



Onderzoeken betreffende de ovogenese der Dytiscidae

<https://hdl.handle.net/1874/274100>

A 192

ONDERZOEKINGEN BETREFFENDE
DE OVOGENESE DER DYTISCIDAE.



Diss.
Utrecht

1921

A. M. FREDERIKSE.

Diss. Utrecht 1921

ONDERZOEKINGEN BETREFFENDE DE OVOGENESE DER DYTISCIDAE.

PROEFSCHRIFT TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD
VAN **DOCTOR IN DE GENEESKUNDE** AAN
DE RIJKS-UNIVERSITEIT TE UTRECHT, OP GEZAG
VAN DEN RECTOR MAGNIFICUS DR. W. VOGELSANG,
HOOGLEERAAR IN DE FACULTEIT DER LETTEREN
EN WIJSBEGEERTE, VOLGENS BESLUIT VAN DEN
SENAAT DER UNIVERSITEIT TEGEN DE BEDENKINGEN
VAN DE FACULTEIT DER GENEESKUNDE TE VER-
DEDIGEN, OP 28 JUNI 1921, DES NAMIDDAGS TE
5 UUR, DOOR

ABRAHAM MARIUS FREDERIKSE, ARTS,
GEBOREN TE AMERSFOORT.



*Aan de nagedachtenis van
mijn moeder.*

Aan mijn vader.

Aan mijn vrouw en kinderen.

Hoewel reeds meerdere jaren in de praktijk werkzaam, is het mij een behoefte U, Hoogleeraren en Lectoren der Medische en Philosophische faculteiten, dank te zeggen voor het genoten onderwijs.

In het bijzonder dank ik U, Hooggeleerde Boeke, Hooggeachte Promotor, dat U mij, hoewel geen leerling van U, zoo groote mate van zelfstandigheid liet bij de bewerking van dit proefschrift. Uw vriendelijke tegemoetkomendheid zal ik steeds dankbaar blijven gedenken.

Hooggeleerde PEKELHARING, hoewel gij thans niet meer het onderwijs dient, moet ik U speciaal mijn dank betuigen.

De drie jaren, gedurende welke ik mij gedeeltelijk aan de histologie kon wijden, waren verreweg de aangenaamste van mijn studie. Nog dikwijls gedenk ik Uw persoon en Uw leiding, nu ik in mijn tegenwoordige woonplaats van bijna allen wetenschappelijken omgang verstoken ben.

Ook U, Klinische Hoogleeraren der Leidsche Universiteit breng ik mijn dank voor hetgeen gij voor mijn practische vorming als arts hebt gedaan.

Zeergeleerde VAN HERWERDEN, U geldt mijn dankbaarheid voor de onvermoeide toewijding, mij tijdens mijn studie en nog na dien betoond. Aan U heb ik grootendeels te danken, dat het mij nu mogelijk is geweest, hier mijn proefschrift te bewerken.

Ook is het hier de plaats te wijzen op de groote verplichting, welke ik heb aan den Heer G. L. PAPE, Hoofd der School te Drogteropslagen; hij toch heeft mij door zijn groote activiteit bijna al mijn materiaal verschaft en mij daardoor dit onderzoek mogelijk gemaakt.

Ten slotte dank ik mijn vrouw, voor haar aandeel aan de verwerking van mijn materiaal, wanneer de praktijk mij geheel in beslag nam.

INHOUD.

INLEIDING.

LITTERATUUROVERZICHT.

EIWITREACTIES.

OPLOSBAARHEIDSREACTIES.

MICROCHEMISCHE REACTIES OP IJZER EN PHOSPHOR.

FERMENTREACTIES.

MORPHOLOGISCH ONDERZOEK.

DE BETEKENIS VAN DEN RING VAN GIARDINA.

DE MITOCHONDRIËN.

INLEIDING.

De Ovogenese van *Dytiscus* heeft in de litteratuur zeer de aandacht getrokken en dit is ook niet te verwonderen, daar wij hier te doen hebben met een kerndeeling, welke veelal als een „erbungleiche” kerndeeling in den zin van Weismann is opgevat. Van deze zijn nog slechts weinige voorbeelden bekend; ik noem hier de diminutiedeelingen, zooals in de embryogenese van *Ascaris* en *Miastor*, de bij verschillende spermat- en ovogenesen bekende heterochromosomen en de spermatogenese bij de Aphiden en enkele Hymenoptera.

Zijn van verschillende dieren „kiembaan bepalende” stoffen bekend, dan zijn deze vrijwel uitsluitend aangetoond in de vroegste stadia van de embryogenese (*Cyclops*, *Polyphemus*, *Chironomus*, *Sagitta*, *Lithomastix*, enz.). Het eenigste geval, waar mij nog een dergelijke kerndeeling in de ovogenese bekend is, is dat bij *Deilephila euphorbiae*¹⁾.

Ter oriëntering in de ovogenese der *Dytiscidae* diene het volgende:

Het ovarium is opgebouwd uit een bundel eibuizen. Aan het centrale einde, waar de daar dunne eibuis overgaat in den einddraad is de buis opgevuld met ronde, aan elkaar gelijke cellen (geslachtscellen), en met enkele cellen gelijkwaardig aan die van den einddraad. Dit gedeelte noemt men de eindkamer. Dit is de multiplicatie-zône. Aan het einde van deze zône nemen de cellen wat in grootte toe. Dan treedt bij een mitose de ring van Giardina op, welke in de aequatoriaalplaat de chromosomen omgeeft en slechts één der dochtercellen wordt toegewezen. De uit de oorspronkelijke cel aan het einde der multiplicatie-zône ontstane cellen blijven in één groep vereenigd. Daar viermaal mitose plaats heeft en de ring telkens aan een volgende dochtercel

¹⁾ KURT SCHNEIDER. Die Entwicklung des Eierstockes und Eier von *Deilephila euphorbiae*. Arch-f. Zellforschung. Bd. 14, 1917.

wordt toegewezen; is het eind-resultaat één cel, welke de ring bevat, de toekomstige eicel, en 15 cellen zonder dit lichaam, de voedstercellen. Dit alles geschiedt in de differentiatie-zône.

Voor al na atloop van dit differentiatie-proces heeft een sterke volume-toename plaats, het sterkst in de eicel: de groei-zône.

Dit is zeer in 't kort de gang van zaken bij de differentiatie van de eicel der Dytiscidae. Voor verdere finesses wordt naar het litteratuur-overzicht en het morphologische deel van mijn eigen onderzoek verwezen.

Wanneer men de litteratuur nagaat, welke bestaat over de „keimbahnbestimmende Substanzen”, dan blijkt, dat op dit gebied vrijwel uitsluitend morphologisch werk is verricht.

Behoudens eenige uitzonderingen, zoo b.v. Amma, die de uitwerking van O_2 en CO_2 naging op de korrels, welke bij de mitose van de oerkiemcellen optreden bij de ontwikkeling der Copepoden.

Zijn onderzoek naar den aard dezer korrels met behulp der fermentreacties faalde echter.

Ook wat betreft het onderzoek van de, de kiembaan bepalende substantie bij de Dytiscidae is men op morphologisch terrein gebleven; de eenige uitzondering is met een paar reacties, Giardina. De verschillende onderzoekers verrichtten allen een vrijwel zuiver morphologisch onderzoek, doch laschten aan het einde van hun publicaties een of meer hypothesen in, omtrent aard en functie der lichaampjes in kwestie; hierbij bepaalden zij zich er echter toe hun conclusies te trekken uit hun morphologisch werk, zonder door experimenteel of chemisch onderzoek hun uitkomsten te toetsen.

Wel trekken de meesten een conclusie omtrent de chemische samenstelling uit het al of niet kleuren der substanties in kwestie met een bepaalde kleurstof, iets wat bij onze tegenwoordige kennis der kleurmethoden ten zeerste verwerpelijk moet worden geacht.

Litteratuur-overzicht.

Voor de volledigheid begin ik met de vermelding van het onderzoek van L. Will: „Die Entstehung des Eies von *Colymbetes fuscus* L.”¹⁾. Deze was n.l. de eerste, welke caryocinesen in de eindkamer waarnam. Ook nam hij de differentiatie der voedstercellen uit de oogoniën waar.

De wijze, waarop deze plaats had volgens Will, was er eene, welke men toen meer meende aan te treffen, doch waarover heden ten dage andere opvattingen heerschen.

Will meende n.l., dat de voedstercellen door knopvorming uit oogoniën ontstaan en dat ook de kernen der voedstercellen door knopvorming uit de eicelkernen zouden worden gevormd. Verder meende hij nog te hebben waargenomen, dat uit de oogoniën het kernvocht verdween en de kern in een homogene chromatine massa werd veranderd.

A. Giardina: „Origine dell' oocite e delle cellule nutritive nel *Dytiscus*,”²⁾ was de eerste onderzoeker, welke de voornaamste feiten, die aan de differentiatie der ei- en voedstercellen bij de Dytiscidae ten grondslag liggen, juist waarnam. Hij beschreef de vorming van de 15 voedstercellen en 1 eicel door 4 opeenvolgende mitosen. In de prophase van de eerste differentieele mitose treedt naast de 40 chromosomen, normaal aantal, een chromatische ring op; deze komt dan ten slotte in de eicel terecht.

Wat den oorsprong van den chromatischen ring aangaat, komt Giardina tot conclusies, welke de individualiteits hypothese der chromosomen zouden omverwerpen. Hij meent, dat de chromatine, welke eerst gelijkmatig over het achromatische netwerk verspreid was, zich in twee gedeelten scheidt.

Het eene gedeelte is een korrelige massa, welke den chromatischen ring gaat vormen, het andere vormt de 40 chromosomen.

¹⁾ Z. f. Wiss. Zoöl. Vol. 43. 1886.

²⁾ Internat. Monatschrift f. Anat. u. Physiol. Vol. 18, 1901.

Deze auteur ziet hierin een bewijs tegen de individualiteitstheorie, daar hij aanneemt, dat een bepaald aantal chromosomen den chromatischen ring hebben gevormd.

Om den aard der substantie van den chromatischen ring na te gaan heeft Giardina op eenige wijzen hierop gereageerd.

De verschillende reacties met kleurstoffen kunnen we hier veilig buiten beschouwing laten, daar deze geen bewijzende kracht hebben; alleen is het de moeite waard te vermelden, dat als algemeene eigenschap de ring zich met dezelfde kleurstoffen kleurt als de chromatine.

Van meer belang is het feit, dat de reactie van Millon in de kern negatief uitviel, verder, dat de inhoud der kern met artificieele digestie niet kon worden opgelost en dat ten slotte de kern in zoutzuur niet oploste.

Paul Debaissieux: „Les débuts de l'ovogénèse dans le *Dytiscus marginalis*,” ¹⁾ neemt bij de multiplicatie-deelingen in de prophase een „masse extrachromosomique achromatique” waar, naast de chromosomen.

Hij constateert, dat hij twee feiten heeft waargenomen, welke Giardina niet vermeldt, n.l. de „masse extrachromosomique achromatique” en „le corps très chromatique”, welke gedurende de mitose blijft bestaan. Debaissieux vraagt zich dan af, of er misschien verband tusschen deze beide lichamen bestaat. Zooals bij het onderzoek der eerste differentiatie-deelingen bleek, werd dit verband gevonden.

Wat den gang der differentiatie-deelingen betreft, is Debaissieux het geheel met Giardina eens. Ook hij vindt 40 chromosomen en hetzelfde verloop van de differentiatie-deelingen en het ontstaan der voedstercellen, zooals Giardina heeft beschreven. Bij de differentiatie-deeling blijkt nu, dat niet het geheele kernnetwerk aan de vorming der chromosomen besteed wordt. Uit de zeer onregelmatige stukken netwerk, die achterblijven, als de chromosomen gevormd zijn en die zich met protoplasmakleurstoffen kleuren, gaat zich de „substance achromatique extrachromosomique” vormen en hieruit ontstaat de „masse chromatique”.

¹⁾ La Cellule. Tome XXV, 1909.

Op grond hiervan bestrijdt Debaissieux de meening van Giardina, dat eenige chromosomen den ring gaan vormen.

Debaissieux houdt den ring voor een nucleolaire formatie. Over het ontstaan der „masse extrachromosomique achromatique” oppert Debaissieux twee mogelijkheden: of deze ontstaat door diminutie als plaats heeft bij *Ascaris lumbricoïdes*, of het is de tusschen de chromosomen gelegen substantie, in welk laatste geval geen diminutie plaats heeft. Dit is verder niet uit te maken.

Als 5de conclusie geeft Debaissieux:

„Peut être faut-il mettre la masse chromatique en relation d'homologie avec les matières nucleolaires des autres oeufs et avec la substance qui ailleurs donne le réseau extrachromosomique de la période de grand accroissement de l'ovocyte.”

Interessant is nog de opmerking van Debaissieux, dat hij nooit een overgang heeft gevonden van de cellen van den einddraad in de ovogoniën der eindkamer, doch dat hij niet durft te beweren, dat zij geen gemeenschappelijken oorsprong hebben.

Thomas Günthert: „Die Eibildung der Dytisciden,” ¹⁾ begint zijn artikel met een uitgebreid overzicht van de litteratuur over het ontstaan van de 3 elementen in de eibuis, n.l. de follikelcellen, de ei- en de voedstercellen. De follikelcellen zijn al gedifferentieerd en ontstaan uit cellen van den einddraad. Ook beschrijft Günthert een centrale as in den einddraad.

Terwijl Giardina de spoelrest als blijvend lichaam eerst waarnam bij de laatste multiplicatie-deeling, beschrijft Günthert deze reeds vanaf de eerste multiplicatie-deeling. Na de laatste multiplicatie-deeling neemt de spoelrest de plaats in, welke later tot aanhechtingsplaats wordt van de voedstercellen, waardoor de polariteit van het ei dan reeds bepaald wordt.

Günthert stelt de differentiatie van ei- en voedstercellen als volgt voor: verspreid door de geheele kern treden de

¹⁾ Zoöl. Jahrb. Abt. f. A. u. O. Bd. 30, 1910.

chromosomen op en daarnaast, ook door de geheele kern, fijne chromatine korrels, welke zich langzamerhand in een halve maan aan den eenen kant van de kern samen trekken en den ring van Giardina gaan vormen.

Günthert vindt het noodzakelijk een vermeerdering van de substantie, waaruit de ring bestaat, aan te nemen, gezien de donkere kleuring van den grooten ring, die uit zulke kleine korrels ontstaat.

De kleine korrels vindt hij om de chromosomen en ziet ze in aantal toenemen, zoodat de te bedenken mogelijkheid, dat de kleine korrels de chromosomen zouden gaan vormen, is uitgesloten. Hij is de meening toegedaan, dat de chromosomen de kleine korrels leveren en sluit zich op grond daarvan bij de meening van Boveri aan, dat hier diminutie plaats heeft. Bij *Colymbetes* treden ook bij het begin der differentiatie kleinere korreltjes op naast de chromosomen; deze kleine korreltjes kleuren zich eerst sterker met plasma-kleurstoffen, dan met kernkleurstoffen. Chromosomen en kleine korreltjes treden beide door de geheele kern verspreid op.

Günthert vat ook hier de korrels op als ontstaan door afsplitsing der chromosomen, ofschoon hij toegeeft nooit de chromosomen door deze korreltjes omringd te hebben gezien. Langzamerhand gaat de massa, welke zich uit de kleinere korreltjes vormt, meer en meer zich kleuren met kern-kleurstoffen.

Zonder verder bewijs neemt Günthert aan, dat de stof der eerst zich met lichtgroen kleurende korrels, chromatine is, dat zich later chemisch verandert, getuige de volgende aanhaling:

„Wenn es demnach sicher ist, dasz in der ovogonie von *Colymbetes* die eine Hälfte des Chromatins sich auch chemisch verändert hat,”

Bij de differentiatie-deelingen gaat de ring van Giardina steeds naar die dochtercel, welker cytoplasma de spoelrest bevat.

Verder bespreekt Günthert in deze publicatie zeer uitvoerig de vorming van de roset, de pathologische processen in de eindkamer, de secretorische functie van de

voedstercellen, welke hij opvat als veranderd chromatine uit de voedstercelkernen, hetwelk in den vorm van chromidiën aan de eicel wordt afgegeven; en ten slotte de tetradenvorming in de voedstercelkernen.

In een aanhangsel bespreekt Günthert de afbeeldingen, welke Buchner geeft van de ovogenese van *Gryllus* en uit daarbij als zijn meening, dat hetgene, wat Buchner accessorisch chromosoom noemt, een pathologisch veranderde substantie is, welke overigens gelijk te stellen is met den chromatischen ring in de ovogenese der *Dytiscidae*.

Reinhard Demoll, „Zur Lokalisation der Erbanlagen” ¹⁾, laat een aanleg vertegenwoordigd zijn door een „biophor”. Komt een aanleg tot uiting, dan geschiedt dit door „geactiveerd” worden van zoo’n biophoor.

De cellen der kiembaan bevatten volgens Demoll een stel biophoren, welke tot de oerkiemcellen absoluut passief blijven, en hij noemt deze „Stammanlagen”.

De biophoren, welke noodig zijn voor de celverrichtingen gedurende de vorming der kiembaan, kunnen niet geleverd worden door de Stammanlagen, welke intact moeten blijven. Demoll stelt zich nu voor, dat bij *Dytiscus* in den ring van Giardina, welke hij nucleolus noemt, de reeds geactiveerde en tot activiteit voorbestemde biophoren bevat zijn.

Met diminutie zou het niets te doen hebben, daar hier niet als bij *Ascaris* een stof uitgestooten wordt, welke overbodig is. Omdat bij de differentiatie-deeling de ring van Giardina in de eicelkern komt en niet in de kern der voedstercel, is volgens Demoll, deze ring niet te vergelijken met de chromosomenuiteinden bij *Ascaris lumbricoïdes*; hij vergelijkt dan de voedstercel als 't ware bij de papiermand, wanneer hij zegt:

„....., da die Nährzelle doch der gegebene Ort wäre zur Ablagerung überflüssiger und zur Degeneration bestimmter Plasmaeinschlüsse.”

Ten slotte zegt Demoll:

„Schliesslich ist bei Beurteilung dieser Dinge immer im Auge zu behalten, dasz vielleicht *Dytiscus* ein

¹⁾ Zoöl. Jahrb. Abt. f. Allgem. Zoöl. u. Physiol. Bd. 30. 1911.

Extrem darstellt, insofern als hier die Keimbahnbiophoren anscheinend durch gleiche Teilung der ganzen chromatischen Masse entstehen und somit alle Anlagen enthalten, also sehr viel mehr, als sie benötigen;"

Bij andere organismen zouden dan meer en meer de overbodige „Anlagen" teruggetreden zijn en alleen die verdubbeld en afgegeven worden, welke daadwerkelijk in actie komen.

Theodor Boveri¹⁾ bespreekt in 1904 o.a. de resultaten door Giardina bij zijn onderzoek verkregen, voorzoover deze belang hebben voor algemeen biologische vraagstukken, de kern betreffende. Hij wijst op de scheiding, welke hier bij de mitose zichtbaar wordt tusschen voortplantings- en somatische cellen en wijst daarbij ook op de overeenkomst met de diminutie bij *Ascaris*, daar toch in beide gevallen de voortplantingscel, in casu de eicel, meer krijgt als de somatische cel. Alleen de weg, waarlangs dit bereikt wordt, is verschillend; bij *Ascaris* heeft de diminutie aan het begin der kiembaan plaats, bij de vrouwelijke *Dytiscidae* aan het einde.

Verder poogt hij in een noot den aanval te weerleggen, welke Giardina tegen de gangbare opvatting van de beweging der chromosomen naar de polen onderneemt, naar aanleiding van het feit, dat hij geen spoeldraden zich aan den ring ziet vasthechten en deze zich toch ongeveer gelijktijdig met de dochterchromosomen naar de pool beweegt.

Naar aanleiding van de meening van Giardina, dat hij door zijn onderzoek de ongeldigheid van de individualiteits hypothese heeft bewezen, wijst Boveri op de door K. Bonnevie beschreven diminutie bij *Ascaris lumbricoïdes*, waar de einden der chromosomen worden afgestooten en dus toch het aantal chromosomen hetzelfde blijft.

Daar nu blijktbaar bij *Dytiscus* niet de uiteinden der chromosomen voor den te vormen ring worden gebruikt, doch de korrels, waaruit de ring gevormd zal worden, door de geheele kern verspreid, tusschen de chromosomen op-

¹⁾ Ergebnisse über die Konstitution der chromatischen Substanz des Zellkerns, Jena 1904.

treden, stelt Boveri een schema op, waarin de geheele oppervlakte der chromosomen korreltjes afgeeft, die alle samenvloeien tot de chromatische massa van den ring. Dat het aantal chromosomen vóór en na de differentiatie 40 bedraagt, en dat zoowel de chromosomen als de massa, welke de ring gaat vormen, door de geheele kern verspreid optreden, pleit volgens Boveri zeer ten gunste van het door hem opgestelde schema.

Een interessant verschil tusschen *Ascaris* en *Dytiscus*, waarop Boveri de aandacht vestigt, is de zuiniger diminutie bij *Dytiscus*, daar hier alleen de cel, welke de substantie noodig heeft, deze in haar geheel krijgt, terwijl bij *Ascaris* beide cellen de substantie ontvangen, de cel, welke deze niet noodig heeft, stoot deze uit haar chromosomen uit.

Bij de bespreking der vraag, of er verband bestaat tusschen een bepaalde soort chromatine en een bepaalde celfunctie, komt Boveri nog op de diminutie bij *Ascaris* en *Dytiscus* terug. Hij komt tot het besluit, dat uit de diminutie blijkt, dat de sexueelcellen chromatine noodig hebben, dat andere somatische cellen deze niet noodig hebben, en dat de kern niet een celorgaan zijn kan met een enkele bepaalde functie, zooals b.v. een ademhalingsorgaan, doch dat er specifiek tot een bepaalde celverrichting in betrekking staand chromatine bestaat.

P. Buchner¹⁾ ziet in den ring van *Giardina* een equivalent van den nucleolus in andere cellen, daar dit ringvormig lichaam hier optreedt in een eikel, welke geen nucleolus bezit, en deze zich later oplost in brokjes, welke zeer gelijken op de nucleoliachtige lichaampjes in de eikel van *Gryllus*.

Omdat de ring echter in sommige opzichten andere eigenschappen heeft als een nucleolus, heeft men voorgeslagen van „nucleoloïde stoffen” te spreken. De beteekenis van deze stof acht hij van een trophische natuur, daar het toekomstige ei stoffen noodig heeft, welke de voedstercellen niet noodig hebben, niettegenstaande hun belangrijke secretorische verrichtingen.

Kurt Schneider²⁾ beschrijft bij de ovogenese van

¹⁾ Praktikum der Zellenlehre I.

²⁾ Arch. f. Zellforsch. Bd 14, 1917.

Deilophila euphorbiae verschillende processen, welke gelijksoortig verlopen, als bij de ovogenese der *Dytiscidae*.

Hier heeft een dergelijke vorming van ei- en voedstercellen in den vorm van een rosette plaats als bij de *Dytiscidae*. Echter is van een differentiatie tijdens de mitose zelf niets te bemerken. Dat er bij de mitose een verschil is ontstaan, blijkt eerst na de mitose, door het verschillende gedrag der chromatine in ei- en voedstercellen.

Ook hier treedt dan evenals in de eicel der *Dytiscidae* een verschil op tusschen de verspreide chromatine en de compacte. De compacte is eerst in twee lichaampjes verspreid, welke zich tot één vereenigen. Deze in één lichaam opgehoopte compacte chromatine, doet zich voor in den vorm van een verwarde paarslnoer.

Eiwit-reacties.

Met het doel, na te gaan, in hoeverre het mogelijk was meer van de geaardheid van dergelijke substanties te weten te komen koos ik daartoe als voorwerp van onderzoek de bij de ovogenese der Dytiscidae een rol spelende z.g. „Ring van Giardina”. Om een volledige chemische analyse te verrichten van de te onderzoeken stof, op de wijze, waarop Kossel e.a. hun kennis van de celkern hebben verkregen, was ondoenlijk, daar het mij onmogelijk was de stof, waaruit de ring van Giardina bestaat, van de andere celbestanddeelen in genoegzame hoeveelheid te isoleeren.

Het was dus noodig na te gaan, welke methodes met onze tegenwoordige kennis der cel konden worden toegepast.

Zooals boven reeds werd gezegd, zijn de reacties met verschillende kleurstoffen niet betrouwbaar, daar we eigenlijk niet met zekerheid weten, of deze reacties chemische zijn, dan wel of een physisch proces, op adsorbtie berustend, er aan ten grondslag ligt. Soms ziet men een kleurbasis zich met de chromatine verbinden en men kan dan in de oplossing het zuur van het kleurende zout aantoonen, men zou dus overtuigd zijn van een chemisch proces.

Zoo zou er ook voor pleiten, dat vele zure stoffen zich kleuren met basische kleurstoffen en veel basische stoffen met zure kleurstoffen.

Doch daartegenover kan men weer vele feiten plaatsen, welke voor een andere opvatting pleiten.

Ten eerste is het van de chromatine niet het nucleoproteïde als zoodanig, wat we kleuren, doch de verbindingen hiervan met de verschillende metalen, welke in de meeste fixatiemiddelen voorkomen.

Verder zijn deze verbindingen onoplosbaar, terwijl toch voor een chemische reactie de stoffen, welke de reactie aangaan, voor een deel in opgelosten toestand aanwezig

moeten zijn. (Zoo b.v. ook het zich met basische kleurstoffen kleurende onoplosbare kiezelzuur).

Sterk tegen de chemische theorie pleiten de proeven met chemisch indifferente stoffen, b.v. de onderzoekingen van Freundlich met dierlijke kool. Hierbij heeft zelfs de „Umstimmbarkeit” met zuren plaats.

Ook moet ik hier met een enkel woord wijzen op de zeer sprekende onderzoekingen van A. Fischer¹⁾.

Hieruit bleek o.a., dat, of een zelfde stof zich met zure of met basische kleurstoffen kleurde afhankelijk was van de korrelgrootte. Ook bleek de kleuring afhankelijk te zijn van de dichtheden van de te kleuren stoffen en de diffusiesnelheid van de kleurstof in oplosmiddel en te kleuren stof.

Ik hoop door op deze enkele feiten te wijzen, mij gerechtvaardigd te hebben, dat ik niet als vele onderzoekers voor mij gedaan hebben, ben afgegaan op de eigenschappen van de te onderzoeken stof om kleurstof op te nemen, om haar eigenschappen te bepalen. De vorige onderzoekers onderzochten ovaria der Dytiscidae na fixatie met verschillende fixeermiddelen: alcoholhoudend, formaldehydhoudend, metaalzouten bevattend, met osmiumzuur, enz.; en door al deze mengsels werden de stoffen, welke in den ring van Giardina voorkomen, neergeslagen.

Ik achtte me daarom gerechtvaardigd de mogelijkheid te veronderstellen, dat de ring van Giardina bestond uit eiwitstoffen met al of niet andere organische en anorganische bestanddeelen gemengd of verbonden. Deze veronderstelling werd bevestigd door het positief uitvallen van de door St. Hilaire²⁾ voor microchemisch onderzoek gewijzigde biureet-reactie. Hierbij wordt het door de eiwitlichamen in alkalische oplossing gebonden koper, door behandeling met ferrocyanaalkalium in het roodbruin gekleurde ferrocyanaat omgezet.

Ik voerde deze reactie uit met doorsneden van in alcohol gefixeerd materiaal. Uit gedistilleerd water worden de

¹⁾ Fixierung, Färbung und Bau des Protoplasmas. Gustav Fischer, Jena.

²⁾ Sitz. ber. d. Gesell. z. Bef. Naturw. z. Marburg No. 7, 1898.

doorsneden in een alkalisch gemaakte kopersulfaat-oplossing gebracht, daarna worden ze afgespoeld in ruim gedistilleerd water, waarna ze in een ferrocyaankalium-oplossing komen, vervolgens worden ze na stijgende alcoholen en xylol in canadabalsem ingebed. Het bleek nu, dat deze reactie in den ring van Giardina positief uitviel, evenals in de chromatine van alle cellen.

Ook vertoonden deze celbestanddeelen een positieve xanthoproteïne-reactie, de gele kleur werd met ammoniak intensiever.

In tegenstelling met Giardina vond ik de reactie met Millon's reagens positief zoowel in de chromatine der kernen als in den ring. De tint is niet zoo intensief lakrood, als we gewoon zijn bij gewoon chemisch onderzoek, doch dit is ook niet te verwachten, daar ten eerste zeer waarschijnlijk de ring van Giardina niet uitsluitend uit eiwit bestaat en verder de ring een zeer klein lichaampje is, waarvan we in de doorsnede nog maar een uitgesneden schijfje zien, ter dikte van eenige weinige duizendste deelen van millimeters.

Ten slotte heb ik, zonder positief resultaat, de aanwezigheid van eiwitten in den ring met Raspails reagens trachten aan te toonen. Het geheele praeparaat nam een bruinachtige tint aan, alsof het zwavelzuur alleen aanwezig was.

Door het bovenstaande acht ik den geheelen of gedeeltelijken opbouw van den ring van Giardina uit eiwitten bewezen.



Oplosbaarheids-reacties.

In dit gedeelte zal ik de resultaten van de z.g. oplosbaarheids-reacties behandelen.

Vreemd is het dat deze reacties, welke tot de meer betrouwbare behooren, welke we in de cytologie kennen, in het laatste tijdperk van deze wetenschap zoo weinig zijn gebruikt.

Behalve het onderzoek van Grosz over den invloed van verschillende reagentia op de levende kern¹⁾ en de verdediging van deze methode van onderzoek door Brûel²⁾, moeten we teruggaan tot de geheele reeks onderzoekingen van E. Zacharias³⁾, Carnoy en Schwarz, om de geheele uitbuiting van deze onderzoekingsmethode te vinden. Deze handelen in 't algemeen over de eigenschappen van allerlei steeds voorkomende celbestanddeelen (chromatine, nucleolus, spoeldraden, protoplasma).

Voor zoover ik heb kunnen nagaan, gebruik ik de oplosbaarheids-reacties in dit onderzoek voor 't eerst om de eigenschappen van een bijzonder celbestanddeel na te gaan.

Zeër zeker moeten in dit verband genoemd worden de macrochemische onderzoekingen van Miescher, Kossel, Hoppe Seyler, Loew, Plósz, von Jaksch, Geoghegan, enz. over spermatozoën, ettercellen, gist, lever, hersenen, bloed, enz., daar de oplosbaarheids-reacties uit deze chemische onderzoekingen hun kracht putten.

Bij verschillende van deze onderzoekingen is, wanneer de een of andere stof door een oplosmiddel was uitgetrokken, nagegaan, welk morphologisch bestanddeel der cel was verdwenen. Hier ligt dus de schakel tusschen het onderzoek van de chemische celbestanddeelen en hun verspreiding in de cel.

Bij de onderzoekingen van Miescher (ettercellen, sper-

¹⁾ Arch.f. Zellforsch. Bd. XIV. 1915—1917.

²⁾ Handw. Naturw. Bd. X.

³⁾ Zie voor litt.opgaven: Progr. rei Botan. 1910.

matozoën) bleek, dat na behandeling met natriumcarbonaat-oplossing, de contour zichtbaar bleef, zoo ook de nucleoli, dus de kerninhoud (chromatine) oploste in sodaoplossing.

Bij de onderzoekingen met spermatozoën (Miescher, Schmiedeberg) was het mogelijk de kerninhoud zoo goed als te isoleeren; door zoutzuurextractie werd protamine verwijderd, uit het alkali-extract van de protamine-vrije koppen werd met HCl het nucleïne neergeslagen. 95 % van de kop bleek uit protamine nucleïnaat te bestaan.

Dit, in verband met het feit, dat de kop der spermatozoën bijna geheel uit chromatische substantie bestaat, leidde tot het gelijkstellen van deze twee.

Uit de onderzoekingen van Plósz ¹⁾ bleek dat de kernen der roode bloedlichaampjes van vogels bestand waren tegen digestie met kunstmatig maagsap en zwakke zuren, niet tegen alkaliën en sterke zuren.

G. Zacharias heeft in talloze gevallen nagegaan, hoe de celbestanddeelen zich tegenover verschillende reagentia verhielden. Voornamelijk werd botanisch materiaal onderzocht, echter ook zoölogisch.

Het resultaat van bovengenoemde en dergelijke onderzoekingen kunnen we als volgt samenvatten:

De chromatische substantie is onoplosbaar in verdund zuur en kunstmatig maagsap. Oplosbaar in geconcentreerde zuren en alkaliën, in 10—20 % keukenzoutoplossing, in natriumcarbonaat-oplossing en in alkalisch trypsine.

Op de nucleoli werken verdunde alkaliën niet oploosend, evenmin geconcentreerde neutraalzout-oplossingen.

In azijnzuur heeft wat opzwellling der nucleoli plaats. Ze worden niet opgelost in geconcentreerd mineraalzuur, daarentegen wel in pepsine-zoutzuur. Ze zijn echter zeer wisselend in eigenschappen.

De linine is onoplosbaar in oplosmiddelen der nucleoli en chromogranula. Zwelt in verdund KOH of HCl.

Neutraalzouten zijn onwerkzaam, terwijl geconcentreerd zoutzuur soms oplost.

De grond-substantie vervloeit in caustische alkaliën en ammoniak, wanneer ze niet reeds vloeibaar is.

¹⁾ Med. Chem. Unt. Hoppeseyler. 1871.

De kernmembraan verhoudt zich ongeveer als de grondsubstantie; ze wordt aangetast door ammoniak en andere sterke basen en door ammoniumzouten, v.n.l. in groote verdunning.

Den laatsten tijd is in de hierboven vermelde resultaten van de andere onderzoekers eenige wijziging gekomen, daar Grosz heeft aangetoond, dat de nucleoli in 't geheel niet dien weerstand tegenover verschillende oplosmiddelen hebben, welke hun veelal wordt toegeschreven, doch dat zij in hun verhouding tegenover oplosmiddelen dikwijls zeer veel gelijken op chromatine.

Om nu na te kunnen gaan, hoe de substantie, waaruit de „ring van Giardina” bestaat, zich tegenover deze reagentia verhoudt, werden ovaria van *Dytiscus marginalis* of van *Acilius cristatus* of *Acilius sulcatus*, welke terstond na het dooden van het dier uitgebraepraepareerd waren, in oplossingen gebracht van azijnzuur, zoutzuur in verschillende concentraties, ammoniak, natriumcarbonaat en keukenzout.

Ook had ik de verschillende reagentia kunnen laten inwerken op doorsneden van in alcohol gefixeerd materiaal. Ik deed dit met opzet niet, daar het gebleken is, dat na de door de alcohol veroorzaakte veranderingen (denaturatie der eiwitten), de onaantastbaarheid van de celbestanddeelen aanzienlijk vergroot is, zoodat typische verschillen niet meer zoo sprekend optreden. Zie o.a. Heine: *Microchemie der Mitose*, zugleich eine kritik microchemischer Methoden,¹⁾ waar hij zegt:

„Zunächst muss hier leider von manchen charakteristischen Lösungsmitteln abgesehen werden, da die Eigenthümlichkeiten der Nucleinsubstanzen in dieser Beziehung nach Alcoholbehandlung vielfach verloren gehen.”

De tijd, dat de ovaria aan de inwerking der verschillende reagentia werden blootgesteld, varieerde van 12 tot $\pm$ 60 uur.

Daarna volgde fixatie in één der volgende vloeistoffen: Petrunkewitch, Bouin, Docters v. Leeuwen, of in alcohol 70—90 %, daarna in alcoholen van stijgende concentratie, benzol en ingesmolten in parafine met smeltpunt 52⁰—56⁰ C.,

¹⁾ Zeitschr. f. Physiol. chemie 1896.

ten slotte werden doorsneden gemaakt, welke werden opgeplakt en gekleurd om de uitwerking der reagentia te kunnen nagaan.

AZIJNZUUR. Deze werd aangewend in een sterkte van 3 %. Zooals te verwachten was, was de fixatie hiervan zeer voldoende, zoodat niet alleen de verschillende celbestanddeelen en de verschillende stadia der ovogenese goed te herkennen waren, maar ook voor bepaalde morphologische vraagstukken deze praeparaten heel geschikt te gebruiken waren.

Uitgepraepareerde ovaria of, om de eindkamers zeker niet te beschadigen, de gehalveerde achterlijven, van chitinepantser ontdaan, werden 24 uur in 3 % azijnzuuroplossing gebracht en daarna òf in 70 % alcohol gebracht en door stijgende alcoholen en benzol in parafine van 54° C. ingesmolten, òf ze werden eerst nog in een vloeistof gefixeerd, meest in de vloeistof van Petrunkewitch, en daarna pas verder behandeld en ingesmolten.

Bekijkt men nu de doorsneden van een ovarium, dat een dergelijke behandeling achter den rug heeft, dan valt in de eerste plaats in de kernen de neergeslagen chromatine op en in de einddraadcellen, behalve de chromatinekorrels, een typische nucleolus.

Ook in de follikelepitheelcellen en hun voorstadia neemt men een nucleolus waar.

De overgang van einddraad op eindkamer is zeer scherp afgeteekend en wordt gevormd door uischilvormige cellen.

Wanneer men de cellen beziet, welke in de eindkamer liggen en waaruit de ei- en voedstercellen gevormd zullen worden, dan valt daar ten eerste in op, dat ze geen nucleolus hebben. Verder bevat de kern twee bestanddeelen, n.l. de chromatinekorrels en dunne draden, die zich niet of uiterst zwak met basische kleurstoffen kleuren en welke, wanneer men ook met zure kleurstoffen kleurt, deze sterker opnemen dan de basische. In de met haemaluin of haematoxyline Delafield gekleurde praeparaten, wordt, als de praeparaten wat ouder worden, het verschil tusschen deze twee substanties nog veel duide-

lijker, daar de draden, welke toch al minder kleurstof hebben opgenomen, zich veel sterker ontkleuren dan de chromatine-korrels, zoodat ten slotte de chromatine zichtbaar is als blauwe korrels op grijze draden (fig. I, II en III).

Dat in de vroegste stadia de chromatine in de cellen der eindkamer in korrels is opgehoopt, blijkt wel hier uit, dat men in alle doorsneden de korrels nooit anders waarneemt.

Waren de korrels dóórsneden van staafjes, dan moesten deze toch ook wel eens overlans getroffen worden; men ziet dat echter nooit.

In de vroegste stadia is bijna alle chromatine wandstandig. Verder op in de eindkamer ziet men in enkele cellen de chromatine zich voordoen als verdikkingen van een langen draad, welke laatste uit de bovengenoemde, zich met zure kleurstoffen kleurende, substantie bestaat.

Deze draad trekt zich langzamerhand tot één massa samen, welke een fijne parallelle streeping vertoont (fig. V). Deze substantie gaat zich meer en meer met basische kleurstoffen kleuren, neemt in massa toe en vormt op deze wijze den ring van Giardina.

De ring van Giardina doet zich in deze praeparaten voor als een meestal ronde massieve massa, welke zich met basische kleurstoffen kleurt en waarin lichtere ronde vlekken en donkerder strepen en stipjes zijn waar te nemen.

Doordat de ring van Giardina en de stoffen, waaruit deze ontstaat in de ovaria, welke met 3 % azijnzuur 24 uur behandeld zijn, duidelijk zijn waar te nemen, besluiten we, dat de substantie van den ring van Giardina, zoowel als die van zijn voorstadia onoplosbaar is in azijnzuur.

ZOUTZUUR $3\frac{1}{2}\%$. Dit werd op dezelfde wijze gebruikt als het verdund azijnzuur, en de resultaten hiermee verkregen zijn vrijwel dezelfde, als die met verdund azijnzuur; slechts was de fixatie dikwijls nog veel beter.

Enkele malen, wanneer dit zuur wat korter werd aangewend (12 tot 20 uur), waren de praeparaten uitstekend en behoorden tot de beste, welke ik heb verkregen; ze waren te vergelijken met praeparaten, waar fixatievloeistof van Petrunkewitch was aangewend.

Werden de praeparaten gekleurd met haematoxyline-oplossing, b.v. volgens Delafield, dan trad reeds binnen korten tijd ontkleuring op, zoodat reeds na eenige weken in de praeparaten alleen nog verschillende nuances van rood waren waar te nemen. Werd daarentegen, waar fixatie in een sublimaathoudend mengsel was gevolgd, kleuring met Heidenhain's IJzerhaematox. toegepast, dan had men van de ontkleuring geen last.

Ook hier neemt men in deze praeparaten den ring van Giardina en zijn voorstadia waar. De gevolgtrekking is dezelfde, als bij het 3 % azijnzuur: onoplosbaar in $3\frac{1}{2}$ % HCl. (fig. X.)

ZOUTZUUR 7 %. Men ziet in deze praeparaten vrijwel hetzelfde, als in die, waar zwakkere zoutzuur-oplossing heeft ingewerkt op de ovaria. Alleen is de chromatine wat scherper afgeteekend. Ook de ring van Giardina is nog zichtbaar. Evenals bij de praeparaten van ovaria, behandeld met 3 %, zijn ook in de praeparaten, voorbehandeld met $3\frac{1}{2}$ % en 7 % HCl. de nucleoli duidelijk zichtbaar in de kernen der follikelcellen.

ZOUTZUUR $\pm$ 14 %. De ovaria, welke 24 uur in $\pm$ 14 % HCl gelegen hadden en daarna gefixeerd waren, bleken niet geschikt meer voor verder onderzoek op deze wijze, daar er geen wijs meer te worden was uit de doorsneden; ook al, doordat de op deze wijze behandelde ovaria zich zoo lastig laten snijden en daarbij dan in hooge mate beschadigd worden.

AMMONIAK 5 %. Ovaria, welke met deze oplossing zijn voorbehandeld, kunnen natuurlijk niet in sublimaathoudende vloeistof worden gefixeerd. Het meest geschikt voor deze fixatie bleken vrij sterk zure, alcoholhoudende mengsels.

Opvallend zijn de goede kleurbaarheid en de gemakkelijke wijze, waarop men zich in deze praeparaten oriënteert, daar de ovaria zeer goed bleken te snijden en de onderlinge verhoudingen der cellen geheel bewaard zijn gebleven. (Zie fig. VII).

De kernmembraan is opgelost, de chromatine is sterk aangetast en van vorm veranderd, evenals de ring van Giardina, welke ook van vorm veranderd en in substantie verminderd is.

Opmerkelijk in deze praeparaten is de zoo verschillende wijze, waarop zich de kernen van de follikelepitheelcellen en cellen van den einddraad eenerzijds tegenover de oogoniën anderzijds zich gedragen.

Zijn de kernen der oogoniën duidelijk aangetast en de chromatine veranderd in hare structuur, dit blijkt niet het geval te zijn met de follikelcellen. Wel heeft ook hier in zooverre een verandering plaats gegrepen, dat de oorspronkelijke structuur van chromatinekorrels en nucleolus niet meer in den oorspronkelijken toestand bestaat, doch de verandering is hier niet een duidelijke vermindering, daar de geheele kern zich min of meer egaal donker gekleurd heeft, alleen enkele kernen vertoonen nog een spoor van een nucleolus.

Zooals Metchnikoff¹⁾ en Heymans²⁾ het eerst aantoonen, ontstaan deze follikelcellen uit de einddraadcellen.

Het verschillend gedrag van de genitaalcellen en de follikelcellen tegenover ammoniak is een bewijs te meer voor de zoo verschillende geaardheid van deze twee celgroepen. Het is op deze plaats en in dit verband, dat ik moet stilstaan bij de door Grosz³⁾ verrichtte onderzoekingen over de inwerking dezer oplosmiddelen als reagentia tegenover de verschillende kernbestanddeelen. Bij het beschouwen van de donker gekleurde kernen der follikelcellen komt namelijk de gedachte op: zijn hier de reagentia wel ingedrongen? Grosz heeft zich deze vraag ook voorgelegd, toen hij levende kernen onderzocht en daarop verschillende reagentia liet inwerken, ze dan weer onderzocht en ze vergeleek met den inhoud der kernen na fixatie en kleuring.

Grosz acht indringen van ammoniak en soda zeker, doordat in deze gevallen de kernmembraan wordt opgelost.

¹⁾ Zeitschr f. Wiss. zool. 14.

²⁾ " " " " 53.

³⁾ Arch. f. Zellforschung. Bd. XIV.

Ook haalt hij verschillende argumenten aan voor het indringen van neutrale zouten als b.v. keukenzout.

Doch, zooals Grosz ook terecht opmerkt, er moet niet alleen rekening gehouden worden met het indringen der reagentia, ook moet men er aan denken of de ontstane producten, ingeval van oplossing uit de kern, kunnen verdwijnen en met welke snelheid dit geschiedt.

Het bovenvermelde geval met de kernen der follikel-epitheelcellen doet hieraan denken.

Dat ammoniak een oplossende werking heeft op de chromatine is bekend genoeg en wordt ook duidelijk bewezen, wanneer men sterkere ammoniak-oplossingen laat inwerken bij nog wat langeren duur, dan verdwijnt ten slotte bijna alle kerninhoud. Werkt een slappere oplossing in, gedurende niet al te langen tijd, dan heeft wel een opzwellling en daarna vervloeiing der chromatine plaats, doch de ontstane producten hebben nog geen tijd gehad de kern te verlaten, daar dit zeer langzaam schijnt te geschieden.

Grosz merkt naar aanleiding van het inwerken van ammoniak dan ook op:.....; „die Grundsubstanz (mit Chromatininhalt) mischt sich aber denn nicht stets mit dem Cytoplasma. Sie wird nämlich durch Chromatinlösungsmittel nicht stets dünnflüssiger, sondern vielfach hierin, auch in destilliertem Wasser, ganz oder zum Teil gelatiniert”.

Grosz was in staat het oplossen in de kern zelf onder het microscoop waar te nemen; een dan na fixatie optredend netwerk was dus zeker als een neerslag aan te merken. Bij mijn onderzoekings-object was deze wijze van werken uitgesloten.

Mij richtend naar de resultaten van Grosz en vroegere voorgangers, werden de resultaten uit de gefixeerde preparaten alléén afgeleid.

AMMONIAK 8 %. Hierin verdwijnt de inhoud der kernen vrijwel geheel; wat in opgelosten toestand aanwezig was in de kern, wordt natuurlijk bij de fixatie neergeslagen in den vorm van een korrelig netwerk. (Vergelijk ook tekst figuur 4, bij Grosz). Dit nu was gering na behandeling

met 8 % ammoniak. Zoowel de chromatinekorrels als de ring van Giardina verdwijnen. (fig. VIII).

Ook de nucleoli der follikelepitheel- en einddraadcellen verdwijnen, vooral na langer verblijf (30 à 36 uur).

AMMONIAK 10 %. Dit alles is in nog sterkere mate het geval in 10 % ammoniak-oplossing.

Was reeds in de 8 % ammoniak-oplossing de oriëntatie in het praeparaat uiterst lastig, daar van de kernen meest niets anders te bespeuren is, dan een rij gaten met zeer geringen inhoud, zonder een bepaalde structuur, in de 10 % oplossing was het meestentijds ondoenlijk zich te oriënteren, alleen in enkele gevallen kon men zeker zijn een eindkamer van een eibuis voor zich te hebben, en kon men het absolute oplossen van den kerninhoud, den ring van Giardina inclus, vaststellen.

NATRIUMCARBONAAT. Dit kwam in toepassing in verschillend sterke oplossing, varieerend van 1¼ % tot 10 %.

De duur, waarin het versch uitgepraepareerde ovarium of het gehalveerde achterlijf hierin werd gelaten, verschilde van 12 uur tot 2½ dag.

De uitwerking van de oplossing was vrijwel evenredig aan de sterkte van de oplossing en den duur van de inwerking. Ook van natriumcarbonaat is het bekend, dat het de chromatine der celkern oplost.

Wanneer we nu de praeparaten bekijken, welke vervaardigd zijn van ovaria, welke 24 uur in 5 % soda-oplossing hebben doorgebracht, dan vinden we in de kern van de ei- en voedstercellen een zeer onregelmatig netwerk, waarin meest geen spoor van de oorspronkelijke structuur meer te vinden is. Ook de ring v. Giardina is meestal niet meer te vinden in het gelijkmatige netwerk. (zie fig. XI, XIII).

Het is, na de uiteenzettingen van Grosz, dan ook zoo goed als zeker, dat we hier moeten aannemen, dat de inhoud der kern vervloeid is, doch niet in staat was of niet den tijd heeft gehad de kern der cel te verlaten en toen door de daarop volgende fixatie neergeslagen is in den vorm van het onregelmatige netwerk, dat men in het voltooide praeparaat waarneemt.

De kernen der follikelcellen zijn vrijwel leeg, alleen een weinig volumineus netwerk is in deze kernen nog te vinden. Het is dus zeker, dat, in dit geval, de nucleoli door het natriumcarbonaat zijn opgelost.

Echter niet in alle cellen in het praeparaat heeft waarschijnlijk oplossing plaats gehad van de nucleoli.

Er zijn enkele andere celsoorten, waarschijnlijk bindweefsel, waarin men in de kern aanwezige klompjes, nucleoli, meent te kunnen terugvinden.

Dit is echter uit den aard der zaak niet met zekerheid uit te maken, teminste niet in deze praeparaten.

Mocht het later bevestigd worden, dan zou het alleen bewijzen, dat niet alle homologe celbestanddeelen uit dezelfde substantie zijn opgebouwd.

Verreweg de meeste cellen verhouden zich echter als de boven beschreven.

NATRIUMCHLORIDE. Dit werd aangewend in 3 %, 5 % en 10 % sterke oplossingen. In de zwakkere oplossingen was niet veel verandering waar te nemen, in de sterkere had een lichte aanvreting van het chromatine plaats (fig. IX).

Nu wordt van natriumchloride-oplossingen aangegeven, dat ze pas oploosend werken in sterkte van 10—20 %.

Van ovaria, welke in deze sterkere oplossingen hadden gelegen, kon ik echter helaas geen bruikbare praeparaten verkrijgen.

Nu wezen echter de resultaten, verkregen met 10 % oplossingen, wel uit, dat er eenige oplossing had plaats gehad, zoowel van chromatine als van den ring van Giardina.

Wanneer we, aan het einde van dit hoofdstuk gekomen, de oplosbaarheids-reacties in 't algemeen beschouwen, is wel de eerste opmerking, welke te maken valt, deze, dat genoemde methode uiterst omslachtig is.

Na inwerking der verschillende reagentia was het een langdurig probeeren der verschillende fixatiemethoden om telkens weer na aanwending van een nieuw reagens een bruikbaar resultaat te verkrijgen. Dit was natuurlijk uitermate tijdroovend. Ook heeft men zorgvuldig de voltooide praeparaten te beoordeelen. Dat een leege kern op oplossing

der verschillende bestanddeelen wijst, is duidelijk; zoo moet natuurlijk ook het zeer duidelijk aanwezig zijn der structuur een aanwijzing zijn, dat het betreffende reagens niet oplossend werkt.

Doch ook bij het aanwezig zijn van netwerken, neerslagen, enz., welke niet met de normale structuur overeenstemmen, moet men aannemen, dat het reagens in kwestie oplossend heeft gewerkt, doch dat de bij de oplossing ontstane producten, door het na dien tijd ingewerkt hebbende fixatiemiddel, zijn neergeslagen.

Een nadeel is, dat we altijd ter vergelijking op gefixeerde praeparaten zijn aangewezen. Voor zoover we echter kunnen nagaan, behoeven we met de tegenwoordig gebruikelijke fixatiemiddelen niet zoo heel bang te zijn voor kunstproducten, gezien de ervaring, welke R. Goldsmidt¹⁾ daaromtrent heeft opgedaan bij zijn onderzoek naar de spermatogenese in vitro. Ook het boven reeds eenige malen aangehaalde werk van Grosz wijst zeer zeker in die richting.

Toch moet altijd de mogelijkheid dat men kunstproducten voor zich heeft, in 't oog gehouden worden.

Nog een nadeel van deze methode is de moeilijke oriëntatie na sommige behandelingen, vooral waar sterke oplossing heeft plaats gehad, zooals bij aanwending van sterke alkaliën; ook is dit in nog sterkere mate het geval na aanwending van sterke zuren en geconcentreerde zoutoplossingen, zoodat deze reagentia zelfs voor dit onderzoek niet meer bruikbaar waren. Alleen een weefsel dat men terdege kent, valt na aanwending van sterke oplosmiddelen nog te beoordeelen.

Tegenover deze nadeelen staat echter het m.i. zeer groote voordeel, hetwelk deze manier van werken haar recht van bestaan geeft, n.l. dat ze absoluut betrouwbaar is, vergeleken met de kleurreacties, welke we zoo slecht kunnen beoordeelen, en waarvan wij de waarde niet goed bepalen kunnen, zoo lang we niet de theoretische grondslagen hiervan volledig kennen.

Wat nu de resultaten in dit speciale geval aangaat, kunnen we vaststellen, dat de chromatine in de ei- en voedstercellen zich verhoudt, zooals gewoonlijk van de chromatine in 't alge-

¹⁾ Arch. f. Zellforsch. Bd. XIV.

meen wordt aangegeven, en dat de substantie waaruit de ring van Giardina bestaat, zich tegenover alle reagentia verhoudt als chromatine.

Bovendien bleek uit het voorgaande, dat bij de Dytiscidae in 't algemeen de nucleoli zich tegenover de gebruikte reagentia verhouden als chromatine, behalve dan misschien wat minder oplosbaarheid van sommige nucleoli (bindweefsel?) in natriumcarbonaat. Deze ervaring stemt dus geheel overeen met die, welke Grosz bij zijn werk opdeed en welke in tegenspraak is met hetgeen vroegere onderzoekers omtrent het gedrag der nucleoli hebben aangegeven.

Microchemische reacties op Ijzer en Phosphor.

Toen mij bij de oplosbaarheidsreacties was gebleken, dat de substantie, waaruit de ring van Giardina is opgebouwd, in zoo vele opzichten zich gedroeg als de chromatine der celkernen, lag het voor de hand, om na te gaan, of er in meerdere opzichten overeenstemming van den ring van Giardina en de chromatine was aan te toonen.

Hoewel er veel critiek is uitgeoefend op de bovengenoemde microchemische reacties, vond ik, dat het op mijn weg lag na te gaan, of de ring van Giardina evenals de chromatine positief reageerde op gemaskeerd ijzer en phosphor.

Tegen de microchemische ijzerreactie heeft men ten eerste aangevoerd, dat het ijzer, dat men aantoonde, niet oorspronkelijk in de chromatine aanwezig was, doch dat dit ijzer door de chromatische substantie was geabsorbeerd, nadat het afgegeven was geworden door de verschillende gebruikte vloeistoffen, het glas, enz.

Het is vooral Macallum¹⁾ geweest, welke van de meeste dezer bezwaren de ongegrondheid heeft aangetoond.

De gebruikte vloeistoffen kunnen genoegzaam zuiver worden verkregen, en inplaats van glas heeft Macallum bij gebruik van dek- en voorwerpglazen van kwarts, dezelfde resultaten verkregen. Bovendien kan bij gebruik van glas dit door achtereenvolgende behandeling met alcohol en zeer warm zoutzuur voldoende ijzervrij worden gemaakt.

In de zwavelzure alcohol, welke ik bij de ijzer-reactie gebruikte, was na 4 dagen staan bij 35° C. geen ijzer aan te toonen. Wel gaf deze vloeistof een sterke ijzerreactie, toen toevalligerwijze hier eenmaal een vrij groote hoeveel-

¹⁾ Ergebn. d. Physiol. Bd. 7. 1908.

heid water was bijgekomen, voordat de vloeistof in de thermostaat ging.

Dat doode chromatine ijzer zou absorbeeren, wordt algemeen toegegeven. Gilson¹⁾ toonde aan, dat, wanneer men gefixeerde kernen dompelde in een oplossing van ijzersulfaat ter sterkte van $\frac{1}{2}$ ‰, op nog aantoonbare wijze ijzer geabsorbeerd was geworden.

Doch het is zeker, dat, wanneer men nauwkeurig werkt met goed gereinigd glas en zuivere vloeistoffen, men niet werkt met oplossingen, waar $\frac{1}{2}$ ‰ ijzerverbindingen in voorkomen.

Bovendien is het na den dood door de chromatine geabsorbeerde ijzer niet geabsorbeerd, doch terstond aantoonbaar.

De eenige manier, waarop men nog zou kunnen vasthouden aan de niet normale aanwezigheid van gemaskeerd ijzer, zou zijn dat men aannam, dat gedurende het afsterven van de chromatine een gemaskeerde ijzerverbinding zou worden gevormd, wat m. i. al ten zeerste onwaarschijnlijk moet worden geacht.

Bovendien heeft Macallum onomstootelijk aangetoond, dat de kern ijzer bevat, en wel op de volgende wijze:

Hij stak amphibieëneieren zoodanig aan, dat de kern de cel verliet; deze geïsoleerde kern werd dan op een zuiver platinaschaaltje met salpeterzuur verhit, daarna werd met behulp der Berlijnschblauwreactie het ijzer aangetoond.

Dat het speciaal de chromatine is, welke het ijzer bevat, heeft Macallum aangetoond, door de chromatinedraad der speekselklierkernen van Chironomus te isoleeren en hierin het ijzer aan te toonen.

Het zou toch ook wel heel toevallig zijn, wanneer van al de colloïden in kern en cytoplasma, de chromatine, welke zelf ijzerhoudend is, alleen absorbeerend op alle ijzerverbindingen zou werken.

Samojloff²⁾ toonde aan, dat men dezelfde resultaten verkrijgt met de Berlijnschblauwmethode en met de

¹⁾ Report of the British Associat. f. advanc. of Sc. 1892.

ammoniumsulfide methode. Naar aanleiding daarvan voelt men de vraag opkomen, zou dan bij zoo verschillende methodes dezelfde absorbtie plaats hebben?

Van verschillende zijde is beweerd, dat alcohol ijzer zou uittrekken en zoo de mogelijkheid bestond, dat ijzer zou worden aangetoond op plaatsen, waar het oorspronkelijk niet was. Het tegengestelde is echter door Zaleski¹⁾ bewezen; deze kon n.l. in de voor fixatie der lever gebruikte alcohol geen ijzer aantoonen.

Uit alle opgaven kan de conclusie worden getrokken, dat niet alle ijzer wordt aangetoond, zoodat het negatief uitvallen van de reactie niet zeker de aanwezigheid van ijzer zou uitsluiten; colloïden zouden soms het neerslag verhinderen zich te vormen²⁾.

De microchemische reacties zijn alle kwalitatief en niet quantitatief, doch dit is ook een eisch, welke voor dit onderzoek niet gesteld behoeft te worden.

Ten slotte dient gewezen op het bezwaar van hen, welke wijzen op de mogelijkheid van diffusie der ijzerverbindingen, zoodat deze aangetoond zouden worden op plaatsen, waar deze oorspronkelijk niet thuis hoorden. Hiertegen pleit de bovenvermelde ervaring, door Zaleski vermeld, en van mij zelf, n.l. het afwezig zijn van ijzerverbindingen in de gebruikte vloeistof; daartegen pleit ook het verkrijgen van dezelfde resultaten, na verschillende methodes.

Bij de uitvoering van de microchemische reactie op gemaskeerd ijzer, had ik de keus tusschen de Berlijnschblauwreactie en de reactie met zuur ammoniumsulfide.

Ik koos de eerste, daar deze gemakkelijker voor mij was uit te voeren; een groot nadeel van de laatste was voor mij de lange duur, gedurende welke bij 60° C. moest worden verwarmd, hetgeen groote bezwaren in mijn omstandigheden opleverde.

Volgens Schneider³⁾ is de Berlijnschblauwreactie goed te vertrouwen, mits men met niet te sterke concentratie van het zuur werkt en dit niet te lang laat inwerken, daar

¹⁾ Zeitschr. f. Physiol. Chemie. Bd. X. p. 482.

²⁾ Abderhalden. Lehrb. Physiol. Chemie 1906. p. 420.

³⁾ Ook wordt deze reactie aanbevolen door Emich: Lehrbuch der Microchemie.

Abh. d. K. Akad. d. Wiss. Berlin. 1888. p. 58.

anders Berlijnsch blauw uit het bloedloogzout en het zout onder invloed van de zuurstof der lucht zou kunnen ontstaan.

Ik heb de reactie uitgevoerd op de wijze, als door Macallum is aangegeven.

Doorsneden van in absolute alcohol gefixeerde ovaria worden, na van parafine te zijn ontdaan, 3 à 4 dagen in een mengsel gehouden van 4 vol. zuiver zwavelzuur (s.gew. 1.84.) op 100 vol. absolute alcohol, bij een temperatuur van $35^{\circ}\text{C}.$, daarna wordt afgespoeld in absolute alcohol en de doorsneden ongeveer 20 minuten in een versch bereid mengsel van $\frac{1}{2}\%$ zoutzuur en 1.5 % Ferrocyaankalium-oplossing gebracht, ten slotte worden de praeparaten al of niet na eosinekleuring, via alcoholen, xylol, in balsem ingebed.

Het resultaat was, dat alle chromatine en de substantie van den ring van Giardina een positieve reactie gaven op gemaskeerd ijzer.

In verband met de resultaten van het vorige hoofdstuk is het de moeite waard te vermelden, dat de nucleoli een positieve reactie gaven op gemaskeerd ijzer, zooals trouwens reeds door anderen ook is medegedeeld.

Wat de fosforreactie betreft, daarover loopen de meeningen nog veel meer uiteen.

De verschillende methodes om gemaskeerd fosfor aan te toonen, hebben met elkaar gemeen, dat bij alle dit eerst neergeslagen wordt als fosforzuurammonium molybdaat met behulp van ammoniummolybdaat in salpeterzure oplossing.

Lilienfeld en Monti toonen dan het ontstane neerslag aan met pyrogallol; Macallum met 1 % phenylhydrazine-chloride en Pollacci met waterige tinchloruuroplossing.

Het is vrij wel zeker, dat niet alle organisch gebonden fosfor op één dezer wijzen in de weefsels wordt aangetoond; verder wordt er wel aan getwijfeld, in hoeverre de gemaskeerde en niet gemaskeerde fosfor van elkaar te onderscheiden zijn. Ook zijn lang niet alle onderzoekers er van overtuigd, dat de neerslagen op de plaats ontstaan, waar in de levende weefsels de fosfor voorkomt.

In het in alcohol gefixeerd materiaal ontstaan de neerslagen sneller, de kans, dat eerst diffusie plaats heeft, is

daardoor minder. Voor mogelijke verwisselingen met As en Si zal men niet zoo heel dikwijls behoeven te vreezen, zoo ook in dit onderzoek niet.

Ook met ammoniummolybdaat alleen geeft tinchloruur alleen blauwkleuring. Door sommigen wordt de mogelijkheid het ammoniummolybdaat voldoende uit te wasschen wel eens betwijfeld.

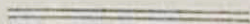
Een nadeel van de pyrogallolmethode is, dat de zwakgroene kleur, welke ten slotte ontstaat, overdekt wordt door de bruine kleur der geoxydeerde pyrogallol of van het gereduceerde ammoniummolybdaat.

Uit het bovenstaande blijkt, dat de reactie van Macallum waarschijnlijk de meest betrouwbare is. Deze heb ik dan ook voor dit doel gekozen.

Niet alles, wat deze reacties betreft, is geheel te overzien, ze geven toch echter een vingerwijzing voor mogelijk verder onderzoek. Hun waarde is m.i. niet gelijk nul te stellen, zooals sommigen doen.

Het bleek nu, dat de chromatine, de ring van Giardina en de nucleoli de reactie op gemaskeerd fosfor positief gaven.

Ten slotte dien ik nog te vermelden, dat in de kerndeelen, waarin de reacties op gemaskeerd ijzer en fosfor positief uitvielen, die op niet-gemaskeerd ijzer en fosfor negatief waren.



Ferment-reacties.

Ter karakteriseering van de bestanddeelen van den kerninhoud van de eicellen der Dytiscidae, bediende ik mij ten slotte ook nog van de fermentwerking van pepsine, trypsine en nuclease.

Pepsine, voldoende aan de eischen, welke de Pharmacopee Ed. IV stelt, werd opgelost in vier verschillende concentraties zoutzuur in sterkte varieerend van 1‰ tot ± 7 ‰. Deze oplossingen werkten gedurende ruim 24 uur in op doorsneden van in alcohol gefixeerde ovaria; daarna werden deze doorsneden na ruime afspoeling in water, gekleurd met haematoxyline-eosine en in balsem ingesloten. In alle praeparaten bleken zoowel de kernchromatine als de ring van Giardina en de nucleoli nog zeer goed te herkennen te zijn en verhielden deze drie kernbestanddeelen zich dus gelijk tegenover de werking van dit ferment.

Reeds meermalen is er op gewezen, dat men na inwerking van dit ferment moest verwachten, een korrelige of vacuolaire structuur der chromatine te zien resulteren, gezien toch het feit, dat door de pepsine het nucleïnezuur niet, de daaraan gebonden histonen, enz. wel opgelost wordt. In de meeste kernen is dit echter aan de chromatine niet, of zoo goed als niet, waar te nemen. Men zou ook kunnen opmerken, dat de histonen in dezen vorm, niet aangetast kunnen worden. Aan den ring van Giardina is genoemd feit dikwijls reeds duidelijk waar te nemen; deze vertoont zich dan n.l. niet meer als een compacte massa, doch als een opeenhooping van korreltjes, die in z'n geheel het uiterlijk van den ring vrij goed bewaard hebben.

Waar er alles op wees, dat we in den ring van Giardina een chromatine, dus nucleïnezuurhoudend lichaam te zien hebben, was het geïndiceerd de reactie met nuclease uit te voeren. Deze reactie, in de botanie het eerst door Oese gebruikt, is in het zoölogisch onderzoek door Van Herwerden

ingevoerd bij haar onderzoek van de nucleïneverbindingen in spermacellen en zeeappel-eieren.

Wanneer we aan de verhouding ferment-substraat denken, door Emil Fischer zoo typisch als een-sleutel-tot-slot-verhouding gekenschetst, dan moeten we een dergelijke reactie wel opvatten als de meest specifieke, welke bestaat. Echter moeten de resultaten uiterst voorzichtig beoordeeld worden en pas een conclusie getrokken na herhaalde vergelijking van praeparaten in alcohol gefixeerd, met gelijk-behandelde praeparaten, welke in gekookte nuclease gelegen hebben en zoodanig behandelde, welke in versche nuclease-oplossing hebben gelegen.

De praeparaten bleven 48 uur in een dergelijke oplossing bij $\pm 37^{\circ}\text{C}$., terwijl gedurende dien tijd deze vloeistof één maal ververscht was. Ook werd thymol bijgevoegd om rotting te voorkomen.

Bij microscopisch onderzoek van de doorsneden, welke in de versche nuclease-oplossing hadden gelegen, bleek nu, dat er een vrij sterke oplossing in de kernen had plaats gehad. De kernen in het spierweefsel waren niet meer te ontdekken, hier en daar was een opening aanwezig, welke nog aan het bestaan ervan herinnerde.

In de kernen der eicellen was de oplossende werking niet zoo sterk geweest. De hoeveelheid van den kern-inhoud was echter sterk verminderd. De ring van Giardina was nergens meer met zekerheid aan te toonen. Ook de nucleoli in den einddraad waren verdwenen. Bij het doorkijken van de praeparaten, welke ter contrôle gedurende 48 uur in gekookte nuclease-oplossing hadden gelegen, ook bij 37°C . met thymoltoevoeging, bleek echter, dat hier, zij het ook in veel geringer mate, oplossing in de kernen had plaats gevonden. Er was echter meer kern-inhoud overgebleven dan in de vorige praeparaten. Bij nauwkeurig toezien bleek mij, dat de oplossende werking niet zoo sterk was geweest als op 't eerste gezicht leek, daar er nog een andere factor in 't spel was geweest, n.l. een sterk verlies van de kleurbaarheid van de basophile substantie. Zoo was er in de kernen van de spiercellen nog tamelijk veel inhoud te

ontdekken, al kleurden zich deze bijna niet meer met haematoxyline.

Ook in de ei- en voedstercellen was meer substantie overgebleven dan in de praeparaten, welke dien tijd in ongekookte nuclease-oplossing hadden doorgebracht, met name was hier en daar een ring van Giardina te ontdekken.

Hoe is de werking van de gekookte nuclease te verklaren? Een sterk zure of alkalische reactie in die mate, dat deze de oplossing veroorzaakte, is uitgesloten, daar de oplossing van de nuclease in gedistilleerd water had plaats gehad.

Een zoo sterke zout-oplossing, dat daaruit de werking te verklaren zou zijn geweest, is ook buitengesloten, gezien de bereiding, waarbij dialyse had plaats gehad. Ten slotte blijft de mogelijkheid over, dat ontleding en oplossing heeft plaats gegrepen tengevolge van in de vloeistof opgetreden rotting. Men zou denken, dat die kans niet zoo heel groot zou zijn, daar de vloeistof tien minuten had gekookt, het weefsel in alcohol gefixeerd was en de dekglazen met spiritus en krijt waren schoon gemaakt en bovendien nog thymol was toegevoegd. Toch acht ik dit de meest waarschijnlijke mogelijkheid, gezien het feit, dat na de 2 dagen in de thermostaat (bij gebrek aan nuclease was deze vloeistof niet ververscht) naast de thymollucht, een zwakke onaangename rottingslucht was waar te nemen.

Helaas ontbrak me de tijd en de gelegenheid dit onderzoek nog eens te herhalen. De gebruikte nuclease was bereid door Dr. Van Herwerden op de wijze, door haar in hare desbetreffende publicaties vermeld¹⁾, door het uit miltperssap met ammoniumsulfaat neer te slaan, en dit neerslag te drogen en voor gebruik 24 uur te dialyseeren; het opgeloste deel van den dialysator-inhoud bevat het werkzame enzym.

Bij aanwending van alkalische trypsine-oplossing bleek deze oplozend op den ring van Giardina en de chromatine te werken.

¹⁾ Arch. f. Zellforschung Bd. X. S. 431.

Berliner Kl. Wochenschrift. 1913. S. 1820.

Anat. Anzeiger 47. 1914. S. 312.

Morphologisch Onderzoek.

Voor een goed begrip van den ring van Giardina en de rol, welke deze in de ovogenese der Dytiscidae speelt, is het natuurlijk niet voldoende, na te gaan, uit wat voor stoffen deze bestaat.

Het is zeer wenschelijk, dat men een begrip heeft van de wijze en het tijdstip, waarop ze ontstaat.

Zooals al wel uit het litteratuuroverzicht is gebleken, bestaat daarover allerm minst eenstemmigheid.

Wanneer we nu het fijnste einde van een eibuis in de doorsnee bekijken, gefixeerd met vloeistof van Petrunkevitch en gekleurd met Delafieldhaematoxyline en eosine, merken we op, dat het einde van de eibuis van den einddraad gescheiden is door uischilvormig gerangschikte platte cellen, waarvan de grootste afmeting dwars door de eibuis loopt. Het centrale gedeelte van de eibuis is opgevuld met twee soorten cellen: cellen met nucleoli en cellen zonder nucleoli.

Uit vroegere onderzoekingen is gebleken, dat deze twee groepen cellen niet uit elkaar ontstaan. Er is ook niets in mijn praeparaten, hetgeen op een verband tusschen deze cellen wijst. Nooit zag ik een overgang in vorm of voorkomen.

Vlak onder de uischilvormige platte cellen aan het einde zien we de twee soorten reeds naast elkaar bestaan. De cellen met den nucleolus vertoonen geheel hetzelfde type als die van den einddraad.

Bovendien moet ik in dit verband herinneren aan het verschillende gedrag van de twee soorten cellen tegenover ammoniak, zooals ik dit aldaar heb beschreven.

De cellen zonder nucleolus, de ovogoniën vertoonen in hun kern twee substanties, ten eerste korrels, zich als chromatine kleurende, welke grootendeels of geheel wandstandig zijn, ten tweede een zeer fijn netwerk, dat zich met protoplasmakleurstoffen kleurt (fig. VI. A).

In dit gedeelte der eibuis, de multiplicatiezône, vermeer-

deren de oogoniën zich door mitose, waarover ik geen bijzondere opmerkingen behoef te maken.

Aan het einde van de multiplicatiezône ziet men echter bijzonderheden, welke voor ons hier van 't grootste belang zijn.

Het zich met protoplasmakleurstoffen kleurend netwerk is niet meer door de geheele cel gelijkmatig verspreid, doch dit begint zich meer en meer tot één gebied samen te trekken, terwijl de substantie, waaruit het bestaat, in hoeveelheid toeneemt (fig. VI B en VI C).

Ten slotte heeft het zich tot één compacte massa samengetrokken, welke zich nog met protoplasmakleurstoffen kleurt, hoewel niet meer in zoo sterke mate, vergeleken met de kleur welke het in vroegere stadia aanneemt; de kleur is wat lichter geworden. In dit stadium ziet men soms nog stukken van het oude netwerk als stralen van den ring van Giardina uitgaan (fig. III en X).

Een enkele maal kan men op dit oogenblik van de ontwikkeling der massa waarnemen, *dat zij is opgebouwd uit evenwijdige strepen*; een uiting van de wijze van ontstaan.

Het toenemen van de hoeveelheid substantie gaat nog door, evenals in het vlak daarop volgende tijdperk, waar de kleurbaarheid voor chromatische kleurstoffen optreedt, welke meer en meer toeneemt, zoodat daarna de ring van Giardina zich zeer donker kleurt met chromatinekleurstoffen en ten slotte alleen door vorm en afmetingen van de overige chromatine is te onderscheiden.

Daar ik me voornamelijk bezig heb gehouden met het onderzoek van den ring van Giardina zal ik de beschrijving van het overige deel der ovogenese buiten beschouwing laten, te meer, daar ik vrijwel accoord ga met de op die punten onderling tamelijk goed overeenstemmende resultaten der vorige onderzoekers.

We zullen nu het resultaat van mijn morphologisch onderzoek vergelijken met hetgeen hierover reeds is gepubliceerd.

De vorige publicaties vertoonden, wat betreft het ontstaan van den ring, onderling al zeer weinig punten van overeenstemming.

Giardina was van meening, dat een aantal chromosomen den ring ging vormen. Hiervoor vind ik, evenmin als Debaissieux of Günthert, eenig argument. De hierboven

vermelde resultaten van mijn onderzoek sluiten deze ontstaanswijze van den ring uit. Tegen de meening van Giardina pleit zeer veel. Het duidelijk zich vormen der ring uit een zich verdichtend acidophil netwerk, dat gedurende die verdichting en daarna in volumen toeneemt en ten slotte basophil wordt, sluit een opbouw door samenvloeiing uit verschillende chromosomen uit. Door deze ontstaanswijze staat ook vast het ontstaan uit een substantie, welke over de geheele kern verspreid is, dus niet, zooals Giardina, het wil gezien hebben, n.l. doordat de chromatine zich in twee gedeelten gaat scheiden, welke naar verschillende deelen der kern gaan, waar de eene helft chromosomen levert, het andere deel zich condenseert tot den ring. Kon men, wanneer de resultaten van Giardina bevestigd waren geworden, in diens publicatie, met recht een bestrijding zien van de hypothese van de zelfstandigheid der chromosomen, in mijn onderzoek is evenmin als in dat van Debaissieux en Günthert iets, dat met deze hypothese in tegenspraak is.

Wat betreft het feit, dat het aantal chromosomen ook na het ontstaan van den ring hetzelfde is, als voor dien tijd, kan ik me geheel bij de vorige onderzoekers aansluiten.

Debaissieux vond, dat een naast de chromosomen voorkomende acidophile substantie den ring gaat vormen.

Günthert ten slotte ziet door de chromosomen korreltjes afgegeven worden, welker samenvloeiing den ring doet ontstaan.

Het is duidelijk, dat mijn resultaten het dichtst staan bij die, welke door Debaissieux zijn verkregen.

Ook ik vind, evenals Debaissieux, dat de ring van Giardina uit een achromatische substantie ontstaat. Mij is het mogelijk geweest het ontstaan hiervan uit het achromatische kernnetwerk te volgen. Debaissieux nam deze achromatische substantie pas waar, naast de reeds voltooide chromosomen. Soms nam hij het voor 't eerst waar als een vlokkige massa; het is vrij zeker, dat het achromatische netwerk zich dan al belangrijk verdicht had.

Wat betreft het „corps très chromatique”, hetwelk Debaissieux vermeldt, ben ik van meening, dat we hier te doen hebben met echte chromosomen. Niet alle chromosomen bij de Dytiscidae hebben den vorm van kleine klompjes,

andere zijn iets langer, doch hebben ook een plompe gestalte, terwijl een enkele slank draadvormig is. Herhaalde malen heb ik dit duidelijk bij mitoses kunnen waarnemen.

Geen wonder dus, dat Debaissieux vindt, dat het „corps très chromatique” gedurende de mitose zichtbaar blijft, zich uitrekt en zooals hij soms waarnam, in tweeën breekt en een stuk naar iedere pool afgeeft. Ik moet echter ontkennen ooit met zekerheid te hebben waargenomen, dat een dergelijk stuk in z'n geheel naar de eene pool ging. Dat zich een dergelijk feit soms schijnt voor te doen is duidelijk, bij het groote aantal, n.l. pl.m. 40 chromosomen, bij *Ditiscus*.

Ook een in serie gesneden praeparaat levert dan niet altijd volledig zeker uitsluitel.

Bovendien bestaat de mogelijkheid, dat wel eens een afgesneden stuk van den ring van Giardina in een stadium, dat deze zich met kernkleurstoffen reeds kleurde, werd waargenomen. Natuurlijk ging dan het geheele lichaam naar één pool.

Ten slotte moeten we in deze ovaria altijd denken aan de zoo veelvuldig voorkomende pathologische processen.

Debaissieux vraagt zich af, of er eenig verband zou bestaan tusschen het „corps très chromatique” en de „substance achromatique extra chromosomique”; dit nu is volgens mij beslist te ontkennen, zooals ook uit hetgeen hier boven uiteengezet is, blijkt.

Alleen voor het geval, dat als „corps très chromatique” een stuk van den ring van Giardina is waargenomen, is aan te nemen, dat er verband met de „substance achromatique extrachromosomique” bestond.

Günther's meening, dat de ring van Giardina gevormd zou worden uit kleine chromatinekorreltjes, welke afgegeven zouden worden door de chromosomen, kan ik in 't geheel niet deelen. Nooit nam ik daar ook slechts het minste van waar. Men bemerkt wel plaatselijke verdikkingen in 't achromatische netwerk waaruit de ring zich gaat vormen, doch dit ziet men zoo vaak in netwerken in gefixeerde praeparaten. Ten slotte worden toch altijd de min of meer gepraeformeerde celbestanddeelen neergeslagen. Wel neem ik met Günther aan dat de sub-

stantie van den ring zich na zijn eerste optreden nog vermeerderd.

Wanneer eenzelfde eibuis over een groote uitgestrektheid overlangs is getroffen, is dat een feit, dat zeer gemakkelijk is te constateeren.

Op welke wijze wordt de ring van Giardina bij de differentiatiedeelingen naar de pool gebracht?

Volgens Giardina zou dit niet gebeuren door de spoeldraden, zooals bij de chromosomen, en op grond daarvan meent hij in 't algemeen de functie der spoeldraden te mogen betwijfelen.

Is het nu wel zoo zeker, dat de spoeldraden zich niet aan den ring van Giardina hechten?

Wanneer men praeparaten en ook de afbeeldingen van Giardina en Günthert bekijkt, merkt men op, dat hier toch wel degelijk spoeldraden in de richting van den ring verlopen.

Het aanhechten der draden aan den ring is mij echter niet gelukt met zekerheid vast te stellen. Wel pleit hiervoor, dat de ring van Giardina zich gelijktijdig met de chromosomen naar de pool begeeft. Men ziet ze n.l. altijd met de dochterchromosomen op dezelfde hoogte blijven.

Ten slotte nog enkele opmerkingen.

Günthert beeldt in fig. 2 een doorsnede af, voorstellende den dwars doorgesneden einddraad.

In deze figuur is duidelijk een centrale as afgebeeld, welke hij ook beschrijft.

Daar ik nu nooit deze centrale as te zien kon krijgen, heb ik dit nauwkeuriger nagegaan.

De twee eenigste mogelijkheden volgens mij zijn: of Günthert beeldt hier een dwarse doorsnee door een klierbuis af, of door onvoldoende differentiatie is het centrum van den einddraad gekleurd gebleven. Verder beeldt Günthert een eibuis af (zijn fig. 1b), welke over een bepaalde uitgestrektheid is opgevuld door kleine epitheelcellen. Is dit zooals Günthert meent een pathologische vorming?

Deze cellen komen in alle opzichten (afmeting, nucleolus) overeen met de follikelepitheelcellen. Het is m.i. zeer waarschijnlijk, dat op dit punt de doorsnee door de cellen, welke de ei- en voedstercellen omgeven, heeft geloopt. Hiervoor pleit ook het feit, dat op de plaats der kleine cellen de eibuis dunner is — daar de doorsnee meer naar buiten is gevallen, waar de dikte der eibuis kleiner is — en dat de stadia in linker- en rechterdeel van de teekening, ter weerszijde van de kleinere cellen, zoo veel in ontwikkeling van elkaar verschillen.

Ten slotte dien ik op te merken, dat, wat de pathologische ei- en voedstercellen betreft, ik deze altijd heb aangetroffen in eibuizen, welke over een bepaalde uitgestrektheid in alle cellen pathologisch veranderd waren, dus niet, zooals andere onderzoekers opgeven, alleen enkele rosetten in een eibuis en de rest normaal.

Spelen bij deze pathologische processen misschien de vrij dikwijls voorkomende parasieten, welke men in verschillende weefsels van het abdomen aantreft, een rol?

Twee soorten parasieten waren te onderscheiden: de eerste soort scheen mij een ontwikkelingsstadium van een parasitischen worm, de tweede soort een eencellige, in cysten vereenigd. Deze laatsten herinnerden in vorm aan de parasitische *Monocystis agilis* der regenwormen.

Sommige onderzoekers meenden, dat het vooropgaan van de eicel van de rosette in de eibuis de oorzaak van de pathologische verandering zou zijn. Ik zag echter zeer ver ontwikkelde rosetten met de eicel voorop, welke niets abnormaals vertoonden.

Beteekenis van den ring van Giardina.

Nu we op zoo verschillende wijzen de eigenschappen en de wijze van ontstaan van den ring van Giardina hebben leeren kennen, rijst vanzelf de vraag, wat is de beteekenis van dit lichaam?

Nadat ik in den aanvang van mijn onderzoek kennis had genomen van de verschillende vroeger gedane onderzoekingen en geuite hypothesen, scheen het me, dat de kwestie draaide om: chromatine of nucleolus. Toen ik echter kennis had gemaakt met het onderzoek van Grosz, waarin deze o.a. tot de conclusie komt, dat de substantie van den nucleolus niet zooveel verschilt van de chromatine als vroeger wel werd gemeend, dikwijls zoo niet altijd identiek scheen te zijn, werd deze tegenstelling weggevaagd.

Ik heb daarom, zooals uit het voorgaande blijkt, mijn aandacht ook aan den nucleolus geschonken, te gemakkelijker was dit, waar de z.g. follikelepitheelcellen en de cellen van den einddraad van een zeer duidelijke zijn voorzien.

Daarbij is gebleken, dat we uit de oplosbaarheidsreacties en de fermentreacties de conclusie kunnen trekken, dat zoowel de nucleoli als de ring van Giardina zich verhouden als de chromatine der celkern.

Bovendien bevatten alle drie substantie's gemaskeerd Fe. Zolang ons dus niets naders bekend is omtrent de samenstelling der verschillende kernbestanddeelen, moeten we den ring van Giardina en ook de nucleoli opvatten als bijzondere chromatinesoorten.

Echter behooren zoowel de ring van Giardina als de nucleolus niet tot die chromatinesoorten, welke altijd door aan de volgende celgeneratie worden overgegeven.

Een nucleolus zien we bij elke mitose verdwijnen om in de dochtercellen nieuw gevormd te worden, de ring van

Giardina zien we uit een achromatisch netwerk ontstaan, om gedurende eenige celgeneratie's telkens in zijn geheel aan één dochtercel te worden overgegeven; daarna zien we echter deze substantie uitéénvallen en is ze verder niet meer van de overige kernbestanddeelen te onderscheiden.

We hebben dus hier te maken met een substantie, welke zich geheel anders gedraagt als die chromatine, waaraan men gewoon is de functie van het overdragen der erfelijke eigenschappen te verbinden, welke gedurende de geheele kiembaan zonder ophouden aan de dochtercel wordt overgegeven, terwijl we de substantie in kwestie nieuw gevormd zien worden op de basis van een achromatische stof.

Hiermede vervalt de opvatting, het eerst door Boveri verdedigd, dat hier diminutie zou plaats hebben; dan toch zou men de substantie van den ring moeten zien ontstaan uit deelen der chromatine, zooals Günthert meende, dat dit het geval was, doch hiervan is niets te ontdekken.

Ja, bekijkt men zelfs nauwkeurig de teekening van Günthert (fig. 13—20), dan merkt men op, dat deze zelf het ontstaan van den ring afbeeldt, als te geschieden uit een achromatisch netwerk, dat hier en daar in 't verloop der draden en op de kruispunten verdikkingen vertoont, waar Günthert den nadruk op legt. Van een ontstaan van chromatinekorrels rondom de chromosomen heen, waar Günthert van spreekt en waar hij waarschijnlijk op gekomen is na het lezen van de theoretische overwegingen van Boveri, is in zijn afbeeldingen niets te zien.

Indien het zou gelukken het ontstaan van den ring aan te toonen uit een „substance extérieure aux chromosomes”, zooals ik, als boven beschreven, bij mijn onderzoek heb gevonden, dan durft Debaissieux de diminutie te ontkennen.

Resumeerende komen we tot de conclusie, dat de ring van Giardina niet ontstaat uit een aantal chromosomen, zooals Giardina aannam, noch uit een gedeelte van chromosomen, zooals Boveri verdedigde en Günthert beschreef.

We kunnen dus den ring niet tot de z.g.n. erfelijkheids-chromatine rekenen, vooral ook daarom niet, omdat we de substantie in de cel nieuw zich zien vormen en later niet

meer kunnen onderkennen, verhoudingen, welke we met onze tegenwoordige kennis niet van een erfelijkheidsdrager mogen verwachten.

Bovendien pleit ook nog tegen de functie van den ring van Giardina als erfelijkheidsdrager, het ontbreken van een dergelijke substantie in de spermatogenese der Dytiscidae ¹⁾.

We zijn toch gewoon, dat meestal van vrouwelijken en mannelijken kant dezelfde hoeveelheid kernsubstantie wordt bijeengebracht in de bevruchte eicel. Uitgenomen de uitzonderingen als b.v. het heterochromosoom.

We hebben hier ook niet te doen met een nucleolus in de gewone beteekenis van 't woord, daar een dergelijk lichaam tijdens de mitose verdwijnt en de ring blijft bestaan.

Wanneer we nu bedenken, dat men gewoon is tijdens de ovogenese een nucleolus waar te nemen, welke hier ontbreekt, en dat de eicel andere eischen aan zijn kern heeft te stellen, dan de voedstercellen in verband met den opbouw van reservestoffen, *komen we tot de conclusie, dat we te maken hebben met een stof, noodig voor de eicel alleen, niet voor de voedstercellen, en dan pleit het meeste er voor de stof, waaruit de ring van Giardina bestaat, te beschouwen als trophochromatine.*

¹⁾ - Schäfer. Die Spermatogenese von Dytiscus, Zool. Jahrb. 1907.

De Mitochondriën.

Mijn onderzoek van de mitochondriën ving ik aan, terwijl ik bekend was met en overtuigd van de rol, welke de mitochondriën in de histogenese spelen¹⁾. Dit is door zóóvele, ook onbevooroordeelde, onderzoekers aangetoond en in zóó verschillende weefsels (spierweefsel, bindweefsel, zenuwweefsel, enz. enz.), dat dit geen verder betoog behoeft.

Echter kon ik uit eigen onderzoek geen standpunt innemen tegenover de hypothese van Benda en Meves, dat de mitochondriën een rol bij de erfelijkheidsoverdracht zouden spelen.

Hier, bij het voorkomen van ei-, naast voedstercellen, cellen met gemeenschappelijken oorsprong, waarvan de eene wel, de andere groep geen erfelijkheidssubstantie aan een volgende generatie overdraagt, scheen mij dit een gunstig onderzoeksobject, naar het feit, in hoeverre de mitochondriën bij de erfelijkheidsoverdracht betrokken zijn.

Ik fixeerde ovaria volgens Altmann, Kopsch, Regaud, en Champy en kleurde volgens Altmann, Regaud, Cowdry, Bensley en Kull.

De methode van Benda heb ik niet gebruikt, daar deze te omslachtig is, om bij beperkten tijd uit te voeren.

De meeste, van boven vermelde, door mij gebruikte methoden hebben het nadeel, dat bij het uitwasschen en passeeren der stijgende alcoholen voor de ontwatering, de kleuring nog sterk wordt beïnvloed, door onttrekken van kleurstof.

Over 't algemeen was de kleuring van Altmann, aangewend na fixatie volgens Altmann, het geschiktste uit te voeren, wanneer men tenminste in deze methode de noodige oefening bezit, noodzakelijk om betrouwbare uitkomsten te krijgen. Deze kleuring is ook uit te voeren na fixatie volgens Champy, welke fixatie veel beter is dan

¹⁾ Anat. Anzeig. Bd. 50. 1917. S. 393.

die volgens Altmann. Echter is de differentiatie tusschen protoplasma en mitochondriën niet zoo duidelijk, als na Altmann-fixatie.

Voor de kleuring werden de praeparaten eerst nog gebleekt met kaliumpermanganaat 0.25 % en Pallscheoplossing; daarna kwamen de praeparaten in 2.5 % kaliumbichromaat.

Deze voorbehandeling had ten gevolge, dat de mitochondriën veel beter de zuurfuchsine vasthielden en de tegenstelling in kleur tusschen mitochondriën en protoplasma veel grooter was.

Over de mitochondriën der cellen in de eindkamers valt niets bijzonders te vermelden. Er is geen enkele typische regelmatigheid waar te nemen, behalve het bekende feit, dat de mitochondriën zich tijdens de mitose meer aan de polen der deelingsfiguren ophoopen, doch dit is een zeer algemeen voorkomend feit, dat de meeste in het protoplasma voorkomende korrels onder invloed der centra vertoonen; zooals dooierkorrels, pigmentkorrels als in de door Ballowitz veelvuldig onderzochte astrocyten der visschen, enz.

Op deze wijze, het zich richten naar de „krachtlijnen”, zijn volgens mij ook de gedragingen te verklaren van de lange mitochondriën, zooals zij b.v. in de spermatogenese van Blaps, door D u e s b e r g zijn beschreven,

Ook in de rustende cel zijn zij op bepaalde wijze om het centrosoma gegroepeerd, hetgeen de z.g. „Nebenkern” verklaart. Dat dit ook geen specifieke eigenschap is der mitochondriën, moge blijken uit een onderzoek, dat ik reeds voor eenige jaren naar aanleiding van deze kwestie instelde.

Ik spoot Oost-Indische inkt in de lymphzak van kikkers en onderzocht na verschillende tijden de leucocyten uit het bloed. Men kan dan soms waarnemen, dat op de plaats, waar we uit de onderzoekingen van Weidenreich weten, dat zich het centrosoma bevindt, n.l. in het gebied, waar de breedste protoplasmastroom is, in een inbochting van de kern, zich een pikzwarte als een moerbeivormige hoop korrels van de Oost-Indische inkt ligt.

Zoo vond ik ook in de eosinophile witte bloedcellen van

de kikkerlarve tijdens de metamorphose, de meeste eosinophile korrels om het centrosoma. Ook bij de vlieg vond ik in de phagocyten tijdens de metamorphose dergelijke ophooping van afbraakproducten op die plaats in de cel.

Van een bepaalde differentiatie van ei- en voedstercellen wat de mitochondriën betreft, was dus niets te vinden.

Het eenige opmerkelijke feit in deze nog jonge stadia gedurende de differentiatiedeelingen is, dat de cel, welke een deel der toekomstige eicel is, veel minder mitochondriën bevat dan de voedstercellen.

Ja, in enkele gevallen is het mij niet gelukt in toekomstige eicellen gedurende de differentiatie of in zeer jonge eicellen, mitochondriën met zekerheid aan te toonen. Zoodat dit dan een analoog geval zou zijn als de enkele in litteratuur vermelde mitochondriënlooze mannelijke geslachtscellen.

In wat oudere stadia met geheel gevormde rosetten valt terstond een zeer typische verdeling der mitochondriën in het cytoplasma op, zoowel in ei- als in de voedstercellen.

Deze zijn nu niet meer gelijkmatig over het geheele cellichaam verdeeld, maar hebben zich bijna geheel samengetrokken in de eicel, op dat gedeelte van het plasma, dat aan de voedstercellen grenst; in de voedstercellen aan dien kant van de kern, waar het cytoplasma het meest nabij de eicel ligt (fig. XV).

In nog andere rosetten wordt de verdeling der mitochondriën zeer standvastig: een dunne laag mitochondriën om de kern van de eicel. Het lichaam van de voedstercellen is er geheel mee opgevuld, behalve een dunne laag, waar bijna geen mitochondriën liggen aan den buitenrand van de cel (fig. XVI).

Doch niet in alle rosetten doet zich dezelfde verspreiding van de mitochondriën als hierboven beschreven voor.

Er zijn n.l. tamelijk veel rosetten, welke een zeer dichte opeenhooping van mitochondriën vertoonen, zoodat het geheele cellichaam intens rood gekleurd is. Het eigenaardige van dit verschijnsel is, dat van een dergelijke roset ook *alle* cellen, nooit één voedstercel en ook niet de eicel uitgezonderd,

deze sterke kleuring vertoonen (fig. XIV). Het is zeer voor de hand liggend aan te nemen. dat deze ophooping der mitochondriën in *alle* cellen van een roset, met een bepaalden stofwisselingstoestand samenhangt.

Wanneer we in verband met het bovenstaande nagaan, hetgeen over de mitochondriën tegenwoordig bekend is, blijkt dit allermint een steun te zijn voor de theorie van Benda en Meves, waarbij zij de mitochondriën een rol toeschrijven als erfelijkheidssubstantie.

Veeleer komt men bij het zien dezer praeparaten tot de conclusie, dat in dit geval de mitochondriën een rol spelen, welke in één of anderen samenhang staat met de voedings- en stofwisselingsprocessen; de mitochondriën zijn toch altijd daar het meest opgehoopt, waar we reden hebben aan te nemen dat het transport en omzetting van voedingsstoffen in de sterkste mate geschiedt.

Op de plaatsen, waar ik, als boven beschreven, in ei- en voedstercellen een ophooping van mitochondriën waarnam, vond Korschelt in dezelfde cellen amoëboïde uitloopers aan de kern van de eicel en een voedselstroom, welke zich van de voedstercellen naar den daarheen gekeerden kant van de eicelkern uitstreckte. Ook Günthert beschrijft deze toestanden en beeldt ze af.

Bovendien pleit het soms met vrij groote zekerheid afwezig zijn in de eicellen der mitochondriën absoluut tegen de door velen met Benda en Meves aangenomen opvatting, dat de mitochondriën een dergelijke rol zouden vervullen, als erfelijkheidsdragers als tot heden van de chromosomen werd aangenomen.

Gaan we nu na, hoe de hypothese van de rol als erfelijkheidsdragers van de mitochondriën ontstaan is.

Daarvoor moeten we terug gaan tot een publicatie van Benda uit het jaar 1899¹⁾. Na op het feit te hebben gewezen, dat mannelijke en vrouwelijke geslachtscellen mitochondriën bevatten en dat de mitochondriën uit de mannelijke geslachtscellen bij de bevruchting ook het ei binnendringen, zegt hij:

¹⁾ Verh. Phys. Gesellsch. Berlin 1899. 1.

„Diese Feststellung, die mir als das dringendste Postulat erscheint, würde den Schlusstein in der Kennzeichnung der Mitochondrien als Zellorgan abgeben und einem dem zelleib angehörenden Bestandteil die Rolle eines der Faktoren der Vererbung vindizieren, ...”

Na hem was het v.n.l. Meves, welke als verdediger van deze hypothese optrad. Ook hier een tot het antwoord geraken door uitsluiting, getuige de volgende aanhaling uit het overzicht van Duesberg van 1911¹⁾:

„Eine Rolle des Schwanz fadens, der Centriolen und des Perforatoriums bei der Vererbung ist sicher ausgeschlossen. Es bleibt alsdann ein absolut konstantes Element *von unbekannter Funktion*²⁾, die plastochondriale Scheide: Meves sieht hierin die idioplasmatische Substanz des Protoplasma's.”

Meves grondde zijn verdediging der hypothese, behalve op de aanwezigheid van mitochondrien in ei- en spermacel en het indringen van die der laatste in de eerste, op de rol, welke de mitochondrien in de histogenese vervullen.

Nu zijn dit feiten, welke ieder die eenigszins met deze histologische onderzoekingsmethoden bekend is, zal toegeven. Het is nu slechts de vraag, laten deze feiten geen anderen uitleg toe?

Meer en meer vindt tegenwoordig de meening ingang, dat ook het protoplasma een rol speelt bij den erfelijkheids-overgang. Waarvoor ik slechts behoef te herinneren aan de waarnemingen van Conklin, aan het ei van Cynthia, welke 6 verschillende plasmazônes in de eicel waarnam, welke ieder een aparte rol speelden bij de embryovorming, de experimenten van Godlewski, welke bij kruisbevruchting van kernlooze ei-fragmenten waarnam, dat gedurende het eerste tijdperk van de ontwikkeling de moederlijke eigenschappen uitsluitend optraden, en de denkbeelden door Brachet verkondigd in zijn werk: „L' Oeuf et les Facteurs de l' Ontogénèse”.

¹⁾ Ergebn. Anat. u Entw.gesch. 1911. 20.

²⁾ Cursiveering van mij.

Doch al speelt nu het cytoplasma een rol bij de erfelijkheidsoverdracht, wat bewijst dan nog, dat het de mitochondriën zijn, welke deze rol te beurt valt?

De bovenaangehaalde waarneming van Conklin bewijst m. i. veel eerder, dat het 't geheele plasma als zoodanig is, dat daar een rol speelt.

Bovendien pleit nog tegen deze, aan de mitochondriën toe te kennen, functie de zeer toevallige en geenszins zoo preciese verdeeling van de mitochondriën over de dochtercellen, als bij de chromosomen plaats heeft; dat er zeer zeker geen reductie plaats heeft wat de mitochondriën betreft in de vrouwelijke eicel gedurende de rijpingsprocessen; dat er waarschijnlijk in sommige mannelijke en vrouwelijke geslachtscellen op bepaalde stadia geen mitochondriën zijn aan te toonen.

Volgens mij is daarom een andere opvatting der mitochondriën veel waarschijnlijker, n.l. deze: bij de vorming in de cellen der zoo verschillende producten van het cytoplasma als spier-, bindweefsel-, zenuwfibrillen, vetkorrels, secreetgranula, pigmentkorrels, enz. *doorloopt de protoplasmatische substantie een stadium, aan al deze vormsels gemeen, tijdens welke het de eigenschap heeft zich op de voor de mitochondriën aangegeven wijze te kleuren.*

Een deeling van de mitochondriën is nooit aangetoond, zoo velen zijn oorspronkelijk niet in de cel aanwezig, dat daaruit al die korrels en fibrillen gevormd zouden kunnen worden; daarom moeten we een ontstaan der mitochondriën ter plaatse aannemen.

Stellingen.

I.

De onderstelling van Boveri, dat in de ovogenese der Dytiscidae diminutie plaats heeft, is onjuist.

II.

De chondriosomen-erfelijkheidshypothese mist allen steun.

III.

De wijze, waarop door de faculteiten prijsvragen worden uitgeschreven, heeft weinig zin.

IV.

Wanneer bij verkregen, of aangeboren onbruikbaarheid van de blaas, de ureteren op een andere plaats moeten worden ingeplant, is een dundarmilis daarvoor te verkiezen.

V.

Het is in 't algemeen wenschelijk, dat een gerechtelijke sectie, niet aan een practiseerend medicus worde opgedragen.

VI.

Bij puerperale sepsis, is hysterectomy vaginalis of abdominalis, niet aangewezen.

VII.

Het gebruik van lithiumhoudend water, als therapie bij arthritis urica, is op theoretische gronden niet te verdedigen.

VIII.

De biometrische methode, is voor de behandeling van erfelijkheidsvraagstukken, alleen toe te passen op biologisch volledig geanalyseerd materiaal.

IX.

Voor het aantoonen van sporen bloed, in de ontlasting bij ziekten van de maag en het darmkanaal, is de spectroscopische methode het meest aan te bevelen.

X.

Ter genezing van acute iritis, beproeve men melkinjecties.

XI.

Niet alle vormen van neurasthenie, behandel men met de arbeidstherapie.

XII.

Bij tonsillitis chronica, is tonsillectomie aangewezen.

Afbeeldingen.

FIG. I.	Kern in eindkamer, fixatie 3 % azijnzuur.					
" II.	"	"	"	"	"	daarna vloeistof van Petrunkewitch.
" III.	"	"	"	"	"	idem.
" IV.	"	"	"	"	"	idem.
" V.	"	"	"	"	"	idem.
" VIa, VIb, VIc.	fixatie in vloeistof v. Petrunkewitch (warm).					
" VII.	Na inwerking 5 % N H ₃ .					
" VIII.	"	"	"	"	"	
" IX.	"	"	3½ %	Na Cl. (24 uur).		
" X.	"	"	3½ %	H Cl. "		
" XI.	"	"	1¼ %	Na ₂ CO ₃ . "		
" XII.	"	"	3 % azijnzuur, fixatie Petrunkewitch.			
" XIII.	"	"	5 % soda. (30 uur).			
" XIV, XV en XVI	na fixatie volgens Altmann en Mitochondriënkleuring Altmann.					

Nevenstaande plaat, vervaardigd naar mijn teekeningen, bestemd voor de publicatie in de Archives de biologie, werd door de welwillendheid van Prof. BRACHET, voor dit proefschrift ter mijner beschikking gesteld.



Fig. 1.



Fig. 2.



Fig. 3.



Fig. 4.



Fig. 5.



Fig. 6.



Fig. 7.



Fig. 10.



Fig. 11.



Fig. 8.





Fig. 9.



Fig. 12.



Fig. 14.



Fig. 13.



Fig. 15.



Fig. 16.

