Locusta migratoria*. *Archs. néerl. Zool.* 17: 175-258.
- Nowock, J., D. Hammock & L.J. Gilbert, 1976. The binding protein as a modulator of Juvenile hormone stability and uptake. In: L.I. Gilbert (Ed): The juvenile hormones. Plenum Press, New York/London, p. 354-373.
- Scharrer, E. & B. Scharrer, 1963. Neuroendocrinology. Columbia University Press, New York/London, 289 p.
- Schooneveld, H., 1970. Structural aspects of neurosecretory and corpus allatum activity in the adult Colorado beetle, *Leptinotarsa decemlineata* Say. *Neth. J. Zool.* 20: 151-237.
- Uexküll, J. von, 1909. Umwelt und Innenwelt der Tiere. Julius Springer, Berlin.
- Weed, I.G., 1936. Removal of corpora allata on egg production in the grasshopper, *Melanoplus differentialis*. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 34: 883-5.
- Wigglesworth, V.B., 1936. The function of the corpus allatum in the growth and reproduction of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *Q. Jl. microsc. Sci.* 79: 91-121.
- Wilde, J. de, 1962. Photoperiodicity in insects and mites. *A. Rev. Entomol.* 7: 1-26.
- Wilde, J. de, 1969. Diapause and seasonal synchronization in the adult Colorado beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say.). In: Dormancy and survival. *Symp. Soc. exp. Biol.* 33: 263-284.
- Wilde, J. de, 1971. Hormones and insect diapause. In: Hormones and the environment. *Mem. Soc. Endocr.* 18: 487-514.
- Wilde, J. de & A. de Loof, 1973. Reproduction. In: M. Rockstein (Ed): The physiology of insecta, Vol. 1. Academic Press, New York. Hfst. 2, p. 11-95.
- Wilde, J. de & A. de Loof, 1973. Reproduction-endocrine control. In: M. Rockstein (Ed): The physiology of insecta, Vol. 1. Academic Press, New York, Hfst. 3, p. 97-157.

Invloed van neuropeptiden op het gedrag van zoogdieren (Tj.B. van Wimersma Greidanus en D. de Wied)

- Gispen, W.H., Tj.B. van Wimersma Greidanus, B. Bohus & D. de Wied, 1975. Hormones, homeostasis and the brain. In: Progress in brain research, vol. 42. Elsevier Publishing Company, Amsterdam.
- Wied, D. de, 1973. Neuropeptiden en gedrag. *Chem. Weekbl.* 21: 11-15.
- Wied, D. de, 1974. Neuropeptiden en gedrag. *Ned. Tijdsch. Geneesk.* 118: 1865-1869.
- Wied, D. de, 1975. Hypofysaire peptiden en gedrag. *Organorama* 1: 3-13.
- Wimersma Greidanus, Tj.B. van & S.G.T. Hulst, 1975. Inleiding tot de endocrinologie. Stafleu's Wetenschappelijke Uitgevers Mij, Leiden.

Klinische aspecten van de endocrinologie J.J. van der Werff ten Bosch)

- Aafjes, J.H., J.T.M. Vreeburg, J.J. van der Werff ten Bosch, 1972. Modellen van het hormonale stelsel. Wetenschappelijke Uitgeverij, Amsterdam.
- Gardner, L.I. (Ed.), 1975. Endocrine and genetic diseases of childhood, 2e editie. Saunders, London.
- Money, J. & A.A. Ehrhardt, 1974. Man & woman, boy & girl. Mentor Book nr. 1295.
- Parkes, A.S., 1976. Patterns of sexuality and reproduction. Oxford University Press.
- Tausk, M., 1976. Farmacologie van de hormonen, 4e druk. Elsevier, Amsterdam.
- Wilkins, L., 1975. The diagnosis and treatment of endocrine disorders in childhood and adolescence. 3e editie, 3e druk. Thomas, Springfield.
- Williams, R.H. (Ed.), 1974. Textbook of endocrinology. 5e editie. Saunders, Philadelphia.
- Wimersma Greidanus, Tj.B. van & S.G.Th. Hulst, 1975. Inleiding tot de endocrinologie. Stafleu's Wetenschappelijke Uitgeverij, Leiden.

Bronst op bestelling bij landbouwhuisdieren (Th.A.M. Kruij)

- *Austin, C.R. & R.V. Short, 1972. Reproduction in mammals. deel 3 en 4. Cambridge University Press.
- Biologie van de voortplanting: leerstof 2e jaar. 1976. Faculteit Diergeneeskunde, Utrecht.
- Brand, A., A.H. Willemse & F. Muurling, 1968. Synchronisatie, inductie en onderdrukking van de oestrus. *Tijdschr. Diergeneesk.* 93: 261-297.
- *Cole, H.H. & P.T. Cupps. 1969. Reproduction in domestic animals. Academic Press, New York/London.
- Control of sexual cycles in domestic animals. 1975. *Ann. Biol. anim. Biochem. Biophys.* 15 (2): 131-498.
- *Hafez, E.S.E., 1968. Reproduction in farm animals. Lea en Febiger, Philadelphia.
- Karim, S.M.M., 1975. Prostaglandins and reproduction MTP Press Ltd.
- Kruij, Th.A.M., 1973. Een cytochemisch onderzoek van ovarium en endometrium van het Texelse schaap gedurende de oestrische cyclus en na oestrussynchronisatie. Dissertatie Universiteit Utrecht.
- *Lamming, G.E. & E.C. Amoroso, 1967. Reproduction in the female mammal. Butterworths, London.
- Muurling, F., A. Brand & A.H. Willemse, 1968. Oestrus inductie bij schapen in het diepe anoestrusseizoen. *Tijdschr. Diergeneesk.* 93: 261-297.
- Muurling, F., A. Brand & A.H. Willemse, 1969. Oestrus inductie bij Texelse schapen in het vroege anoestrusseizoen. *Tijdschr. Diergeneesk.* 94: 751-757.

- Muurling, F., A.H. Willemse & A. Brand, 1969. Oestrusinductie bij het Texelse schaap in het late oestrusseizoen. *Tijdschr. Diergeneesk.* 94: 246-254.
- Muurling, F., 1971. Oestrische en ovarieële activiteit bij Texelse schapen in Nederland. Dissertatie Universiteit Utrecht.
- Otake, M., T. Kikuma, S. Nomoto, T. Domeki & T. Nakabura, 1975. Oestrus synchronisation of the ewe by subcutaneous injection of prostaglandin-F2 α . *Jap. J. Anim. Reprod.* 20 (4): 132-137.
- *Perry, J.S. & J.W. Rowlands, 1973. The environment and reproduction in mammals and birds. Blackwell Scientific Publications Ltd, Orney Mead, Oxford.
- Pursel, V.G. & E.F. Graham, 1962. Induced estrus in anestrus ewes by use of progestagens and FSH. *J. Anim. Sci.* 21: 132-136.
- Roach, M.J., 1967. Synchronisation of oestrus in Ewes. *Vet. Rec.* 81: 269.
- Roberts E.M. e.a., 1966. The stimulation of fertile oestrus in anoestrus romney ewes. *J. Reprod. Fert.* 12: 565-567.
- Robinson, T.J., 1967. The control of the ovarian cycle in the sheep. Sydney University Press.
- Robinson, T.F., 1968. The synchronization of the oestrous cycle and fertility. *Proc. VI Congr. Intern. Reprod. Anim. Insem. Artif.*, Paris. Vol. II, p. 1347.
- Thwaites, C.J., 1965. Photoperiodic control of breeding activity in the South down ewe with particular reference to the effect of an equatorial light regime. *J. agric. Sci.* 65: 57.
- Willemse, A.H., A. Brand & F. Muurling, 1968. Oestrussynchronisatie bij het Texelse schaap. *Tijdschr. Diergeneesk.* 93: 66-82.
- Willemse, A.H., 1968. Relation between the day of oestrus cycle at the time of the intravaginal application of a MAP-impregnated sponge and synchronisation rate and conception rate in Texel sheep. *Proc. VI Congr. Intern. Reprod. Anim. Insem. Artif.*, Paris. Vol. II, p. 1539.

Hormonen en insectenbestrijding (G.B. Staal)

- Bagley, R.W. & J.C. Bauernfeind, 1972. Field experiences with juvenile hormone mimics. In: J.J. Menn & M. Beroza (Eds): Insect juvenile hormones. Academic Press, New York and London, p. 113-151.
- Beadles, M.L., J.A. Miller, W.F. Chamberlain, J.L. Eschle & R.L. Harris, 1975. The horn fly: Methoprene in drinking water of cattle for control. *J. econ. Entomol.* 68: 781-785.
- Brown, T.M. & A.W.A. Brown, 1974. Experimental induction of resistance to a juvenile hormone mimic. *J. econ. Entomol.* 67: 799-801.
- Bowers, W.S., 1976. Discovery of insect antiallatotropins. In: L.I. Gilbert (Ed.): The juvenile hormones, Plenum Press, p. 394-408.
- Chamberlain, W.F., 1975. Insect growth regulating agents for control of arthropods of medical and veterinary importance. *J. med. Entomol.* 12: 395-400.

- Cupp, E.W. & J. O'Neal, 1975. The morphogenetic effects of two juvenile hormone analogues on larvae of imported fire ants. *Environ. Entomol.* 2: 191-194.
- Degheele, D., M. van de Veire & G.B. Staal, in voorbereiding. The influence of insect growth regulators and insecticides on *Encarsia formosa*.
- Djerassi, C., C. Shih-Coleman & J. Diekman, 1974. Insect control of the future: Operational and policy aspects. *Science N.Y.* 186: 596-607.
- Edwards, J.P., 1975. The effects of a juvenile hormone analogue on laboratory colonies of pharaoh's ant, *Monomorium pharaonis* (L.) (Hymenoptera, Formicidae). *Bull. entomol. Res.* 65: 75-80.
- Green, M.S., 1976. Pesticides boon or bane? Westview Press, Boulder, Colorado, USA, 111 p.
- Hangartner, W.W., M. Suchy, H-K. Wipf & R.C. Zurflueh, 1976. Synthesis and laboratory and field evaluation of a new, highly active and stable insect growth regulator, *J. agrtc. Food Chem.* 24: 169-175.
- Judy, K.J., D.A. Schooley, B.J. Bergot, M.S. Hall, R.C. Jennings & R.G. Troetschler, 1976. *In vitro* studies on insect juvenile hormone structure and biosynthesis. In: Actualités sur les hormones d'invertébrés. *Colloques int. Cent. natn. Rech. scient.* 251: 451-457.
- Knüßli, E., 1975. The future of the development of pesticides by industry. *Pure Appl. Chem.* 42: 77-87.
- Loschiavo, S.R., 1976. Effects of the synthetic insect growth regulators methoprene and hydroprene on survival, development or reproduction of six species of stored-products insects, *J. econ. Entomol.* 69: 395-399.
- McGregor, H.E. & K.J. Kramer, 1975. Activity of insect growth regulators, hydroprene and methoprene, on wheat and corn against several stored-grain insects. *J. econ. Entomol.* 68: 688-690.
- Menn, J.J. & F.M. Pallos, 1975. Development of morphogenetic agents in insect control, *Envir. Letters* 8: 71-88.
- Morgan, P.B., G.C. LaBrecque, D.E. Weidhaas & A. Benton, 1975. The effect of methoprene, an insect growth regulator, on *Musca domestica*. *Can. Entomol.* 107: 413-417.
- Nassar, S., G.B. Staal & N.I. Armanious, 1973. Effects and control potential of insect growth regulators with juvenile hormone activity on the greenbug, *J. econ. Entomol.* 66: 847-850.
- Robbins, W.E., M.J. Thompson, J.A. Svoboda, T.J. Shortino, C.F. Cohen, S.R. Dutky & O.J. Duncan III, 1975. Nonsteroidal secondary and tertiary amines: inhibitors of insect development and metamorphosis and Δ^{24} -sterol reductase system of tobacco hornworm. *Lipids* 10: 353-359.
- Rowlands, D.G., 1976. The uptake and metabolism by stored wheat grains of an insect juvenile hormone and two insect hormone mimics, *J. Stored Prod. Res.* 12: 35-41.
- Safranek, L. & L.M. Riddiford, 1975. The biology of the black larval mutant of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *J. Insect Physiol.* 21: 1931-1938.

- Sehnal, F., 1976. Action of juvenoids on different groups of insects, In: L.I. Gilbert (Ed.): The juvenile hormones. Plenum Press, p. 301-322.
- Slama, K., M. Romanuk & F. Sorn, 1974. Insect hormones and bioanalogs. Springer-Verlag, 447 p.
- Staal, G.B., 1972. Biological activity and bioassay of juvenile hormone analogs. In: J.J. Menn & M. Beroza (Eds): Insect juvenile hormones. Academic Press, New York and London, p. 69-94.
- Staal, G.B., 1975. Insect growth regulators with juvenile hormone activity, *A. Rev. Entomol.* 20: 417-460.
- Staal, G.B., S. Nassar & J.W. Martin, 1973. Control of the citrus mealybug with insect growth regulators with juvenile hormone activity, *J. econ. Entomol.* 66: 851-853.
- Strong, R.G. & J. Diekman, 1973. Comparative effectiveness of fifteen insect growth regulators against several pests of stored products, *J. econ. Entomol.* 68: 1167-1173.
- Troisi, S.J. & L.M. Riddiford, 1974. Juvenile hormone effects on metamorphosis and reproduction of the fire ant, *Solenopsis invicta*. *Envir. Entomol.* 3: 112-116.

Slotbeschouwing (P.J. Gaillard)

- Gaillard, P.J., 1977. Bijschildklierhormoon en beenweefsel. Argumenten ten gunste van een anabole werking onder fysiologische omstandigheden. *Versl. gewone Vergad. Afd. Natuurk. K. ned. Akad. Wet.* 86 (1): 7-10.
- Gaillard, P.J., M.P.M. Herrmann-Erlee & J.W. Hekkelman, 1975. Effects of PTH and some synthetic fragments on embryonic bone 'in vitro'. In: S. Pors Nielsen & E. Hjørting-Hansen (Eds): Calcified tissues. Fadt's Forlag Copenhagen, Århus, Odense. Suppl. Calcified Tissue Research.
- Herrmann-Erlee, M.P.M., J.N.M. Heersche, J.W. Hekkelman, P.J. Gaillard, G.W. Tregear, J.A. Parsons & J.T. Potts Jr., 1976. Effects on bone *in vitro* of bovine parathyroid hormone and synthetic fragments representing residues 1-34, 2-34 and 3-34. *Endocrine Res. Commun.* 3 (1): 21-35.
- Parsons, J.A., 1976. Parathyroid physiology and the skeleton. In: G.H. Bourne (Ed.): Biochemistry and physiology of bone. Vol. IV. Academic Press, New York and London.
- Pietras, R.J. & C.M. Szego, 1977. Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells. *Nature, Lond.* 265: 69-72.

Verklarende woordenlijst

Deze lijst bevat een aantal belangrijke begrippen en afkortingen die in de verschillende hoofdstukken voorkomen. Begrippen die in de tekst uitvoerig worden verklaard zijn niet opgenomen of worden slechts in het kort behandeld. Hiervoor raadplege men het register.

Acceptor Eiwit in de celkern dat hormonen specifiek kan binden, meestal in aansluiting op een eerdere binding aan een receptor.

Acromegalie Vergroving van gelaatstrekken en verbreding van handen en voeten ten gevolge van langdurige verhoging van het groeihormoon-gehalte van het bloed.

ACTH Adrenocorticotroop hormoon. Dit hormoon wordt in de adeno-hypofyse gevormd en zet de interrenale cellen aan tot de vorming van corticosteroïdhormonen (waaronder cortisol).

Adipokinetisch hormoon Een door de corpora cardiaca van insecten afgescheiden hormoon dat zijn metabole werking uitoefent op lipiden in het vetlichaam, waardoor de afgifte van diglyceriden aan de hemo-lymfe versneld wordt.

Anadrome trek Trek van zout naar zoet water.

Ångström (Å) Verouderde maat die niet tot de SI-eenheden behoort. Gebruik nanometer (nm), $1 \text{ Å} = 10^{-1} \text{ nm} = 10^{-10} \text{ m}$.

Apolysis Het proces tijdens de vervelling van geleedpotigen waarbij de oude cuticula loslaat van de onderliggende epidermiscellen.

Atrofie Het dissociëren van de celbestanddelen en het uiteenvallen van weefsels. Het tegendeel van groei.

Autoradiografie Het te onderzoeken weefsel wordt met radioactief gemerkt materiaal geïncubeerd. Waar dit in het weefsel wordt opgenomen kan een reactie op een fotografische plaat worden gekregen.

BP Binding protein; een eiwit dat in staat is gebleken het juveniel hormoon te binden.

CA Corpora allata.

Carrier protein Drager-proteïne, een eiwit dat de eigenschap heeft een hormoon te binden en door de bloedbaan te transporteren.

CC Corpora cardiaca.

CG Cerebraal ganglion.

Chloridecellen Ionentransporterende cellen die in het kieuwepitheel van vissen liggen.

Cortisol Eén van de corticosteroidhormonen die door de interrenale cellen (schorscellen) van de bijnieren worden gevormd (zie ook ACTH).

CSF Cerebrospinaal vocht.

cAMP Cyclisch adenosine 3',5'-monofosfaat speelt een belangrijke rol als schakel tussen de informatie-overbrengende hormonen en de daarvoor te veroorzaken veranderingen in de celstofwisseling, de zogenaamde tweede-boodschapper functie.

DI Diabetes insipidus.

Diurese De afscheiding van urine. Het anti-diuretisch hormoon (ADH = vasopressine) gaat de diurese tegen.

DNA zie nucleïnezuren.

DOC Desoxycorticosteron.

DOPA Dihydroxyfenylalanine.

Ecdysis De vervellingsfase bij geleedpotigen waarin de oude cuticula wordt afgestoten.

Endocrien systeem Het geheel van de elkaar beïnvloedende en samenwerkende hormonen-afscheidende organen.

Euryhalien organisme Organisme dat zich kan handhaven in water van sterk uiteenlopende zoutconcentraties.

Exocytose Het afgeven van stoffen vanuit een granulum binnen een cel door het maken van een opening in de contactplaats tussen granulum en celmembraan, waardoor de inhoud van het granulum zich door diffusie buiten de cel kan verspreiden.

Feedback Terugkoppeling, een regulatieproces waarbij de resulterende factoren teruggrijpen op de oorzaken.

Fotoperiode De duur van de lichtperiode in een bepaald ritme van licht en donker, bijvoorbeeld de daglengte gedurende een etmaal.

FSH Follikel-stimulerend hormoon.

Galleria-toets Een biologische toets voor kwantitatieve bepaling van het juveniel hormoon, die gebruik maakt van de pop van de grote wasmot (*Galleria mellonella* L.).

Germanium Het gedeelte van de ovariolen waarin de deling en differentiatie van oögonien tot oöcyten (en soms tot voedingscellen) plaats heeft.

GRH Gonadotropin releasing hormone.

GTH Gonadotroop hormoon.

'Half life'-waarde De tijd die nodig is voor een hormoon om onder fysiologische omstandigheden voor 50% te worden geïnactiveerd.

Heterotopie transplantatie Transplantatie naar een plaats in het lichaam waar het orgaan zich normaal niet bevindt.

Hormostaat Het veronderstelde regelmechanisme dat op de titer van een hormoon reageert en de synthese- en afbraakmechanismen beheerst, zodat de titer op een constant niveau wordt gehouden.

Hyperglycemisch hormoon Een door de corpora cardiaca van insecten afgescheiden hormoon dat zijn metabole werking heeft op glyco-geen in het vetlichaam, waardoor een verhoogde afgifte van trehalose aan de hemolymfe het gevolg is.

Hypofysair poortadersysteem De haarvaten in het hypofysiotrope gebied van de hypothalamus (eminentia mediana) verzamelen zich in de hypofysesteel en vertakken zich dan nogmaals tot haarvaten in de hypofysevoorkwab (adenohypofyse).

Hypothalamus De ventrale wand van het diëncephalon. Hierin liggen o.m. veel neurosecretorische cellen, die een belangrijk onderdeel vormen van het endocriene systeem.

IGR Insekten-groeiregulatoren.

Incretie Interne secretie.

Interrenale cellen Cellen die corticosteroïdhormonen produceren. Bij beenvissen liggen ze verspreid in het nierweefsel, bij hogere vertebraten vormen ze de schorscellen van de bijnieren (zie ook ACTH).

Interrenale weefsel Weefsel van mesodermale oorsprong, dat corticoïden, veelal bijnierschorshormonen genaamd, produceert.

JH Juveniel hormoon.

Lichaampjes van Stannius Orgaantjes die alleen bij vissen voorkomen en die in of bij de nieren zijn gelegen. Ze ontwikkelen zich uit de nierkanaaltjes.

LH Luteïnisatiehormoon, ook wel luteïniserend hormoon genoemd.

LH-RH Luteïnisatiehormoon 'releasing' hormoon.

LPH Lipotroop hormoon.

LP-1 Een 'high density' lipoproteïne dat instaat is gebleken juveniel hormoon te binden.

MH Een verzamelnaam voor de vervellingshormonen.

Michaelis-constante (K_m) Die concentratie van het substraat waarbij de helft van de maximale activiteit van het betrokken enzym optreedt.

MIF Hormoon dat de MSH-afgifte remt.

Minimum perceptibile Term uit de zintuigfysiologie waarmee wordt aangeduid: de minimale hoeveelheid van een zintuiglijke prikkel waarop het organisme nog reageert.

MNSC Mediale neurosecretorische cellen.

MSH Melanophoren stimulerend hormoon.

Nanometer (nm) 1 nm komt overeen met 10^{-9} m.

Neotenie Het verschijnsel waarbij sexueel volwassen dieren morfologisch nog de kenmerken van larven dragen.

Neuron Schakeleenheid uit het zenuwstelsel. Omvat een cellichaam plus uitlopers (axonen). Bij de overdracht tussen neuronen onderling en van het laatste neuron op een effector op de daartoe bestemde plaats (synaps) wordt gebruik gemaakt van een chemisch signaal, de transmissierstof. (Zie figuur 1 in het hoofdstuk van Joosse.)

Neurosecretorische cellen Neuronen die hun secretieproducten (neurohormonen) aan het bloed afgeven.

Neurosecretorisch systeem Het geheel van neurosecretorische celtgroepen, hun axonen (al dan niet verenigd tot een tractus) en het aan een bloedvat grenzend weefsel, het neurohemale gebied of orgaan.

Nucleïnezuren DNA (desoxyribonucleïnezuur) komt meestal voor in een dubbelstrengsvorm (uitzonderingen worden gevonden bij bepaalde bacteriële virussen waar het DNA uit slechts één streng bestaat). Elk van de DNA-strengen is opgebouwd uit een groot aantal nucleotiden, bestaande uit een stikstofbase, een suiker (desoxyribose) en een fosfaatgroep. De genetische informatie is in het DNA vastgelegd door de nucleotidenvolgorde. De nucleotiden verschillen onderling alleen in de stikstofbase; in DNA komen in hoofdzaak vier verschillende basen voor: adenine (A), guanine (G), cytosine (C) en thymine (T). De twee strengen zijn complementair aan elkaar, hetgeen wil zeggen dat tegenover een A in de ene streng, een T in de andere streng staat, en tegenover een C een G. Bij prokaryoten komt het DNA voor als een vrijwel naakte dubbelhelix met een diameter van ca. 2 nm; bij eukaryoten is de DNA draad veel dikker, doordat hij is omgeven met eiwitten en mogelijk ook met RNA en bovendien nog extra is gespiraliseerd tot een superhelix. Het wordt dan de 'elementaire fibril' genoemd en heeft een diameter van 15-20 nm. RNA (ribosenucleïnezuur) verschilt van DNA in de volgende opzichten:

- Het bestaat (meestal) uit één streng.
 - De suiker in het nucleotide is ribose.
 - In plaats van thymine vinden we in RNA uracil.
 - Als regel is het een korter molekuul dan de meeste DNA-molekulen.
- In de cel zijn tenminste 3 soorten RNA geïdentificeerd:
- Messenger (boodschapper-)RNA (mRNA). Wordt tijdens de transcriptie als een complementaire streng op één van de twee strengen van het DNA gesynthetiseerd. Zorgt voor de overdracht van de genetische informatie naar het cytoplasma.
 - Ribosomaal RNA (rRNA). Bestanddeel van de ribosomen. In elk ribosoom komen 3 verschillende ribosomale RNA-molekulen voor.
 - Transport-RNA (tRNA). Zorgt tijdens het translatieproces voor binding van aminozuren aan het ribosoom-mRNA-complex.

Oestradiol Het hormoon dat het bronstgedrag opwekt en afhankelijk van de concentratie progesteron een extra afgifte van het luteïnisatiehormoon en daarmee een ovulatie induceert. In combinatie met andere hormonen doet oestradiol de uteruswand groeien.

Oöcyt Eicel die zich via oögenese tot ei (ovum) ontwikkelt.

Oögenese Eivorming; het proces dat via de vorming van oöcyten tot de vorming van het volledige ei leidt.

Oögoniën De oer geslachtscellen in het ovarium die na deling de oöcyten leveren.

Oölemma De membraan die de eicel omgeeft.

Oösorptie De desintegratie van het zich ontwikkelende ei, waaruit door het organisme vervolgens de bestanddelen weer in de bloedbaan worden opgenomen.

PGF 2 α Prostaglandine F 2 α .

Picomol (pmol) 1 picomol komt overeen met 10^{-12} mol.

PK Prothoracale klieren.

PMSG Pregnant Mare Serum Gonadotrophin.

Polytrofe ovariolen Ovariolen waarbij zich in het vitellarium niet alleen eifollikels maar bovendien voedingscellen (trofocyten) bevinden.

Precursor Verbinding die als voorloper fungeert bij de vorming van een specifiek produkt. Bijvoorbeeld bij de omzetting $A \rightarrow B \rightarrow C$ is A de precursor van B, en B de precursor van C.

PTH Parathyreoïdhormoon.

Puff Plaats op het chromosoom, herkenbaar aan een lokale verdikking, die zich in een actieve RNA-synthese-fase bevindt.

Pycnose Het samenballen van het chromatine gedurende atrofie van de cel.

Receptor Eiwit met een hoge specificiteit en een hoge affiniteit voor binding van bepaalde hormonen. Receptoren voor steroidhormonen komen voor in de kern en het cytoplasma van de cel. Receptoren voor eiwithormonen komen voor in de celmembraan.

Releasing hormone Hormoon uit de hypothalamus dat de afgifte van een hormoon uit de adenohipofyse bevordert.

RNA Zie nucleïnezuren.

Stroma Grondsubstantie van een orgaan.

Telotrofe ovariolen Ovariolen waarbij de voedingscellen in het germaarium blijven en van daaruit de oöcyten van bouwstoffen voorzien.

Testiculaire feminisatie Het geërfd onvermogen van testosteron-doelwit-cellen om testosteron op te vangen of te verwerken. Lijders aan dit syndroom hebben een vrouwelijke lichaamsbouw; zij bezitten echter testikels terwijl ovarium en baarmoeder ontbreken.

Transcriptie Het overzetten van de DNA-code in een RNA-code. Het gevormde mRNA wordt naar het cytoplasma getransporteerd waar de translatie plaatsvindt. Het omgekeerde proces, het overzetten van de RNA-code in een DNA-code, wordt 'reversed transcriptie' genoemd.

Translatie Het vertalen van de genetische informatie van het mRNA in de aminozuurvolgorde van eiwitten via het RNA-ribosoom-complex.

TRH Thyreotroop hormoon 'releasing' hormoon.

Trofocyten Voedingscellen die gedurende de oögenese bestanddelen aan de oöcyt toevoeren.

Urofyse Een neurohemaal orgaantje, dat bij vissen in het caudale einde van het ruggemerg gelegen is. De hierin gelegen neurosecretorische cellen produceren stoffen, die bekend staan als urotensinen.

Vasotocine Een hormoon dat in de hypothalamus wordt gevormd en afgegeven wordt in de neurohypofyse van vertebraten, uitgezonderd de zoogdieren. Deze laatste vormen vasopressine (ADH) in plaats van vasotocine (zie ook diurese).

Vitellarium Het gedeelte van de ovariolen waar de oöcyt door follikelcellen is omgeven en waar de opbouw van het dooierplasma plaats heeft.

Vitellinisolatie Het deelproces van de oögenese waarbij de eicel van dooier (vitellus) wordt voorzien.

Vitellogenese Dooiervorming.

VVR Voorwaardelijke vluchtreactie.

Yin Yang principe Naast het cAMP is het cyclisch guanosinemonofosfaat (cGMP) in het cytoplasma aanwezig. Beide cyclische nucleotiden hebben soms een antagonistische werking, die in het symbool van het Koreaanse dualisme wordt weergegeven.

3 β 3 β – hydroxy-dehydrogenase.

11 β 11 β – hydroxylase.

21 21 – hydroxylase.

Register

- actief transport 97
- actiepotentiaal 8, 16–18, 29
- actinomycine 118, 135
- adenohypofysaire hormonen 180, 217
- adenohypofyse 44–60, 179, 213, 217
- adenosinetrifosfaat (ATP) 95–103, 110, 131
- adenylcyclase 49, 95 e.v., 106, 110, 131, 262, 263
- adipokinetisch hormoon 39, 145–148, 261
- adrenaline 40, 62, 110
- adrenocorticotroop hormoon (ACTH) 76, 179–193, 203 e.v., 261, 266
- Aedes aegypti* 166 e.v., 244, 258
- agarose 97
- aldosteron 112, 201, 203
- alles-of-niets-principe 81
- α -amanitine 118
- aminozuren 93
- anadroom 43
- androgenen 61, 115, 116, 125, 204, 205
- androsteendion 61
- anoestrusseizoen 211 e.v., 229, 233
- anti-diuretisch effect 76
- antilichamen 190, 191
- apolysis 127, 134
- associatieconstante 116, 117
- ATPasen 70, 74
- autoradiografie 117
- avidine 115
- axon 16–18, 20, 29, 33, 34, 40, 57
- bag cells 39
- basaal labrynt 70–75
- binding protein 140
- bivalente ionen 68
- black molly 48, 51, 54
- Bombyx mori* 131, 154, 165, 251
- botvorming 108, 109, 263 e.v.
- botweefsel 99, 108 e.v., 263 e.v.
- brain hormone 128
- brons 207 e.v.
- inductie 229, 233
- stille – 220, 229
- synchronisatie 221 e.v., 228, 229
- bijschildklier 262 e.v.
- bijschildklierhormoon 93, 262
- bijniermerg 39, 40
- bijnierschors 179–190, 201
- calcitonine 62, 106
- calciumhuishouding 93
- calciumionen 29, 100, 105–107
- calciumionofoor 107
- calciumtransportremmers 107
- cauterisatie 31
- celmembranen 96, 97
- celtypen
- acidofiele – 46 e.v.
- basofiele – 46 e.v.
- cerebrale ganglia 21, 35, 126, 128 e.v., 155, 156, 165, 166
- cerebrale neurosecretie 177
- cerebrale neurosecretorische cellen 130, 145 e.v., 155 e.v., 164 e.v.
- cerebrospinaal vocht 193
- chiasma opticum 56
- Chironomus* 135, 137, 143
- chloridecellen 68, 76
- cholesterol 61, 132, 201 e.v., 238
- choriongonadotropine 49
- chromatine 119–124

chromatoforen 28, 30
 chromaffine-weefsel 39
 circadiane ritme 90
 circannuel ritme 91
 Coloradokever 29, 151 e.v.
 configuratie-veranderingen 111
 corpora allata 129 e.v., 156, 157,
 163-177, 242, 252 e.v.
 corpora cardiaca 21, 23, 131 e.v., 145,
 156 e.v., 260
 corpus luteum 60, 62, 214 e.v., 223-
 232
 corticosteroiden 68, 115
 corticosteron 202
 corticotroop hormoon 47
 cortisol 66, 76, 112, 201 e.v.
 cuticula 126, 127, 134, 141
 cyclisch adenosinemonofosfaat (cAMP)
 13, 95-111, 124, 131, 261-263
 cyclisch guanosinemonofosfaat (cGMP)
 100-110, 124
 cyclisch-nucleotide fosfodiësterasen
 100, 106
 cytosolfractie 116, 117

dehydro-epiandrosteron 61
 de-repressie van genen 136
 desoxycorticosteron 60, 202 e.v.
 diabetes insipidus 192
 diapauze 152, 168-177, 237, 253
 dihydroxyfenylalanine (DOPA) 135
 dioestrus 216
 DNA 113, 114, 119, 120, 123, 131,
 135
 -synthese 131
 doelwit-cellen 8 e.v., 16 e.v., 33 e.v.,
 95 e.v., 110, 198, 259
 doelwit-organen 12, 17, 32-36, 41,
 112-116
 doelwit-weefsels 95, 99, 262, 266
 dooiergranula 58
 dooiervorming 77
 dopamine 135
 dorsaallichaampje 36
 drempelwaarde 81-85, 90

ecdysis 127
 ecdyson 112-114, 129 e.v., 143, 165
 e.v., 260

ecdysteron 133
 ectoderm 45
 endogeen 117
 endogeen ritme 91
 endogene factor 87, 89, 216
 epidermis 126, 134
 erythrosine 47
 euryhalien 43
 exocytose 29
 exogene factoren 216
 exoskelet 126, 237
 extirperen 14

female protein 161
 feromonen 63
 final common pathway 37
 follikel 58-61, 85
 follikel-stimulerend hormoon 48,
 85, 86, 213-217
 forel 43, 55-57, 60, 75
 fosfodiësterase 100-107, 131
 fosforylasekinase-kinase 104
 fosforylatie 103-105, 111
 fotoperioden 85-87, 90, 153

gametogenese 48
 gedrag 178-194
 appetitief - 187 e.v.
 passief vermijdings- 188-192
 voorwaardelijk vlucht- 180 e.v.
 genitaaltractus 217, 219, 220
 genoom 12, 114
 germarium 158
 globuli 51
 globuline 116
 glomerulus 69
 glucagon 102, 103, 109
 glycogeensynthetase 104
 glycogenolyse 103-109
 gonadotroop hormoon 47-52, 57,
 60, 62, 85, 196, 213-217, 228-
 230
 - 'releasing hormone' 222
 gonadotrope cellen 48 e.v., 85
 gonadotropine 48-51, 60, 112
 gonadotropin releasing hormone 57
 goudvis 49, 51, 54, 56, 60, 62, 75
 granula 27-32, 46, 53-57, 74, 148,
 149

granulosa 58, 60, 62, 77
groeihormoon 47
guanosinetrifosfaat 100
guppy 51, 62

harder 43, 44, 49, 61
hemolymfe 129, 133
hepatomacellen 115
heterotopie transplantatie 52
high density lipoprotein 139, 140
histonen 103, 111
homeostasis 150, 178, 197, 205
hormoon
 -antagonisten 252 e.v.
 chemische aard van - 12, 13, 28,
 93 e.v., 112 e.v.
 -fragmenten 93, 107-109
 produktiehoeveelheid van - 198
 -receptor-complex 96-98, 113,
 139

hormoonstaat 171-176

Hyalophora cecropia 138, 161

hydrominerale regulatie 75

3 β -hydroxy-dehydrogenase 202 e.v.

11 β -hydroxylase 202 e.v.

21-hydroxylase 202 e.v.

17 α -hydroxypregnenolon 61

hyperglycemisch hormoon 145 e.v.,
261

hypertonisch 67

hypocalcine 76

hypofyse 21, 34, 36, 45-62, 68, 75,
76, 85, 178 e.v., 195, 213 e.v.,
261

 -achterkwab 21, 184

 -voorkwab 28, 34, 36

hypothalamo-hypofysaire systeem
24

hypothalamus 21, 34, 36, 52-58, 73,
85, 179 e.v., 195, 209, 213 e.v.
 - neurohypofysesysteem 44, 52
 e.v.

hypotoon 67, 70

imaginale schijven 128

immunofluorescentie 51

induced protein 118

insektenregulatoren 236, 239 e.v.

insuline 93, 100, 102
interstitiële cellen 62, 77
intervasculaire kanalen 52
intervasculaire vloeistof 53
intracellulair niveau 113
intracellulaire concentratie 107
intracellulaire receptoren 116

juveniel hormoon (JH) 129-145,
157, 161-177, 235 e.v., 251 e.v.
afbraakmechanismen van - 140,
141, 173, 174
 - anagola 241, 243, 246, 249,
 251-257
 - antagonisten 252-257
anti- - 238, 255-257
bindingsvormen van - 139
 - receptoren 240
 - titer 129 e.v., 171 e.v.
 - typen 171, 240
werkingsmodel van - 142

kakkerlak 146 e.v.

karper 43, 49, 51, 60

kasinsekten 248, 249

kernporiën 70

11-ketotestosteron 61

kinopreen 236, 240, 248

kortedag 79 e.v., 87, 153 e.v., 163-
176

kunstmatige inseminatie 221, 224,
231, 232

langedag 79 e.v., 87, 153 e.v., 163-
175

Leptinotarsa decemlineata 151 e.v.

Leydig-cellen 77, 85

lichaampjes van Stannius 76

limbisch systeem 187, 189, 193

lipidedubbellaag 96

lipotroop hormoon 183 e.v., 261

Locusta migratoria 39, 143 e.v., 164,
254

luteïniserendhormoon 48, 85, 86, 209-
230

 - 'releasing hormoon' 57, 193

lysosomen 124

- magnesiumionen 100
Manduca sexta 131, 136--140, 164, 255 e.v.
 mediane neurosecretorische cellen 149, 155, 156, 164, 166, 170
 melanoforen-stimulerend hormoon (MSH) 48, 181 e.v., 261
 - afgifte remmend hormoon 193
 melatonine 62
 membraanpermeabiliteit 97, 98
 methopreen 240, 244 e.v., 258
 Michaelis-constante 101, 173
 microtubuli 28
 milieu-invloeden 151 e.v.
 moulting fluid 127
- nefronen 69-74
 negatieve terugkoppeling 38
 neuro-endocriene integratie 9-11
 37-39, 150
 neurohemale gebied 20-26, 31, 35
 neurohemale organen 20, 34 e.v., 40
 neurohemale uiteinden 20, 28, 29, 34 e.v.
 neurohypofysaire hormonen 180
 neurohypofyse 21, 28, 44-62, 260
 neuron 8, 16, 38
 neuropeptiden 178 e.v.
 neurosecretie 18-41
 perifere - 22-26, 33, 39
 neurosecretomotorische innervatie 33, 34
 neurosecretorische banen 20
 neurosecretorische systemen 20
 neurosecretorische zenuwvezels 53 e.v., 57
 neurotransmitter 17 e.v.
 nierepithel 77
 nonhiston-eiwitfractie 122, 123
 noradrenaline 40
 nucleus lateralis tuberis 55, 56, 57
 nucleus preopticus 55, 56
- oestradiol 112-119, 201, 209, 214, 215, 230, 260
 -17 β 61, 217 e.v., 232, 260
 oestrogenen 61, 113 e.v., 121, 221, 259
- oestron 61, 201
 oestrus 207
 -cvclus 215 e.v.
 -seizoen 211 e.v.
 oöcyten 58, 61, 62, 158, 159
 oögenese 158 e.v., 162 e.v.
 oögoniën 58, 77
 osmotische waarde 67
 ovalbumine 115, 119 e.v.
 - mRNA 120
 ovariole 158, 159
 ovarium 52, 58-62, 77, 217 e.v.
 - van beenvissen 58 e.v.
 geslachtshormonen uit het - 217 e.v.
 oviduct 126
 ovulatie 208 e.v., 218 e.v.
 oxytocine 28, 260
- paalspringtest 185, 187
 parathyreoïdhormoon (PTH) 93, 98, 99, 262, 106 e.v., 262-267
 peptidase 94
 perifere endocriene klieren 44, 45
 perifere neurosecretie 22-26, 33, 39, 41
 perikarya 56
 perivasculaire ruimte 53, 54
 pil 195, 196
 piperonylbutoxide 256, 257
 plasmamembraan 96
 plexus 52, 53
 polymorfisme 128
 portale vaten (systeem) 33, 34, 179
 postcerebrale complex 156
 precocenen 254
 pregnant mare serum gonadotrophin (PMSG) 221, 230, 231
 pregnenolon 61, 202, 203
 primitieve neurosecretie 33
 primum movens 154 e.v.
 progestativa 221, 222 e.v., 228, 231
 progesteron 60, 112 e.v., 122, 201 e.v., 214 e.v.
 prohormoon 94
 prolactine 47, 66-76, 213
 prostaglandine F 2x 62, 214 e.v., 228 e.v.

- proteïnaire hormonen 259 e.v., 266, 267
 proteïnefosfatasen 105
 proteïnekinase 95, 103 e.v., 110
 prothoracale klieren 36, 128 e.v.
 prothoracotroop hormoon 128 e.v., 145
 pseudohermafroditisme 199, 203–205
 pubertas praecox 204
 pseudo – 204, 205
 puff 13, 113, 135, 137, 143
 puromycine 135

 radio-immuno-assay 136
 receptorpartikels 106
 reversed transcriptase 119
Rhodnius prolixus 31, 129, 131, 134, 162 e.v.
 ribosomen 114
 rifampicine 121
 RNA 70, 114 e.v., 135, 159
 mRNA 113–124, 136
 rRNA 118 e.v.
 tRNA 118
 – synthese 103, 111, 118 e.v., 131
 – polymerase 118 e.v.
 ruw endoplasmatisch reticulum 28, 74

 sarcosomen 169, 176
 schildklierhormoon 62, 66
 sclerotisatie 126, 135
 secretory protein 262, 263
 sedimentatiecoëfficiënt 116
 seizoen 76, 154
 selectiviteit 235, 236, 239, 245, 249
 serine 103
 shuttlebox 180, 185, 192
 signaalwaarde 151
 sinusklieren 20
 spermatogenese 48, 77, 85
 steroïden 12, 61, 62, 112 e.v., 189 e.v.
 steroïdhormonen 12, 95, 112 e.v., 201 e.v., 259 e.v.
 steroïd-receptor-complex 114, 117
 stress 180, 187, 189, 194
 stroma 77
 subfertiliteit 225

 substitutie-therapie 197
 suikerziekte 195
 synaptische membraanfractie 105
 synaptische spleet 17
 systeem van Müller 200
 systeem van Wolff 200

 tabakspijlstaart 131, 136, 138, 140, 164, 255 e.v.
 terugkoppeling 36, 37–40, 170
 testiculaire feminisatie 125, 198, 199
 testis 48–52, 77, 170
 testosteron 61, 74, 112, 113, 198 e.v.
 theca 58, 62, 217, 218
 thyreotroop hormoon 50, 62, 66, 193
 – ‘releasing hormoon’ 193
 thyreotropine 47
 thyroxine 66, 67
 transcriptie 113, 114, 119, 120, 123, 135
 translatie 113, 114
 translokatie 122
 transmitters 9, 10, 17, 39, 40
 transportpartikels 106
 trehalose 146, 147
 tse-tse-vlieg 145
 tumoren 125
 tweede boodschapper 13, 99, 106, 110, 111, 124

 ureter 69, 74
 urofyse 22, 76

 vasopressine 28, 179, 184 e.v., 260
 vasotocine 76
 vervellingshormonen 237, 241
 anti – 238, 241
 vitellogenese 58 e.v., 159 e.v.
 endogene – 58
 exogene – 58
 vitellogenie 115, 160 e.v.
 voorraadsinsekten 247 e.v.

 witte vlieg 248, 249

Ying Yang-principe 102

zebravis 50, 60-62

zeitgebers 90

zoogdiergonadotropine 48

zijderups 131, 154, 165, 251

Errata bij J. Lever en J. de Wilde (redactie): Endocrinologie, Pudoc, Wageningen, 1978.
Toevoeging op p. 278.

Functie van hormonen bij ontwikkeling en stofwisseling van insecten
(A.M.Th. Beenackers)

- Beenackers, A.M.Th., 1969. The influence of corpus allatum and corpus cardiacum on lipid metabolism in *Locusta migratoria*. *Gen. comp. Endocrinol.* 13: 12.
- Bollenbacher, W.E., W.V. Vedeckis & L.I. Gilbert, 1975. Ecdysone titers and prothoracic gland activity during the larval-pupal development of *Manduca sexta*. *Dev. Biol.* 44: 46-53.
- Gäde, G. & D.A. Holwerda, 1976. Involvement of adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate in lipid mobilization in *Locusta migratoria*. *Insect Biochem.* 6: 535-540.
- *Gilbert, L.I. & D.S. King, 1973. Physiology of growth and development: Endocrine aspects. In: M. Rockstein (Ed.): The physiology of insecta. Academic Press, New York-London, Vol. 1, p. 249-370.
- Gilbert, L.I., W. Goodman & J. Nowock, 1976. The possible roles of binding proteins in juvenile hormone metabolism and action. Colloques internationaux C.N.R.S. no. 251. Actualités sur les hormones d'invertébrés, p. 413-434.
- Holwerda, D.A., J.M. van Doorn & A.M.Th. Beenackers, 1977. Characterization of the adipokinetic and hyperglycemic substances from the locust corpus cardiacum. *Insect Biochem.* 8: 151-157.
- Houben, N.M.D., 1976. Regulatie van substraattransport tijdens vlucht in de sprinkhaan, *Locusta migratoria*. Proefschrift, Utrecht.
- Karlson, P., 1963. New concepts on the mode of action of hormones. *Perspect. Biol. Med.* 6: 203-214.
- *Karlson, P., 1974. Mode of action of ecdysones. In: W.J. Burdette, (Ed.): Invertebrate endocrinology and hormonal heterophyly. Springer Verlag, Berlin, p. 43-54.
- Kroege, H. & M. Lezzi, 1966. Regulation of gene action in insect development. *A. Rev. Ent.* 11: 1-22.
- Mayer, R.J. & D.J. Candy, 1969. Control of hemolymph lipid concentration during locust flight: an adipokinetic hormone from the corpora cardiaca. *J. Insect Physiol.* 15: 611-620.
- Rademakers, L.H.P.M., 1977. Neuroendocrine system and release of adipokinetic hormone from the corpora cardiaca of the migratory locust. Proefschrift, Utrecht.
- Röller, H., K.H. Dahm, C.C. Sweeley & B.M. Trost, 1967. The structure of the juvenile hormone. *Angew. Chem. int. Ed. Eng.* 6: 179-180.
- Steele, J.E., 1961. Occurrence of a hyperglycemic factor in the corpus cardiacum of an insect. *Nature, Lond.* 192: 680-681.
- *Wigglesworth, V.B., 1954. The physiology of insect metamorphosis. Cambridge University Press.
- Williams, C.M. & F.C. Kafatos, 1971. Theoretical aspects of the action of juvenile hormone. *Mitt. schweiz. ent. Ges.* 44: 151-162.