

**HET ONTSTAAN VAN MISVORMINGEN
VAN HERSENEN EN BINNENOOR
BIJ EMBRYONEN VAN DE MUIS NA
RÖNTGENBESTRALING**

J. VAN DER BORDEN

HET ONTSTAAN VAN MISVORMINGEN
VAN HERSENEN EN BINNENOOR
BIJ EMBRYONEN VAN DE MUIS NA
RÖNTGENBESTRALING

AKADEMISCH PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR IN DE GENEESKUNDE

AAN DE UNIVERSITEIT VAN AMSTERDAM,

OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS MR. J. V. D. HOEVEN,

HOOGLEERAAR IN DE FACULTEIT DER RECHTSGELEERDHEID,

IN HET OPENBAAR TE VERDEDIGEN IN DE AULA VAN

DE UNIVERSITEIT (TIJDELIJK EVANGELISCH-LUTHERSE KERK,

INGANG SINGEL 411, HOEK SPUI) OP DONDERDAG

3 DECEMBER 1964, DES MIDDAGS TE 4 UUR.

DOOR

JAN VAN DER BORDEN

GEBOREN TE DEN HELDER

1964

DRUKKERIJ HOLLAND N.V. - AMSTERDAM

HET ONTSTAAN VAN MISVORMINGEN VAN HERSENEN
EN BINNENOOR BIJ EMBRYONEN VAN DE MUIS
NA RÖNTGENBESTRALING

Promotor: PROF. DR. J. VAN LIMBORGH

*Dit proefschrift werd bewerkt vanuit het Anatomisch-Embryologisch laboratorium van
de Universiteit van Amsterdam
(Directeur Prof. Dr J. van Limborgh)*

VOORWOORD

Het verschijnen van dit proefschrift biedt mij een welkome gelegenheid om U, Hoogleraren, Lectoren en Docenten van de Natuurfilosofische en Geneeskundige faculteiten van de Universiteit van Amsterdam, mijn dank te betuigen voor het van U genoten onderricht.

Hooggeleerde Van Limborgh, Hooggeachte Promotor, hoewel een groot deel van het voor dit proefschrift verrichte experimentele onderzoek niet onder Uw directe leiding tot stand is gekomen, was U dadelijk bereid om als promotor op te treden. De drukke werkzaamheden, die behoorden bij de aanvaarding van het ambt van hoogleraar, hebben U niet verhinderd om de probleemstelling van dit onderzoek in korte tijd helder te overzien. Zeer dankbaar ben ik voor de wijze waarop U mij hebt bijgestaan bij het bewerken van dit proefschrift. Voor de vele waardevolle adviezen, de kritiek en de levendige belangstelling ben ik U zeer erkentelijk.

Zeergeleerde Trampusch, ik beschouw het als een voorrecht, dat U mij de gelegenheid hebt geboden, mij in één van de vele embryologische problemen te verdiepen. De grote waardering, die U heeft voor het experimentele onderzoek, heeft zeker niet in de laatste plaats bijgedragen aan het tot stand komen van dit proefschrift. Voor al hetgeen ik van U mocht leren wil ik mijn grote erkentelijkheid betuigen.

Geleerde Verwoerd, beste Carel, hartelijk dank voor de vele raadgevingen, voor het kritisch doornemen van het manuscript, maar bovenal voor de ondervonden vriendschap. Ook ik wil de hoop uitspreken dat ik mij nog eens op soortgelijke wijze nuttig kan maken.

Geleerde Smit, de door U, op enthousiaste en nauwgezette wijze vervaardigde wasmodellen, zijn mij bij de bestudering van de gevonden misvormingen tot grote steun geweest. Voor deze prettige medewerking, mijn oprechte dank.

Een speciaal woord van dank aan allen die mij bij het technische gedeelte van het onderzoek ter zijde hebben gestaan. De heer Mijzen voor de assistentie bij de operaties en de histologische bewerking van het materiaal. Mevrouw Fulda-Cohen, voor het kleuren van de histologische series. De heer Sturms voor de uitstekende wijze waarop hij de proefdieren heeft verzorgd. De heren De Ruyter en De Vries, voor de hulp bij het verzorgen van het illustratieve gedeelte van het manuscript. Mejuffrouw Van Doorn ben ik dank verschuldigd voor de prettige samenwerking bij het verzamelen van de literatuurgegevens.

Hun, die gedurende de vele jaren op het Anatomisch-Embryologisch Laboratorium mijn mede-assistenten waren, betuig ik gaarne mijn erkentelijkheid voor hun vriendschap en samenwerking.

Een bijzonder woord van dank wil ik richten tot mijn ouders en mijn vrouw, die mij in staat hebben gesteld mijn studie te voltooien. Ik dank hen oprecht voor het vertrouwen dat zij steeds in mij hebben gesteld.

Aan mijn ouders
Aan mijn vrouw

INHOUD

INLEIDING	1
HOOFDSTUK I Literatuuroverzicht en vraagstellingen:	
A. Röntgenstralen en misvormingen van de hersenen	4
B. Misvormingen van het binnenoor	10
HOOFDSTUK II Materiaal en onderzoeksmethode:	
A. Proefdieren	13
B. Proefopstelling	14
C. Operatie en bestraling	15
D. Fixatie en histologische bewerking	19
HOOFDSTUK III Waarnemingen over het ontstaan van misvormingen van de hersenen.	21
HOOFDSTUK IV Waarnemingen over het ontstaan van misvormingen van het binnenoor	42
HOOFDSTUK V Beschouwingen	51
SAMENVATTING	66
SUMMARY	70
LITERATUUR	73

INLEIDING

Bij de opleiding van studenten in de geneeskunde wordt als onderdeel van de studie voor het kandidaats-examen ook de embryologie onderwezen. Zowel tijdens de colleges, als op de praktische cursus wordt aandacht besteed aan de bevruchting, de primitieve ontwikkeling en de differentiatie van de verschillende orgaansystemen.

Het accent valt hierbij – evenals in vrijwel alle leerboeken – op de normale ontwikkeling; slechts bij uitzondering wordt aandacht geschonken aan de teratologie.

Na het kandidaats-examen komen bij het onderwijs in de pathologische anatomie teratologische onderwerpen zeker ter sprake, al staat hierbij de beschrijving, en niet het ontstaan van de misvormingen, de teratogenese, op de voorgrond.

Tijdens de klinische stages zal het relatieve tekort aan kennis betreffende de teratogenese de student zeker opvallen, daar hij bijvoorbeeld in de kinderkliniek en de verloskundige kliniek met vele types van aangeboren afwijkingen wordt geconfronteerd. Dit laatste komt niet alleen, omdat deze klinieken universitaire centra zijn, waar allicht een cumulatieve optreden, maar vooral ook omdat het relatieve belang van dergelijke misvormingen zo sterk toeneemt. Zo werd volgens het Jaaroverzicht Bevolking en Volksgezondheid 1962, als doodsoorzaak van zuigelingen in het eerste levensjaar in 29.2 % der gevallen een aangeboren misvorming opgegeven, terwijl van elke tien kinderen, die in dat jaar levenloos ter wereld kwamen, er één dergelijke afwijkingen toonde. En voorts blijven dank zij nieuwe therapieën weliswaar steeds meer kinderen met aangeboren misvormingen in leven, maar een herstel van de normale anatomische verhoudingen is tot op heden lang niet altijd, of slechts zeer ten dele mogelijk.

Het onderzoek naar de genese van deze misvormingen – met als uiteindelijk doel de preventie – is dan ook de laatste tijd met kracht ter hand genomen. Uit de resultaten van experimenten bij proefdieren is gebleken, dat bij die genese zowel endogene (erfelijke) als exogene (milieu-) factoren een rol kunnen spelen alsmede een combinatie van

deze beide. Bovendien kon worden vastgesteld, dat totaal verschillende agentia, mits in de juiste dosering toegediend, dezelfde misvormingen doen ontstaan; verder konden de embryonale ontwikkelingsperioden worden afgegrensd, waarbinnen een agens in staat is een bepaalde afwijking te veroorzaken.

Van klinisch standpunt uit bezien zijn dit reeds belangrijke gegevens, want zij hebben nieuwe perspectieven geopend voor de preventieve geneeskunde. Embryologisch bezien zijn er echter nog tal van belangrijke morfo-genetische problemen onopgelost; en het is niet onmogelijk, dat dit tekort aan inzicht een van de voornaamste redenen is, waarom het onderwijs in de teratogenese nog zo beperkt is.

In deze studie wordt de morfogenese van enkele misvormingen van de hersenen en van het binnenoor nader bestudeerd. De bij het onderzoek gebruikte embryonen van de muis tonen naast de misvormingen, die hier zullen worden beschreven nog vele andere afwijkingen; deze worden echter met opzet buiten beschouwing gelaten, omdat het bij deze studie niet in de eerste plaats ging om de registratie van het totale aantal — in een bepaalde ontwikkelingsfase — te verkrijgen misvormingen. De bedoeling was de genese der aangeduide misvormingen nader te analyseren.

Het is niet toevallig, dat juist misvormingen van de hersenen tijdens hun ontstaan werden bestudeerd; immers, de frequentie hiervan is bij de levenloos ter wereld gekomen kinderen zeer hoog; in 1962 niet minder dan 77 %. Dat bovendien ook afwijkingen van het oor nader werden bestudeerd, komt voort uit een speciale, persoonlijke belangstelling voor dit orgaan. Embryologisch gezien is namelijk de ontwikkeling van dit zintuig buitengewoon boeiend, omdat er tijdens dit proces drie elementen — binnenoor, middenoor en uitwendig oor — van totaal verschillende oorsprong tot een anatomische en functionele eenheid worden samengevoegd. Nu bestaan er, zoals nog zal worden uiteengezet, ten aanzien van de regeling van de normale genese van het binnenoor uiteenlopende opvattingen. Deze verschillen komen mede voort uit verschillen in de toegepaste onderzoeksmethoden. Door de abnormale ontwikkeling van het binnenoor in achtereenvolgende stadia te bestuderen, werd een kans aangegrepen het inzicht in de normale genese te verdiepen.

Bij dit onderzoek werd gebruik gemaakt van röntgenstralen, omdat dit een teratogeen agens is, dat nauwkeurig is te doseren. Bovendien

was het met behulp van de nog te beschrijven werkwijze mogelijk bij een zwanger proefdier uitsluitend enkele embryonen te bestralen, terwijl het moederdier zelf en de overige embryonen tegen dit agens konden worden beschermd. Hierdoor werd het moederdier zoveel mogelijk gespaard, en werden tevens op de meest toepasselijke wijze controle-embryonen verkregen.

HOOFDSTUK I

LITERATUUROVERZICHT EN VRAAGSTELLINGEN

A. RÖNTGENSTRALLEN EN MISVORMINGEN VAN DE HERSENEN

Reeds enkele jaren na de ontdekking van de röntgenstralen, in 1895 werd er melding van gemaakt, dat bij bestraling tijdens de graviditeit beschadiging van het zich ontwikkelende embryo kan optreden. Deze eerste berichten werden weldra door een stroom van casuïstische mededelingen gevolgd, waarvan POBISCH (1960) een uitvoerige opsomming geeft.

Deze publikaties, die betrekking hadden op de pathologie van de mens, waren aanleiding tot uitgebreide onderzoeken met röntgenstralen bij tal van diersoorten; onderzoeken, die zowel voor de kennis van de normale embryonale ontwikkeling als ook van het ontstaan van misvormingen van groot belang zijn geweest.

In het raam van deze studie zal uiteraard in hoofdzaak aandacht worden geschonken aan de experimenten, die verricht zijn bij zwangere muizen en ratten. En daarbij worden dan weer vooral die publikaties besproken, die betrekking hebben op de hersenmisvormingen, die na bestraling der embryonen in utero bleken op te treden. Daarnaast zal echter ook worden gerefereerd aan enkele onderzoeken, die voor de algemene begripsvorming in de radio-biologie van groot belang zijn geweest.

In dit laatste opzicht heeft in het bijzonder het werk van JOB, LEIBOLD en FITZMAURICE (1935) vele nieuwe gegevens opgeleverd.

In de jaren, die aan hun publikatie voorafgingen, was reeds bekend geworden, dat in het algemeen de ernst van een afwijking afhankelijk is van het tijdstip van de bestraling, en dat jonge embryonen gevoeliger zijn dan oude. De juiste samenhangen waren echter nog onduidelijk gebleven. Genoemde onderzoekers grepen nu terug op een conclusie, die BARDEEN (1911) en STOCKARD (1921) uit hun proeven op amfibieën en vissen hadden getrokken, namelijk dat in bepaalde embryonale ontwikkelingsstadia een grotere gevoeligheid voor röntgenstralen,

respectievelijk chemische en thermische invloeden bestaat dan in andere. Uit de resultaten van deze proeven was het begrip „kritisch moment” naar voren gekomen. Zij omschreven dit begrip als een bepaalde periode tijdens de vroege embryonale ontwikkeling van een organisme of een orgaan, waarin door een verandering van het milieu een gewijzigde groei en differentiatie teweeggebracht kan worden. JOB en zijn medewerkers maakten aannemelijk, dat dergelijke „kritische momenten” eveneens tijdens de ontwikkeling van zoogdieren voorkomen. Zij vonden bijvoorbeeld, dat na bestraling van ratten met 35-90r op de 9^e dag van de graviditeit hersenafwijkingen (hydrocephalie), na bestraling in de periode van de 9^e-11^e dag oogafwijkingen, en na bestraling op de 11^e dag voornamelijk deformiteiten van de kaak optreden. Het viel hun verder op, dat mannelijke embryonen meer afwijkingen toonden dan vrouwelijke. Zij meenden, dat de mannelijke embryonen zich sneller ontwikkelden dan de vrouwelijke, en dat zij daardoor gevoeliger waren. Het reeds bekende verschijnsel, dat niet alle embryonen van één worp dezelfde ontwikkelingsanomalieën toonden, verklaarden zij door aan te nemen, dat er ten tijde van de bestraling geringe verschillen in ontwikkeling bestaan tussen de embryonen onderling, met daarnaast nog individuele verschillen in de gevoeligheid. Door het resultaat van hun proeven werd eveneens de juistheid bevestigd van de opvatting, dat de afwijkingen des te grover zijn naarmate de vrucht op het moment van de bestraling jonger is.

Ook KAVEN (1939 a, b) heeft, bij een onderzoek met muizen, enkele van deze „kritische perioden” beschreven. Na bestraling van de muizen op de 7^e en 8^e dag der graviditeit met 178r toonden respectievelijk 2 en 16 % der pasgeboren jongen een meningocoele. Bij een voortijdige onderbreking van de zwangerschap werden bovendien embryonen met een „extracraniale dysencephalie” waargenomen. Hieronder verstaat KAVEN het voorkomen van hersenweefsel in plaats van ectoderm aan het oppervlak van de kop (een afwijking, die in het vervolg zal worden aangeduid met de term exencephalie). Aangezien deze misvorming niet mer bij pasgeboren muizen werd aangetroffen, nam hij aan, dat een embryo dat hieraan lijdt tijdens de zwangerschap afsterft.

Na deze publikatie van KAVEN duurde het tot na de tweede wereldoorlog, voordat er weer een belangrijke publikatie op dit gebied verscheen.

WARKANY en SCHRAFFENBERGER (1947) bestraalden zwangere witte ratten op de 10^e-16^e dag met 190-1120r. Eén dag voor de verwachte

geboorte werden de foetus uit de uterus verwijderd en, voornamelijk macroscopisch, bestudeerd. De voornaamste conclusies uit dit onderzoek waren:

1° de verschillende „kritische perioden” zijn in de tijd niet scherp van elkaar gescheiden.

2° bij gebruik van hoge doseringen worden de „kritische perioden” langer.

3° sommige afwijkingen kunnen gedurende verscheidene dagen worden teweeggebracht, andere slechts in een zeer kort tijdsbestek.

4° de embryonen toonden, naarmate zij hoger in een bepaalde uteruschoorn waren gelegen, ernstiger afwijkingen; dit duidt erop, dat de ontwikkeling van de embryonen minder ver gevorderd is, naarmate zij hoger in een uteruschoorn liggen.

WILSON en KARR (1950; 1951), WILSON, BRENT en JORDAN (1953a, b) en WILSON (1954), die eveneens werkten met ratten, brachten een aanzienlijke verfijning in de bestralingstechniek aan door, op de 10^e dag der graviditeit, eerst een laparotomie bij het moederdier te verrichten en dan slechts een deel van de embryonen te bestralen; de overige embryonen werden gebruikt als controles. Zoals in de inleiding reeds werd aangestipt, is het grote voordeel van deze werkwijze boven de voordien en ook later nog veelvuldig toegepaste „total body irradiation”, dat uitsluitend de uterus met enkele embryonen bestraald wordt, terwijl het moederdier door middel van loodplaten tegen de stralen wordt beschermd. De embryonen werden gefixeerd na 1-5 dagen, zodat nauwkeurig het resorptie-percentages kon worden vastgesteld. Bovendien bleven op deze wijze de meest beschadigde embryonen, die weinig levensvatbaar zijn en door afsterven en resorptie dreigen verloren te gaan, voor verder onderzoek behouden. Het viel WILSON en zijn medewerkers op, dat op de 10^e dag doseringen tot 50r onwerkzaam waren, terwijl op de 9^e dag reeds een dosis van 25r enige gevallen van microphthalmie veroorzaakte. Naast deze oogafwijkingen werden ook hersenmisvormingen gevonden (proliferatie van neuro-ectodermale cellen, anencephalie, exencephalie en microcephalie).

RUSSELL (1950; 1956) en RUSSELL en RUSSELL (1950 a, b; 1952; 1954) hebben enige duizenden muize-embryonen, waarvan de genetische eigenschappen bekend waren, met 25-400r bestraald en nader onderzocht. Zij kwamen in dit klassieke werk tot de volgende conclusies:

1° De periode van gevoeligheid voor röntgenstralen, waardoor een

bepaalde afwijking ontstaat, is niet scherp af te grenzen. De gevoeligheid stijgt naar een bepaald hoogtepunt en neemt dan weer af. Wordt een hogere dosis gebruikt, dan neemt de gevoeligheidsperiode in lengte toe.

2° Er zijn bepaalde afwijkingen, waarvoor twee of meer „kritische perioden” bestaan. Om deze perioden afzonderlijk af te perken moeten lage doses worden gebruikt. Voor de muis is hiertoe een dosis van 200r zeer geschikt. Gebruik van hogere doseringen kan een samenvloeiing van de verschillende „kritische perioden” met zich meebrengen.

3° Worden bevruchte eieren bestraald, vóórdat zij geïmplantéerd zijn, dan sterft 43-83 % van de vruchten voor het einde van de zwangerschap af. Of deze gestorven embryonen en foetus misvormingen tonen, blijft onvermeld; de overige pasgeboren jongen tonen geen afwijkingen.

HICKS, BRIEN en NEWCOMB (1953) onderwierpen ratten aan een „total body irradiation” van 100-400r. Zij vonden, dat de „kritische perioden” in het algemeen slechts enkele uren duurden, terwijl de aard en omvang van de ontstane afwijkingen (proliferatie van neuro-ectodermale cellen, anencephalie, exencephalie, microcephalie en hydrocephalie), méér van het tijdstip der bestraling dan van de dosering afhankelijk bleken.

In 1954 (a, b) beschreef HICKS het voorkomen van een karakteristiek verschijnsel van proliferatie. Enkele dagen na een bestraling vond hij namelijk in de wand van de neurale buis circumschripte cel-ophopingen. Dit verschijnsel noemde hij rozet-vorming. De in rozetvorm gerangschikte celgroepen omringen een lumen, dat in verbinding staat met de ventrikel of daar vlak bij ligt.

RUGH en GRUPP (1959 a, b) stelden bij hun proeven op muizen vast, dat de 7^e en 8^e dag van groot belang waren voor het ontstaan van exencephalie. Het viel hun op, dat er in de eerste 24 uur na de bestraling een beschadiging van het neuro-ectoderm optrad, die sterker was in de wand van het diencephalon, mesencephalon en myelencephalon dan in de wand van het telencephalon. Kort daarop nam de hoeveelheid necrotisch celmateriaal af, en volgde een toename van het aantal mitosen.

MURAKAMI en KAMEYAMA (1958) en MURAKAMI, KAMEYAMA, MAJIMA en SAKURAI (1960; 1961) onderzochten, eveneens bij muize-embryonen, het effect van röntgenstralen in doseringen van 25-200r op de 8^e-11^e dag der ontwikkeling; de embryonen werden bestudeerd vanaf de 8^e tot en met de 20^e dag. Na toediening van 100r toonde 60 % van de foetus op de 13^e dag van de zwangerschap hersenafwijkingen waaronder

proliferatie van het neuro-ectoderm, exencephalie, microcephalie en hydrocephalie. MURAKAMI en zijn medewerkers namen, evenals RUGH en GRUPP, kort na de bestraling een necrotische fase in het neuro-ectoderm waar, die na ongeveer 26 uur gevolgd werd door een proliferatie van de „ependymzone”.

Ook KRIEDEL, LANGENDORFF en SHIBATA (1962) beschreven na bestraling van zwangere muizen op de 7^e–10^e dag met 50–400r, op de 18^e dag na de conceptie exencephalie, microcephalie en hydrocephalie. Volgens hen is de genoemde periode van bestraling juist die, waarin de eerste ontwikkeling van het centrale zenuwstelsel plaats heeft.

De geciteerde auteurs hebben zich vooral toegelegd op het bestralen van zwangere muizen en ratten op verschillende tijdstippen van de embryonale ontwikkeling, en op het vastleggen van alle — uiteenlopende — misvormingen, die daarvan het gevolg waren. Aangezien het deze auteurs dus voor alles ging om het totaal en niet om de relatieve frequentie van één of enkele bepaalde misvormingen, was een exacte bepaling van de mate van ontwikkeling der embryonen op het moment van de bestraling voor hen minder belangrijk. Met uitzondering van KRIEDEL en zijn medewerkers, die de ouderparen gedurende slechts 2 uur bij elkaar brachten, hielden de overige onderzoekers hun proefdieren gedurende een gehele nacht te samen, waarna dan de volgende ochtend de vrouwtjes op een copulatie-prop werden gecontroleerd. De bevruchtende copulatie kan dan dus hebben plaatsgevonden tussen 17 uur van de ene dag en 9 uur van de daarop volgende dag. De lengte van deze periode kan leiden tot een grote variatie in het ogenblik van de copulatie, en dit kan stellig bijdragen tot verschillen in ontwikkeling van de embryonen op het tijdstip van het experiment, al dient opgemerkt te worden, dat volgens SNELL, FEKETE, HUMMEL en LAW (1940) de meeste copulaties vallen in de periode tussen 22 en 2 uur. Wordt echter één bepaalde misvorming of groep van misvormingen aan een nader onderzoek onderworpen, dan is natuurlijk een zo gering mogelijke spreiding in ontwikkeling van de embryonen een eerste vereiste; met andere woorden dan moet het uitgangsmateriaal zo veel mogelijk gelijk zijn. Om dit te bereiken werd een nieuwe werkwijze ontworpen, die in het volgende hoofdstuk zal worden beschreven.

Behalve een nauwkeurige bepaling van het embryonale ontwikkelingsstadium is ook de wijze van bestraling van groot belang. Met uitzondering

van WILSON en zijn medewerkers passen alle overige onderzoekers de reeds eerder genoemde „total body irradiation” toe. Bij deze methode wordt het moederdier, al dan niet in narcose, in een stralen doorlatend doosje geplaatst, dat daarna onder de röntgenbuis wordt gezet. Zoals al is aangeduid, is het nadeel van deze techniek, dat niet alleen alle embryonen worden bestraald maar ook het moederdier.

De rol, die de invloed van de bestraling op het moederdier bij het ontstaan van embryonale röntgenmisvormingen wellicht speelt, heeft vele auteurs beziggehouden. Zo overwoog reeds ARCHANGELSKY (1923) de volgende mogelijkheden:

1. De vrucht wordt direct door de stralen beïnvloed.
2. De vrucht wordt door een beschadiging van uterus of ovaria, of door in het moederlijke organisme ontstane „röntgen-leukotoxinen” in zijn ontwikkeling gestoord.

Na ARCHANGELSKY hebben nog vele andere auteurs dit probleem aan de orde gesteld. Zij komen echter niet tot een éénsluidende conclusie. Zo zijn KNOPP en TRAUTMAN (1959) de mening toegedaan, dat de placenta bij zwangere muizen na de bestraling veranderingen toont, die mogelijk van invloed zijn op het ontstaan van afwijkingen bij het embryo. BRENT (1960) en BRENT en McLAUGHLIN (1960) trokken echter uit hun experimenten, waarbij zwangere ratten met sublethale doses werden bestraald, terwijl de embryonen met loodplaten waren afgeschermd, de conclusie, dat de bestraling van de moederdieren noch de groei beïnvloedt, noch het ontstaan van misvormingen bij de embryonen bevordert. Hoewel overeenkomstig deze laatste gegevens de meeste auteurs overhellen naar de gedachte, dat de röntgenstralen direct op de embryonen inwerken, en de invloed van de bestraling op het moederlijk organisme geen wezenlijke rol speelt, is niet te ontkennen, dat deze laatste mogelijkheid bestaat. Om deze eventuele invloed tot een minimum te beperken werd besloten om bij het eigen onderzoek het idee, dat WILSON (1950) en zijn medewerkers hebben aangegeven, verder uit te werken.

Bij nadere beschouwing van de door genoemde auteurs verkegen resultaten blijkt, dat bij muizen de periode van de 7^e–10^e dag en bij ratten die van de 6^e–9^e dag na de copulatie, de „kritische periode” voor het ontstaan van hersenmisvormingen is. Het verschil tussen beide diersoorten zou volgens KRIEDEL en zijn medewerkers door de sneller verlopende primitieve ontwikkeling van de rat kunnen worden verklaard.

Zoals in het voorgaande is gebleken, zijn hersenmisvormingen waar-

genomen, die wat hun morfologie betreft sterk uiteenlopen. Zo worden naast elkaar proliferatie van het neuro-ectoderm, anencephalie, exencephalie, microcephalie en hydrocephalie beschreven. De auteurs zijn zuiver registrerend te werk gegaan; verbanden tussen deze verschillende anomalieën zijn niet gelegd of zelfs maar gezocht. Bovendien is uit de beschreven onderzoeken nog nauwelijks een inzicht verkregen in de volgorde waarin na bestraling verschillende processen op elkaar volgen of op welke manier wellicht één of enkele basisprocessen kunnen uitlopen op morfologisch verschillende afwijkingen, waargenomen in latere ontwikkelingsstadia.

Dat deze hersenmisvormingen vaak gepaard gaan met een gestoorde ontwikkeling van de zintuigen is begrijpelijk gezien de nauwe relatie, die er tijdens de embryonale ontwikkeling tussen de hersenen en deze organen bestaat. Hierbij treden vooral afwijkingen van het oog en, in mindere mate, van het reukzintuig op de voorgrond. Stoornissen in de ontwikkeling van het binnenoor werden door geen der geraadpleegde auteurs bij de bestraalde muize- of ratte-embryonen beschreven.

Hoewel de gereleveerde onderzoeken nieuw licht hebben laten vallen op vele facetten van het ontstaan van hersenmisvormingen, zijn er dus niettemin tal van problemen onopgelost gebleven.

In deze studie zal getracht worden een antwoord te vinden op de volgende vragen:

1. Moeten de genoemde afwijkingen: proliferatie van het neuro-ectoderm, anencephalie, exencephalie, microcephalie en hydrocephalie, gezien worden als misvormingen, die morfogenetisch geheel verschillend zijn, of bestaat er — hoewel zij morfologisch sterk uiteenlopen — in hun ontstaanswijze een onderling verband?
2. In welk percentage der gevallen zijn deze misvormingen van de hersenen reproduceerbaar?
3. Hoe verhouden de afwijkingen zich percentueel na verschillend tijdsverloop?
4. Wijst het histologische beeld op bepaalde stoornissen in de ontwikkelingsfysiologie?

B. MISVORMINGEN VAN HET BINNENOOR

Bij de vele onderzoekers, die de normale embryonale ontwikkeling van het gehoororgaan hebben bestudeerd, bestaat geen éénsluidend oordeel

over de factoren, die een rol spelen bij het ontstaan en de differentiatie van het binnenoor. DALCQ (1933), SCHMIDT (1937), YNTEMA (1939) en ZWILLING (1941) e.a. hebben door hun onderzoeken bij amfibieën aannemelijk gemaakt, dat het mesoderm op dit ontwikkelingsproces een invloed van overwegende betekenis uitoefent. Anderen daarentegen, zoals LOPASHOF (1937), KOGAN (1939; 1944) en GORBUNOVA (1939) menen, dat aan het rhombencephalon een regelende rol moet worden toegeschreven.

CORDIER en DALCQ (1954) hebben, op grond van deze verschillende opvattingen, de volgende hypothese opgesteld. Door een primaire inductieve activiteit, uitgaande van het parachordale mesenchym, ontstaat de oorplacode, waaruit zich de oorblaas ontwikkelt. Een secundaire inductieve werking zou dan uitgaan van het rhombencephalon; hierdoor zou uit de oorblaas het deel ontstaan, dat later de ductus endolymphaticus vormt. Onderzoeken van TRAMPUSCH (1941) geven voorts nog aanleiding tot de veronderstelling, dat ook de neurale lijst van belang is bij de genese van de oorplacode en zijn instulping.

De genoemde primaire inductieve werking zou voor het eerst optreden tijdens het oude gastrulastadium en het jonge neurulastadium, vervolgens in intensiteit toenemen tot het moment, waarop de neurale wallen worden gevormd, en daarna weer afnemen om ten slotte waarschijnlijk geheel te verdwijnen. De secundaire inductieve beïnvloeding door het rhombencephale deel van de neurale wal zou beginnen tijdens het oude neurulastadium en het jonge staartknopstadium en zou het sterkst zijn ten tijde van de sluiting van de neurale buis, wanneer de oorblaasjes daar dicht tegenaan liggen.

Bij de determinatie en genese van het binnenoor spelen dus bij amfibieën waarschijnlijk verschillende factoren een rol, die ieder afzonderlijk een bepaalde werking uitoefenen en zich bovendien op verschillende tijdstippen van de embryonale ontwikkeling laten gelden. Zeer waarschijnlijk worden ontwikkeling en differentiatie van de oorblaasjes bij zoogdieren door dezelfde factoren geregeld als bij amfibieën. Onderzoeken bij embryonen van KREISLER-muizen (HERTWIG, 1944) en de wijze van ontwikkeling van geïsoleerde oorblaasjes van ratten in vitro (LAWRENCE en MERCHANT, 1953) wijzen in deze richting.

Aangeboren misvormingen van het gehoororgaan worden slechts zelden bij mens en dier gevonden. In de spaarzame publikaties op dit gebied betreft het meestal afwijkingen van het uitwendige oor en het

middenoor, die dan vaak optreden in combinatie met stoornissen in de ontwikkeling van de kieuwbogen (otocephalie) of met ernstige misvormingen van de hersenen (anencephalie). Het binnenoor toont echter bij de eerstgenoemde afwijking geen en bij de tweede slechts geringe misvormingen. Voor een uitvoerig overzicht wordt in deze verwezen naar ALTMANN (1957), die zowel de literatuurgegevens betreffende de pathologie bij de mens als ook de resultaten van dierexperimenten op dit terrein bijeen heeft gebracht. HÖRSTADIUS en SELLMAN (1946) beschrijven bij hun experimenten met amphibiën misvormingen van het binnenoor na extirpatie van de neurale plaat en de neurale lijst ter hoogte van het presumptieve rhombencephalon. Na deze extirpatie komen geen parige oorblaasjes tot ontwikkeling, maar treedt mediaan één blaas op, die door de auteurs voor een mogelijke oorblaas wordt gehouden, hoewel de wand ervan geen enkele differentiatie toont. Vergelijkbare experimenten van WADDINGTON (1937) bij vogel-embryonen hebben geen overeenkomstige resultaten opgeleverd; bij embryonen van zoogdieren zijn experimenten, waarbij delen van de neurale plaat worden geëxtirpeerd, om praktisch-technische redenen nog nooit verricht. Concluderend kan ten aanzien van de factoren, die een rol spelen bij de genese en verdere ontwikkeling van het binnenoor weinig met zekerheid worden vastgesteld, en zeker niet voor zover dit de ontwikkeling bij zoogdieren betreft.

Gezien het voorgaande, rijzen nu de volgende twee vragen:

1. Is met röntgenstralen de neurale plaat zo te beschadigen, dat de neurale buis plaatselijk niet of slechts ten dele tot ontwikkeling komt, waardoor een met extirpatie vergelijkbare situatie ontstaat?
2. Welke invloed heeft dan een op deze wijze veroorzaakte beschadiging op de morfogenese van het binnenoor?

Het zijn deze twee vragen, die bij het eigen onderzoek mede aan de orde zullen worden gesteld.

HOOFDSTUK II

MATERIAAL EN ONDERZOEKMETHODE

A. PROEFDIEREN

Zoals reeds werd aangestipt, is het voor een onderzoek als het onderhavige een eerste vereiste, dat het uitgangsmateriaal zo zuiver en zo constant mogelijk is.

Een eerste factor, die voor deze gelijkmatigheid van belang is, wordt gevormd door het totaal van de genetische eigenschappen van de proefdieren. Vaak vindt men in de literatuur publicaties, die niet kunnen overtuigen, omdat juist over deze eigenschappen van de proefdieren niets wordt vermeld. Om iets van deze aard te vermijden, werd bij onze experimenten uitgegaan van twee muize-stammen met bekende eigenschappen. De ene was een bruin gekleurde stam, die reeds gedurende tenminste 20 generaties door kruising van broer- en zusterdieren, op het Anatomisch-Embryologisch Laboratorium te Amsterdam werd ingeteeld. Op grond van deze langdurig toegepaste wijze van kruising mag worden aangenomen, dat de stam genetisch zuiver is. Overeenkomstig de door het Committee on Standardized Nomenclature for Inbred Strains of Mice (1952) gegeven voorschriften, werd hij daarom van een eigen naam voorzien: AEA. De tweede stam, een stam van witte muizen, werd betrokken van de Vereniging het Nederlands Kanker-instituut te Amsterdam. Deze stam, die als 0₂₀/A geregistreerd staat, is genetisch eveneens zuiver; hij werd gedurende meer dan 100 generaties op genoemd instituut ingeteeld.

Voor de experimenten werden nu de ♀♀ (virgo) van de bruine stam AEA gekruist met de ♂♂ van de witte stam 0₂₀/A. De bestraalde en onderzochte embryonen waren dus bastaarden van de (♀♀AEA × ♂♂ 0₂₀/A)F₁ generatie. Het voordeel van het gebruik van bastaarden is, dat zij sterk zijn (RUSSELL, 1950). Bovendien was er onder ruim 800 onderzochte, onbestraalde exemplaren van onze bastaard-embryonen niet één met „spontane” aangeboren afwijkingen.

De omstandigheden, waaronder de proefdieren werden gehuisvest, waren steeds dezelfde. De temperatuur in de dierenstal werd zoveel mogelijk constant gehouden op $\pm 23^{\circ}\text{C}$. Het voedsel bestond uit gestandaardiseerde muize-korrels (Kray, Knollendam); de dieren konden vrij drinken.

B. PROEFOPSTELLING

Een tweede factor, die de gelijkmatigheid van de embryonen wat hun ontwikkeling betreft beïnvloedt, is de tijd, die verloopt tussen het ogenblik, waarop mannelijke en vrouwelijke muizen bij elkaar worden gezet en het moment der bevruchting. In deze tijd zijn twee variabelen begrepen met elk een eigen spreiding: (a) het tijdstip, waarop de copulatie kan optreden, en (b) de tijd, die verloopt tussen de copulatie en de bevruchting.

a. Zoals in het vorige hoofdstuk werd vermeld, kon bij de meeste proefnemingen het tijdstip van de copulatie sterk wisselen. Om nu deze spreiding tot een minimum te beperken werd getracht de termijn, waarbinnen copulatie optreedt, zo kort mogelijk te doen zijn. Bij toepassing van een door HEMMINGSEN en KARUP (1937) aangegeven methode viel het op, dat de copulatie-propen gevormd werden binnen een tijdsbestek van 2 uur. Deze methode berust op een omkering van het dag-nachtrithme, waardoor de paringen, die normaliter gedurende de nacht plaatsvinden, zich nu tijdens de dag, dat is dus de kunstmatige nacht, afspelen. Volgens SNELL (1940) en zijn medewerkers worden onder natuurlijke omstandigheden ongeveer 8 uur nadat de dieren 's avonds bij elkaar worden gezet, de meeste propen gevormd. Dit betekent, dat wanneer hetzelfde ook geldt voor kunstmatige omstandigheden, deze propvorming aan het einde van de kunstmatige nacht verwacht mag worden. Bij nauwkeurige controle bleek, dat als de dieren om 9 uur bij elkaar worden gezet, de copulaties inderdaad plaats vinden tussen 15 en 17 uur; de variatiebreedte van de tijd waarin de copulatie-propen worden gevormd, kon hierdoor dus tot 2 uur worden teruggebracht.

De technische uitvoering van dit onderdeel van het onderzoek was nu als volgt. In een vertrek, waarin geen daglicht kon doordringen, werd door middel van een tijd klok de TL-verlichting tussen 17 uur van de ene dag en 9 uur van de volgende dag ingeschakeld, en gedurende de rest van het etmaal uitgeschakeld. Op een leeftijd van ongeveer drie maanden werden de ♀♀ jongen van de AEA-stam en de ♂♂ jongen

van 0₂₀/A-stam naar deze proefruimte overgebracht. Na een aanpassingsperiode van ongeveer één maand werden telkens twee ♀♀ en één ♂ in een kooi bijeengebracht even voordat de kunstmatige nacht aanving. Tegen 17 uur, het moment waarop deze nacht eindigde, werden alle vrouwtjes op een copulatie-prop gecontroleerd.

b. Tussen de vorming van de copulatie-prop en het moment der bevruchting verloopt een zekere tijd. De duur hiervan, die zowel door interne als externe omstandigheden wordt bepaald, is niet voor elk vrouwtje dezelfde, hetgeen zich in een ongelijkmatigheid van het embryonale materiaal kan uiten.

Volgens HENNEBERG (1937) valt de bevruchting samen met het optreden van de copulatie-prop. Volgens HUBER (1915) echter, kan er na het optreden van de copulatie-prop nog wel 12 uur verlopen, voor bevruchting optreedt. KRIEGER (1962) en zijn medewerkers geven een gemiddeld tijdsverloop van 6 uur aan. Wat dit aspect betreft, bleek bij het verzamelen van de jongste ontwikkelingsstadia van de bastaarden voor onderwijsdoeleinden, dat gemiddeld in 4 uur na de vorming van een copulatie-prop bevruchting van de eieren optrad. Dit betekent, dat bij de hier gebruikte muizen een variatiebreedte van rond 4 uur bestond.

Wordt zowel met deze 4 uur als met de reeds eerder genoemde 2 uur rekening gehouden, dan is tussen de embryonen van verschillende moeders in totaal een variatie in leeftijd van ongeveer 6 uur mogelijk.

Het moment, waarop de copulatie-prop werd vastgesteld, fungeerde als het uur 0 voor het verdere verloop van het experiment.

De bevruchte vrouwtjes werden in aparte kooien geplaatst en gedurende acht dagen ongemoeid gelaten. De muizen, waarbij geen prop werd waargenomen, gingen terug in de verzamelbakken en werden de volgende dag opnieuw bij een mannetje geplaatst.

Er werd geen vaginaal-uitstrijk ter bepaling van de oestriscie cycli toegepast, en wel om twee redenen. Ten eerste omdat deze methode voor dit experiment niet noodzakelijk was, en ten tweede omdat volgens EMERY en SCHWABE (1936) een frequent uitstrijken van de vagina leiden kan tot schijnzwangerschap of andere verstoringen van de cyclus.

C. OPERATIE EN BESTRALING

Zoals uit het literatuuroverzicht bleek, worden bij het embryo van de muis de meeste hersenmisvormingen waargenomen na bestraling op

de 8^e dag van de zwangerschap. Daarom werden de operatie en de bestraling op deze dag uitgevoerd. Voor een beschrijving van de morfologie van de aanleg van hersenen en binnenoor op dit moment zij verwezen naar het begin van de hoofdstukken III en IV.

De dieren werden gewogen en met Nembutal (Na-Pentobarbital) onder narcose gebracht. De dosering bedroeg hierbij 80 mg/kg lichaamsgewicht; het nembutal, opgelost in fysiologisch zout, werd aan de rugzijde van het dier subcutaan ingespoten. Van dit narcoticum werd bij de controle-embryonen geen nadelige invloed — in de zin van misvormingen — waargenomen.

Na ongeveer 20 minuten was de narcose diep genoeg om tot operatie over te gaan. Door middel van een ventrale mediane incisie werd de peritoneale holte geopend en werden de beide uterushoorns voorzichtig gemobiliseerd en à vue gebracht. Bij inspectie van de uterus werd niet alleen gelet op het aantal implantaties, maar ook op hun verdeling over de rechter- en linker uterushoorn en op hun macroscopische aspect. Dit laatste werd bestudeerd met behulp van een Zeiss-operatiemicroscop.

Van de proef werden nu uitgesloten alle zwangere muizen met:

1. In totaal meer implantaties dan 10.
2. Minder implantaties per uterushoorn dan 3.
3. Eén of meer resorpties.

Door deze selectie werd nogmaals de homogeniteit van het uitgangsmateriaal bevorderd. Want als er minder implantaties zijn dan 3 of meer dan 7 in één uterushoorn, kunnen de embryonen blijken de gegevens van JOB en zijn medewerkers zeer sterk in ontwikkeling uiteenlopen. Bovendien werd het percentage „spontane” resorpties door het elimineren van muizen met een groot aantal implantaties of met een onregelmatige verdeling van de embryonen over de beide uterushoorns teruggebracht tot 5 procent. Dit bleek uit een vooronderzoek uitgevoerd bij 225 muizen. Bij deze muizen werd op de 10^e tot en met de 18^e dag der graviditeit het aantal geresorbeerde embryonen tijdens een ongestoorde zwangerschap vastgesteld. Door nu deze muizen te verdelen in een groep (I) die wél, en een (II) die niet aan bovengenoemde selectie-eisen voldeed, konden de resorptiepercentages van beide groepen onderling worden vergeleken: bij de 100 muizen van groep I met in totaal 860 embryonen, waren er 43 (5.0 %) geresorbeerd, en bij de 125 muizen van groep II met in totaal 950 embryonen, waren er 120 (12.6 %) geresorbeerd. Door deze selectie enerzijds, en anderzijds doordat er 212 muizen

afvielen, die ondanks het voorkomen van een copulatie-prop niet bevrucht bleken, waren er in totaal 729 operaties nodig om 150 zwangere muizen te verkrijgen, die aan alle eisen voldeden. Hierop werd röntgenbestraling toegepast.

Voor deze bestraling werd de muis met de buikzijde naar boven gekeerd in een plastic bakje geplaatst. Eén van de gemobiliseerde uterus-hoorns werd hierna buiten de buikholte gebracht en op een loden plaatje gelegd. Ter hoogte van drie implantaties in deze uterushoorn werd nu een tweede plaatje over het mesenterium geplaatst, waarbij een plukje watten, gedrenkt in fysiologisch zout, moest voorkomen, dat het plaatje druk op de in het mesenterium lopende vaten zou uitoefenen. Hierna werd het bakje in een loden doosje geschoven, waarin precies boven de drie implantaties een vierkant venster was aangebracht, zodat uitsluitend deze drie vruchten aan de stralen werden blootgesteld, terwijl het moederdier — met uitzondering van de uterushoorn ter plaatse van genoemde implantaties — en de overige embryonen van de stralen waren afgeschermd (Schema 1).

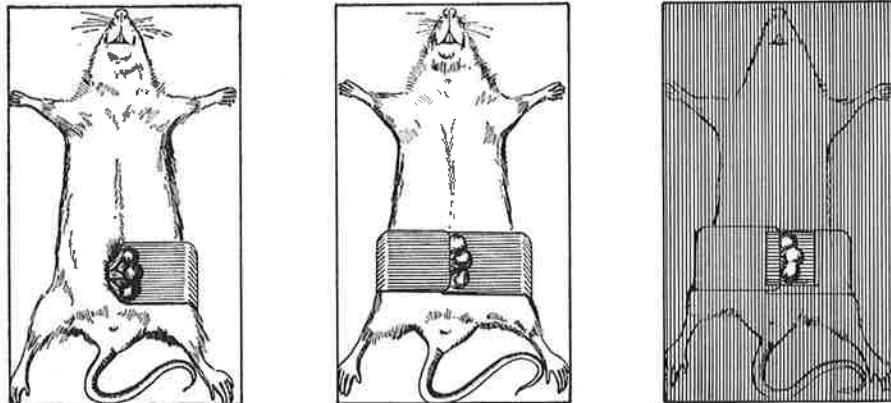
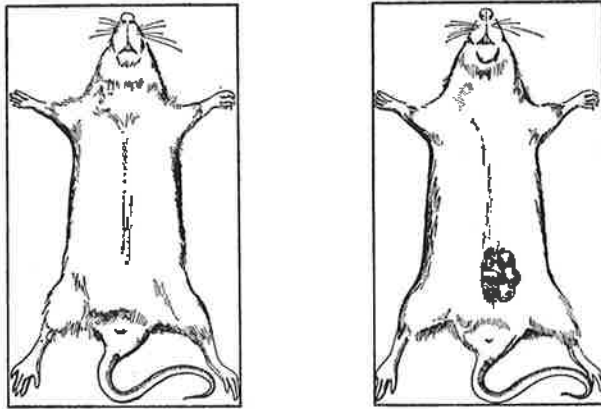
Zoals reeds eerder opgemerkt, werd door deze werkwijze bereikt, dat bij hetzelfde moederdier bestraalde embryonen en controle-embryonen naast elkaar konden worden verkregen en bestudeerd.

Bij de bestraling werd gebruik gemaakt van een ENRAF Röntgenbestralingsapparaat. Zonder de toepassing van filters¹⁾ werd met 50 kV en 4 mA bij een focus-object afstand van 10 cm, 145r/minuut in lucht verkregen. Steeds werden de embryonen met eenzelfde dosis van 400r bestraald.

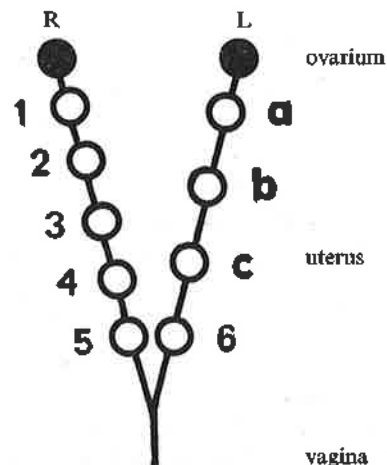
Door deze hoge dosering wordt de kritische periode voor het ontstaan van hersenmisvormingen verlengd (RUSSELL en RUSSELL, 1950 a), hetgeen zal kunnen resulteren in een hoog percentage aangeboren hersenmisvormingen. Het nadeel van deze hoge dosering is echter, dat veel embryonen spoedig sterven en geresorbeerd dreigen te worden. Dit nadeel was evenwel van niet al te veel belang, omdat de embryonen reeds kort na de bestraling werden gefixeerd.

Van iedere bestraalde muis werd een operatieverslag bijgehouden, waarin de embryonen die bestraald waren a, b en c en de overige (controle-) embryonen 1, 2, 3 enz., werden genummerd (Schema 2).

¹⁾ Met dien verstande, dat zich natuurlijk tussen de röntgenbuis en het embryo wel het deksel van het plastic bakje bevond.



Schema 1. Achtereenvolgende fazen van de operatie van een zwangere muis, en de bescherming van het moederdier en de controle-embryonen door middel van lood-platen.



Schema 2. Rechter en linker uterushoorn, waarin de controle-embryonen zijn aangegeven met cijfers (1, 2, 3 enz.) en de bestraalde embryonen met letters (a, b en c).

Na de bestraling werd de uterushoorn weer in de buikholte teruggebracht, waarna het peritoneum met twee zijde-hechtingen, en de huid met agraves werden gesloten.

In totaal werden dus 450 embryonen bij 150 muizen bestraald. Deze 150 muizen werden gelijkmatig over 6 series verdeeld, en de muizen van deze series werden respectievelijk 1, 1½, 2, 3, 4 en 5 dagen na de bestraling door cervicale luxatie gedood. Daarna werden alle aanwezige embryonen gefixeerd.

D. FIXATIE EN HISTOLOGISCHE BEWERKING

Hoewel het vrijprepareren van 9 dagen oude muize-embryonen onder het prepareermicroscop zeker mogelijk is, levert het afzonderlijk fixeren van deze uiterst tere embryonen zeer grote moeilijkheden op. Om deze reden werd bij de series I en II (respectievelijk 1 en 1½ dag na de bestraling) de uterus, met daarin de embryonen, in toto gefixeerd. Als fixatie-vloeistof werd gebruikt Bouin d'Hollande. Bij de series III tot en met VI (respectievelijk 2, 3, 4 en 5 dagen na de bestraling) werden de embryonen uit de uterus vrijgeprepareerd; na macroscopisch onderzoek werden zij eveneens in Bouin d'Hollande gefixeerd.

Tijdens de dehydratie werden zowel de in utero gefixeerde embryonen als de vrijgeprepareerde embryonen met Borax-Carmijn voorgekleurd.

Na doorvoering door de alcoholreeks werden de preparaten ingesloten in paraffine en volledig in serie gesneden (coupe-dikte 10µ). De snijrichting werd voor de vrijgeprepareerde embryonen transversaal op de kruin-stuittlijn gekozen; de in utero gefixeerde embryonen werden transversaal op de lengte-as van de uterushoorn gesneden. In deze jongste ontwikkelingsstadia valt de lengte-as van het embryo nog samen met de lengte-as van de uterus (SNELL, 1961); hierdoor werd de snijrichting der embryonen voor alle series gelijk, hetgeen de beoordeling van de microscopische beelden zeer vergemakkelijkte. Als tegenkleuring van de histologische coupes werd Picroblauwzwart gebruikt.

Uiteraard zijn de fixatie en de histologische bewerking van de bestraalde embryonen en de controle-embryonen geheel dezelfde geweest.

De histologische preparaten werden op de gebruikelijke wijze microscopisch onderzocht. Om een bestudering van de topografische verhoudingen bij ontwikkelingsanomalieën van de binnenooraanleg te vergemakkelijken, werden van bestraalde embryonen met zulke anoma-

lieën en van even oude onbestraalde embryonen het rhombencephalon en de oorblaasjes in was gereconstrueerd. Deze wasreconstructies werden, evenals grafische reconstructies van een sagittale mediane doorsnede, volgens een door PETER (1906) aangegeven methode vervaardigd.

Tenslotte een enkel woord over de in een afzonderlijk boekje (achteraan) bijgevoegde fotografische afbeeldingen. De microfoto's werden gemaakt met de ZEISS-microfotografische apparatuur; de macroscopische opnamen van de wasmodellen werden met een LINHOF-platencamera vervaardigd. De microscopische coupes, zoals zij zijn weergegeven in de microfoto's, zijn in het algemeen transverso-frontale doorsneden. Er is naar gestreefd om — indien van belang — deze foto's zo te oriënteren, dat de dorsale zijde van het embryo gericht is naar boven. Het niveau van de doorsnede is met behulp van tekeningen bij de betreffende illustraties aangegeven.

HOOFDSTUK III

WAARNEMINGEN OVER HET ONTSTAAN VAN MISVORMINGEN VAN DE HERSENEN

De embryonale ontwikkeling van de muis — in het bijzonder de organogenese — voltrekt zich in een zeer snel tempo. Zo wordt de neurale plaat in ongeveer 36 uur tot neurale buis. Dit ontwikkelingsproces begint op de 8^e dag der graviditeit en is op de 10^e dag geheel voltooid. Bij eenzelfde embryo kunnen in deze tijd verschillende fasen van de sluiting worden bestudeerd, omdat het een proces is, dat geleidelijk voortschrijdt en regionaal dus verschillend ver gevorderd is.

Zoals reeds eerder vermeld, is de aard van een misvorming, die na bestraling optreedt, mede afhankelijk van de gevoeligheid, die het embryo op het moment der bestraling heeft. Deze gevoeligheid hangt op haar beurt nauw samen met de bereikte ontwikkelingsfase. Het is dus van het grootste belang, dat niet alleen beschikt wordt over embryonen, die wat hun ontwikkeling betreft onderling weinig verschillen, maar dat vooral ook wordt vastgelegd, welk precies het ontwikkelingsstadium is, waarin de embryonen ten tijde van de bestraling verkeren. Om nu dit stadium, bereikt op de 8^e dag, nauwkeurig te omschrijven werden 25 willekeurig gekozen embryonen, afkomstig van 10 zwangere muizen, op het tijdstip der bestraling gefixeerd en microscopisch onderzocht.

Van ongeveer 70 % van deze embryonen kon het ontwikkelingsstadium als volgt worden gekarakteriseerd:

De primitiefstreep is gevormd. Van de drie kiembladen — ectoderm, mesoderm en entoderm — toont alleen het ectoderm een eerste verschijnsel van differentiatie, in de vorm van het neuro-ectoderm, dat de neurale plaat vormt. In het midden is deze neurale plaat nog innig verbonden met het chorda-mesoderm, welk laatste zelf nog continuïteit met het entoderm toont. De mitotische activiteit in de presumptieve laminac alares en basales is gelijk (Plaat I, fig. 1.)

Bij de overige 30 % van de embryonen was de ontwikkeling iets verder of minder ver gevorderd.

EXPERIMENTELE SERIE I

Op de 9^e dag na de conceptie, werden van 25 muizen, die één dag tevoren volgens de eerder beschreven techniek waren bestraald, de uteri gefixeerd. Hierin bevonden zich 218 embryonen — 75 bestraalde en 143 onbestraalde —, die vergelijkenderwijs werden bestudeerd.

A. Controle-Embryonen (onbestraald)

Van de 143 controle-embryonen bleken er bij microscopisch onderzoek 13 (9.1 %) geresorbeerd, dat wil zeggen dat van deze embryonen niets meer of nog slechts weinige necrotische resten werden aangetroffen.

Uit de niet geresorbeerde 130 embryonen werden er willekeurig 56 gekozen en histologisch bestudeerd.

Ongeveer 70 % van deze embryonen verkeerde in de volgende ontwikkelingsfase:

De neurale groeve heeft zich ter plaatse van het latere cervicale deel van het ruggemerg gesloten. De craniaal hiervan gelegen hersenaanleg ligt nog open, hoewel door kromming en laterale uitbochtiging het prosencephalon, het mesencephalon en het rhombencephalon zich al duidelijk van elkaar laten afgrenzen. De prechordale plaat bestaat uit losmazig mesenchymaal weefsel, dat als een dunne laag aan de basale zijde van het craniale deel van de neurale plaat is gesitueerd. De chorda is in dit stadium een dunne ronde streng, nog innig verbonden met het entoderm van de voordarm (Plaat I, fig. 2a, b, c en d).

De overige 30 % der controle-embryonen waren deels nog niet tot het bovenbeschreven stadium gevorderd, deels daar reeds enigszins voorbij.

In deze groep van controle-embryonen werden geen misvormingen van hersenen of zintuigen waargenomen.

B. Bestraalde embryonen

Van de 75 bestraalde embryonen bleken er bij microscopisch onderzoek 11 (14.7 %) te zijn geresorbeerd. De overige 64 konden op grond van hun morfologische kenmerken in twee groepen worden ingedeeld.

1. Embryonen, die geen hersenmisvormingen toonden: 45 (60.0 %). De embryonen, die tot deze groep behoren waren klein en wat hun ontwikkeling betreft ten achter bij de controle-embryonen. Ontwikkelingsanomalieën konden niet worden vastgesteld. Bij histologisch onderzoek

werden evenwel vele pycnotische kernen in het neuro-ectoderm aangetroffen. Deze pycnotische kernen kwamen vooral voor in het gebied van de aanleg van het rhombencephalon. In de amnionholte bevond zich detritus van afgestorven cellen (Plaat I, fig. 4).

2. Embryonen, waarbij pre-proliferatieve en proliferatieve processen in het neurale epitheel werden opgemerkt: 19 (25.3 %).

Deze embryonen toonden naast een achterblijven in ontwikkeling en de zojuist beschreven verschijnselen van destructie, in het neurale epitheel ook nog andere veranderingen:

a. *Pre-proliferatieve veranderingen.* Hieronder zij verstaan het voorkomen van groepen van kubisch tot ronde neuro-ectodermcellen in de middenzone van de neurale plaat. In deze zone vindt men gewoonlijk uitsluitend cilindrische neuro-ectodermcellen. Afgeronde cellen komen ook in de normale neurale plaat wel voor, maar zij zijn dan steeds gelegen in de oppervlakkige, germinatieve zone. De hier in het midden gevonden ronde cellen gelijken in alle opzichten op die van de germinatieve zone; abnormaal is alleen hun ligging. De aanwezigheid van deze celgroepen leidt tot verdikkingen of uitbochtigen van de neurale plaat.

b. *Proliferatieve veranderingen.* Hiervan spreekt men als in de zojuist beschreven abnormaal gegroepeerde celophopingen mitosen worden aangetroffen. Dit houdt in, dat nu mitosen optreden buiten de germinatieve zone. Dit is bij een normale ontwikkeling nimmer het geval.

De pre-proliferatieve en proliferatieve veranderingen kunnen zowel diffuus als circumscrip zijn. Zij worden voornamelijk gevonden in de laminae alares van de aanleg van het rhombencephalon, het mesencephalon en het diencephalon (Plaat I, fig. 3). Relatief komen in dit ontwikkelingsstadium de pre-proliferatieve veranderingen nog veel vaker voor dan de proliferatieve veranderingen.

De prechordale plaat en de chorda tonen geen afwijkingen.

EXPERIMENTELE SERIE II

Van 25 muizen werden de uteri gefixeerd anderhalve dag na de bestraling (9½ dag na de conceptie). In deze uteri bevonden zich 223 embryonen, 75 bestraalde en 148 onbestraalde.

A. Controle-embryonen (onbestraald)

Bij microscopisch onderzoek bleken van de 148 controle-embryonen

er 18 (12.2%) geresorbeerd. Van de 130 niet geresorbeerde embryonen werden er 50, die willekeurig gekozen waren, nader histologisch onderzocht. De verschillen tussen de embryonen onderling bleken in deze fase der embryonale ontwikkeling veel kleiner dan in de eerste serie. Op enkele uitzonderingen na — die iets verder of minder ver waren ontwikkeld — kon het volgende worden waargenomen:

Alle vijf hersenblaasjes zijn nu gevormd, en de neurale buis is op het caudale deel na gesloten. Het diencephalon toont — zij het kleine — laterale uitstulpingen, de aanleg van de oogblaasjes. Lateraal van het rhombencephalon is het ectoderm beiderzijds verdikt; deze verdikkingen zijn de oorplacoden. De chorda is los komen te liggen van de neurale buis en het entoderm, en ligt nu als een dunne en compacte mesodermale streng tussen de primitieve darm enerzijds en de bodemplaat van de neurale buis anderzijds (Plaat II, fig. 1a, b en c).

In deze controle-groep werden geen misvormingen van hersenen en zintuigen opgemerkt.

B. Bestraalde embryonen

Van de 75 bestraalde embryonen waren er 22 (29.3 %) geresorbeerd; deze werden niet verder bestudeerd. De overige 53 embryonen konden als volgt in vijf groepen worden ingedeeld.

1. Embryonen zonder aantoonbare hersenmisvormingen: 10 (13.3 %). Het aantal embryonen, dat tot deze groep behoort, is aanzienlijk kleiner dan dat in de overeenkomstige groep van serie I. Zij tonen geen misvormingen, maar wel is er een duidelijke retardatie in de ontwikkeling ten opzichte van de controle-embryonen. Ook is er karyopycnosis in het neuro-ectoderm, maar deze is minder sterk dan een halve dag tevoren. Eveneens blijkt de hoeveelheid cel-detritus in de amnionholte en in de ventrikels afgenomen te zijn.

2. Embryonen, waarin pre-proliferatieve en proliferatieve veranderingen in het neurale epitheel zijn te vinden: 13 (17.3 %). Bij deze embryonen vallen naast een algemene retardatie van de ontwikkeling de reeds eerder beschreven pre-proliferatieve en proliferatieve veranderingen in de wand van de neurale buis op. Hierbij wordt echter het eerstgenoemde proces relatief minder vaak waargenomen dan het laatstgenoemde. Het door de extra mitosen ontstane surplus aan neuro-ectodermcellen ligt gedeeltelijk — juist als tevoren — in de wand zelf (intra-

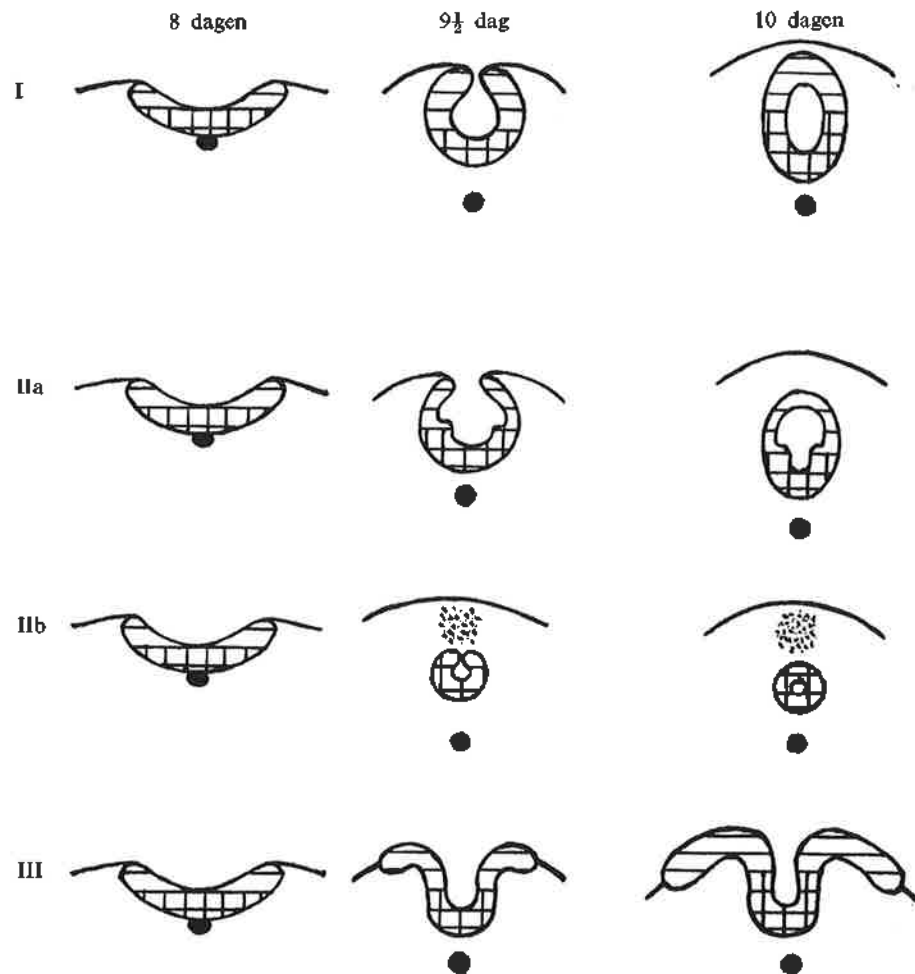
muraal) en gedeeltelijk binnen tegen de wand, dus in de ventrikel (muraal). Deze laatste, murale celgroepen tonen een duidelijke tendentie tot afronding (Plaat II, fig. 2 en 3; Plaat III, fig. 7).

3. Embryonen met proliferatieve processen in combinatie met *microcephalie*: 14 (18.7 %). Naast de locale verschijnselen van proliferatie van het neuro-ectoderm tonen deze embryonen bovendien een veel te kleine hersenaanleg. De eerste fasen van het ontstaan van de *microcephalie* konden in deze serie worden onderkend. Deze afwijking bleek op twee verschillende manieren tot stand te kunnen komen (Schema 3):

- a. door een vertraagde groei en differentiatie van het neuro-ectoderm. In dit geval blijven speciaal de laminae alares plaatselijk of in hun geheel te dun, en tonen de hierin gelegen neuro-ectodermcellen een zeer geringe mitotische activiteit. Het mesenchym dat de neurale buis omgeeft, is zeer losmazig en toont grote vaten (Plaat III, fig. 5).
- b. door een desintegratie van het normale, maar ook van het tijdens de proliferatie gevormde overtollige neuro-epitheel, hetgeen leidt tot een plaatselijke destructie van de wand van de neurale buis. Dit intramuraal afbraakproces wordt meestal waargenomen in het gebied van het mesencephalon en/of het rhombencephalon en/of het ruggemerg, en dan vrijwel uitsluitend in de laminae alares, en slechts bij uitzondering ook in de laminae basales. Als alleen de laminae alares te gronde gaan, vormen de restanten van het neuro-ectoderm, de cellen van de laminae basales dus, opnieuw een ronde maar te kleine neurale buis (Plaat III, fig. 6). Treedt de desintegratie ook op in de laminae basales, dan gaat de continuïteit van de neurale buis verloren; er ontstaat dan een plaatselijke onderbreking.

Het achterblijven in ontwikkeling en ook de desintegratie van de laminae alares, mits op een bepaalde plaats in het rhombencephalon opgetreden, kunnen beide aanleiding geven tot het ontstaan van misvormingen van het binnenoer. Voor een nadere beschrijving hiervan wordt naar het volgende hoofdstuk verwezen.

4. Embryonen met proliferatieve processen in combinatie met *microcephalie* en *exencephalie*: 14 (18.7 %). Ook bij deze embryonen zijn proliferatieve processen in de wand van de neurale buis waar te nemen, en is de hersenaanleg in zijn geheel te klein. Bovendien is echter hier het craniale einde van de buis voor een deel of in zijn geheel open, waarbij dan de randen naar lateraal zijn omgekruld (Schema 3). Ver-



Schema 3. Schematische weergave van: I—de normale ontwikkeling; II—de microcephale ontwikkeling, door: (a) onderontwikkeling van de laminae alares, (b) desintegratie van de laminae alares; III—de exencephale ontwikkeling. De laminae alares zijn horizontaal gearceerd, de laminae basales zowel horizontaal als verticaal. De dikke zwarte stip geeft de chorda weer.

geleken met het overige deel der laminae alares is het aantal cellen in deze omgekrulde randen toegenomen. Ook de mitotische activiteit in de germinatieve zone is hier groot (Plaat II, fig. 4).

5. Embryonen met proliferatieve processen in combinatie met hydrocephalie: 2 (2.7 %). Bij twee embryonen, die proliferatieve processen toonden, was bovendien het lumen van zowel het diencephalon als het mesencephalon in vergelijking met de overeenkomstige lumina bij controle-embryonen te groot. Ter plaatse van de genoemde ventrikeldelen staat de wand bol en is hij minder gedifferentieerd dan in dit stadium verwacht mag worden (Plaat III, fig. 8). Hoewel het ectoderm is gesloten, vindt men plaatselijk de sluitingsranden van de neurale buis nog niet vergroeid.

Bij geen enkel van de bestudeerde embryonen werden in de prechordale plaat of in de chorda afwijkingen waargenomen.

EXPERIMENTELE SERIE III

Op de 10e dag na de conceptie, werden van 25 muizen, die twee dagen tevoren waren bestraald, 205 embryonen — 75 bestraalde en 130 onbestraalde — verkregen. De embryonen werden uit de uteri vrijgeprepareerd en indien zij niet in resorptie verkeerden of al geresorbeerd waren, werden zij na macroscopische bestudering gefixeerd.

A. Controle-embryonen (onbestraald)

Van de 130 controle-embryonen bleken er bij fixatie 16 (12.3 %) geresorbeerd of in resorptie te zijn. De kwalificatie „in resorptie” werd toegekend op grond van het voorkomen van necrotische veranderingen in het mesenchym, en niet op grond van overeenkomstige verschijnselen in het neuro-ectoderm. Dit laatste weefsel toont namelijk de postmortale veranderingen later dan het mesenchym. Desondanks kan de wand van de neurale buis, hoewel hierin dus nog geen necrose zichtbaar is, dan toch al abnormale krommingen en verdikkingen tonen, die vooral in de jongere ontwikkelingsstadia licht gehouden zouden kunnen worden voor gevolgen van proliferatie. Om te voorkomen, dat de bevindingen bij dergelijke embryonen de gevolgtrekkingen uit het onderzoek ten onrechte zouden beïnvloeden, werd besloten al deze embryonen in de experimentele reeksen uit te sluiten. Een embryo, dat geen contracties van het hart toonde, werd eveneens als in resorptie beschouwd en van

verder onderzoek uitgesloten; zulke embryonen tonen namelijk reeds vaak necrose van het mesenchym.

Van de niet geresorbeerde 114 embryonen werden er 30 histologisch bestudeerd. De embryonen toonden onderling — wat hun ontwikkeling betreft — vrijwel geen verschillen meer.

Het caudale einde van de neurale buis is nu gesloten. In de wanden van de ventrikels is een zekere mate van differentiatie opgetreden. Overal is de mitotische activiteit in de laminae alares duidelijk hoger dan in de laminae basales (Plaat IV, fig. 1a, b, c en d). De oogblaasjes zijn zo ver naar lateraal uitgroeid, dat zij het ectoderm bijna hebben bereikt. Voor een beschrijving van de ontwikkeling van het binnenoor in dit stadium, wordt naar het volgende hoofdstuk verwezen.

De controle-embryonen tonen geen abnormale ontwikkeling van hersenen en zintuigen.

B bestraalde embryonen

Van de 75 bestraalde embryonen konden er 24 (32.0 %) wegens resorptie-verschijnselen niet nader worden bestudeerd. De overige 51 werden zowel macroscopisch als microscopisch onderzocht, en op grond van de gevonden kenmerken konden zij als volgt in vier groepen worden ingedeeld.

1. Embryonen zonder aantoonbare hersenmisvormingen: 8 (10.7 %).

Het aantal embryonen, dat tot deze groep behoort, is wederom kleiner dan in de vorige reeks. Er zijn geen noemenswaardige verschillen in de algemene ontwikkeling tussen deze embryonen en die van de controle groep; dit in tegenstelling tot wat men vindt bij de embryonen, die wel misvormingen tonen. In het neuro-epitheel wordt geen karyopycnosis meer gezien. Ook is geen cel-detritus meer in de ventrikels of in de amnionholte aanwezig.

2. Embryonen met pre-proliferatieve en proliferatieve processen in het neurale epitheel: 13 (17.3 %). Bij deze embryonen groeit het prolifererende neuro-ectoderm niet alleen uit naar de binnenkant, dus in de ventrikel — zoals in de vorige experimentele reeks werd beschreven —, maar ook in het omgevende mesenchym. Ook hier weer treft men de tendentie aan tot afronding en rangschikking van de uitgroeide cellen om een centraal punt. In dit stadium staan de murale celgroepen, zowel die naar binnen als die naar buiten toe, nog in verbinding met de wand

van de neurale buis. Het mesenchym, dat de hersenen van boven en opzij omgeeft, is een dunne laag. De van de laminae alares in het mesenchym uitstulpende celgroepen liggen daardoor direct onder het ectoderm. Verder is duidelijk te zien, dat de prolifererende cellen afkomstig zijn van de middelste cellagen, en dat zij de buitenste lagen doorbreken om in het mesenchym te kunnen uitgroeien (Plaat IV, fig. 2).

Samenvattend kan dus ten aanzien van de proliferaties in dit stadium worden opgemerkt, dat zij nu in de volgende verschijningsvormen zijn opgetreden:

- a. intramuraal; dit zijn de rozetten uit de literatuur.
- b. muraal, intraventriculair.
- c. muraal, extraventriculair.

Bij eenzelfde embryo kunnen al deze vormen naast elkaar voorkomen.

3. Embryonen met proliferatieve processen in combinatie met *microcephalie*: 18 (24.0 %). Zoals reeds vermeld (zie de II^e experimentele reeks, 3a en 3b), resulteert zowel het achterblijven in ontwikkeling als ook de desintegratie van de laminae alares in een neurale buis, die te klein van omvang is (Schema 3). Nu, 12 uur na de eerste waarnemingen betreffende deze ontwikkeling in de richting van de *microcephalie*, ligt tussen de te kleine neurale buis enerzijds en het ectoderm anderzijds een dikke laag mesenchym; een laag van een dikte, die hier normaliter niet wordt aangetroffen (Plaat IV, fig. 4). De wand van de neurale buis toont in zijn basale deel gewoonlijk een normale differentiatie, de laminae alares — voor zover nog aanwezig — zijn sterk onderontwikkeld.

4. Embryonen met proliferatieve processen in combinatie met *microcephalie* en *exencephalie*: 12 (16.0 %). Waar de neurale groeve is opengebleven, zijn de randen van de neurale plaat beiderzijds in laterale richting uitgroeid (Schema 3). Het neuro-ectoderm is onregelmatig van dikte; plaatselijk is het in groei achtergebleven, op andere plaatsen is het als gevolg van proliferatieve processen verdikt. De ventrikel, voor zover men daarvan hier mag spreken, is meestal een smalle groeve. Het oppervlak van het neurale weefsel is bij deze embryonen groter dan dat bij een overeenkomstig normaal embryo; een verschijnsel, dat bij de *exencephale* embryonen van de volgende experimentele reeksen nog duidelijker zal worden. Het mesenchym is in de gebieden, waar de neurale buis open ligt, zéér losmazig en vaatrijk (Plaat IV, fig. 3). De tot deze groep behorende embryonen zijn sterker dan de andere embryonen

met hersenmisvormingen in ontwikkeling bij de controle-embryonen achtergebleven.

In tegenstelling tot hetgeen in de vorige serie het geval was, werden in deze reeks, dus 48 uur na de bestraling, geen embryonen met *hydrocephalie* waargenomen.

De chorda en de prechordale plaat tonen bij geen van de bestraalde embryonen afwijkingen.

Bij één embryo werd een misvorming van het binnenoor gevonden; voor de beschrijving hiervan wordt echter naar het volgende hoofdstuk verwezen.

EXPERIMENTELE SERIE IV

Op de 11^e dag na de conceptie, werden van 25 muizen, die drie dagen tevoren waren bestraald, 206 embryonen verkregen; 75 hiervan waren bestraald, 131 waren er controle-embryonen. Zij werden uit de uteri vrijgeprepareerd, en indien zij voor microscopisch onderzoek bruikbaar waren, werden zij na macroscopische bestudering gefixeerd.

A. Controle-embryonen (onbestraald)

Van de 131 controle-embryonen moesten er 15 (11.5 %) als in resorptie of als geresorbeerd worden beschouwd. Een dertigtal van de overige 116 embryonen werd histologisch onderzocht. De aanleg van de hersenen was bij al deze embryonen nagenoeg gelijkvormig, en toont de volgende kenmerken:

Behalve de op de 10^e dag reeds aanwezige kromming ter hoogte van het mesencephalon, blijken nu ook de andere krommingen (flexurae) van de neurale buis te zijn ontstaan. Deze deels ventraal en deels dorsaal gelegen krommingen bepalen de onderlinge relatie tussen de verschillende secundaire hersenblaasjes: telencephalon, dien-cephalon, mesencephalon, metencephalon en myelencephalon, die in dit stadium duidelijk zijn te onderscheiden. De hemisfeerblaasjes van het telencephalon breiden zich naar voren langs de mediaanlijn uit en omgrijpen de oorspronkelijke voorwand (lamina terminalis) van de hersenaanleg. Zij hebben samen met het telencephalon medium nog één groot gemeenschappelijk lumen. De laminae basales van de hersenblaasjes tonen een meer gevorderde differentiatie van het neuro-ectoderm dan tevoren; naast de reeds

aanwezige cellagen is hier nu ook een marginale zone tot ontwikkeling gekomen. Deze marginale zone ligt als een dunne schil, opgebouwd uit vezels, aan de periferie, en is vooral bij het metencephalon en het myelencephalon duidelijk te zien. De ganglia van de N. trigeminus, de N. facialis en de N. stato-acusticus (het ganglion semilunare, het ganglion geniculi en het stato-acustische ganglion) hebben zich gevormd; de bij deze ganglia behorende zenuwvezels zijn tot in de hersenwand te vervolgen.

Het oorblaasje toont een aanzienlijke mate van vormdifferentiatie; hierdoor zijn het vestibulaire deel en het cochleaire deel duidelijk te onderscheiden (Plaat V, fig. 1a, b, c en d).

Bij de controle-embryonen werd geen abnormale hersen- of zintuigontwikkeling waargenomen.

B. Bestraalde embryonen

Van de 75 bestraalde embryonen kwamen er 35 (46.7 %) wegens verschijnselen van resorptie niet voor verder onderzoek in aanmerking. De overige 40 werden zowel macroscopisch als microscopisch onderzocht en op grond van hun kenmerken als volgt in vijf groepen ingedeeld.

1. Embryonen zonder aantoonbare hersenmisvormingen: 2 (2.7 %). De twee embryonen van deze groep toonden geen enkele afwijking; zij waren in geen enkel opzicht van de onbestraalde controle-embryonen te onderscheiden.

2. Embryonen met proliferatieve processen in het neurale epitheel: 2 (2.7 %). Het zogenoemde pre-proliferatieve proces, dat in de vorige serie nog bij enkele embryonen werd waargenomen, bleek nu niet meer voor te komen. Bij de beide embryonen van deze groep, maar ook bij niet meer dan deze twee, werden alleen typische proliferatieve processen gevonden, die zich echter hier geheel beperkten tot de wand van de neurale buis. De omvang en de algemene vorm van de hersenen hadden geen veranderingen ondergaan.

3. Embryonen met proliferatieve processen in combinatie met *microcephalie*: 17 (22.7 %). Bij de embryonen van deze groep zijn de proliferatieve processen en de daarnaast optredende plaatselijke desintegratie van het hersenweefsel goed te bestuderen. Met betrekking tot de proliferaties blijken er in plaats van drie, zoals in de vorige serie, nu vijf verschijningsvormen te onderscheiden te zijn. Deze proliferaties kunnen zijn:

a. intramuraal. Deze vorm treedt vooral op in de laminae alares van het metencephalon en het myelencephalon. Deze laminae zijn hierdoor sterk verdikt en hebben de normaliter zeer wijde IV^e ventrikel geheel opgevuld. In de prolifererende celgroepen (de zg. rozetten) zijn centrale lumina te zien, die soms wel en soms niet met de IV^e ventrikel in verbinding staan. De grootste mitotische activiteit wordt gevonden rond deze lumina. Merkwaardig is, dat de laminae basales van deze abnormale ontwikkeling van de laminae alares geen enkele invloed ondervinden; zij tonen een volkomen normale differentiatie (Plaat VI, fig. 5 en 6).

b. muraal, intraventriculair. In het telencephalon en diencephalon blijken prolifererende cellen, uitgaande van de laminae alares, de germinatieve, aan de ventrikel grenzende laag van het neuro-ectoderm te doorbreken en in de ventrikel uit te groeien. Bij sommige embryonen heeft dit geleid tot een totale opvulling van de ventrikels (Plaat VI, fig. 7).

c. muraal, extraventriculair. Plaatselijk, vooral in het gebied van het mesencephalon, is de uitgroei van de prolifererende cellen naar buiten gericht; daarbij wordt de buitenste, marginale zone van de wand doorbroken en ontstaan in het mesenchym ronde celophopingen, die door een steel met de wand zijn verbonden (Plaat VI, fig. 8).

d. geïsoleerd, intraventriculair. Deze verschijningsvorm der proliferaties werd enkele malen waargenomen. Het betreft hier prolifererende celgroepen, die vrij in de ventrikel liggen. Deze celgroepen nemen de bolvorm aan en tonen geen opvallende mitotische activiteit (Plaat VI, fig. 11). Het voorkomen van overeenkomstige celgroepen, die door een steel met de binnenwand van de neurale buis zijn verbonden, doet vermoeden, dat de geïsoleerde celklompjes door breuk van de vaak uiterst dunne bindingssteel zijn ontstaan.

e. geïsoleerd, extraventriculair. Onder dit type van proliferaties worden intramesenchymale, ronde groepen van neuro-ectodermale cellen begrepen, die op geen enkele wijze met de neurale buis in verbinding staan. Op grond van waargenomen overgangen tussen deze geïsoleerde en de murale, extraventriculaire proliferaties is aannemelijk, dat de eerstgenoemde proliferaties uit deze laatste zijn ontstaan door een verbreking van de bindingssteel (Plaat VI, fig. 9). Een bijzondere vorm van deze geïsoleerde extraventriculaire proliferaties zou men kunnen bestempelen als juxta-ectodermiaal. Het gaat hier om tegen het

ectoderm aan gelegen proliferaties. Deze kan men zich ontstaan denken, doordat aanvankelijk intramesenchymaal gelegen proliferaties tot aan het ectoderm zijn uitgegroeid (Plaat VI, fig. 10). Ook is echter mogelijk, dat zij zich ontwikkelen uit cellen van de sluitingsranden van de neurale buis. Sommige histologische beelden wijzen erop, dat prolifererende neuro-ectodermale cellen zich van hieruit losmaken en zich lateraalwaarts verplaatsen — geïsoleerd of in groepjes — tot tegen de onderzijde van het meer lateraal gelegen ectoderm.

Alle tot deze groep behorende embryonen tonen naast de bovenvermelde locale verschijnselen van proliferatie een aanmerkelijke achterstand in de algemene ontwikkeling van de hersenen.

Bij één embryo zijn plaatselijk in het myelencephalon de laminae alares geheel verdwenen; de laminae basales hebben zich in dit geval tot een nieuwe — in omvang veel te kleine — buis afgerond. Dorsaal van dit buisje zijn de ganglia van de rechter en linker N. facialis boogvormig met elkaar verbonden (Plaat IX, fig. 5).

Bij een ander embryo, waar iets dergelijks is gebeurd op een iets lager gelegen niveau, zijn de beide oorblaasjes met elkaar verbonden (zie hoofdstuk IV).

Door de plaatselijk opgetreden verkleining van de neurale buis zijn bij vele embryonen daarin abnormale krommingen opgetreden, of zijn normaal aanwezige flexurae versterkt. Aangezien, zoals werd opgemerkt, het desintegratieproces vooral optreedt in het gebied van het metencephalon en het myelencephalon, betekent dit, dat vaak een diepe groeve in de occipitaal-streek van het embryo gevonden wordt, die dan gepaard gaat met een verminderde ventraalwaartse flexie van de kop.

4. Embryonen met proliferatieve processen in combinatie met microcephalie en *exencephalie*: 7 (9.3 %). Bij vrijwel alle tot deze groep behorende embryonen is de neurale plaat open gebleven in het gebied van het telencephalon, het diencephalon en/of het mesencephalon. Bij uitzondering wordt deze abnormaliteit ook lager aangetroffen. De ombuiging en uitgroei van de neurale plaat naar lateraal is geresulteerd in een plaatselijke omgroeiing van de kop van het embryo. De plaat is wat zijn totale oppervlakte betreft veel groter dan de betreffende oppervlakte in hetzelfde gebied zou zijn geweest, als de betrokken hersendelen zich normaal zouden hebben ontwikkeld (Plaat V, fig. 2). Intramurale proliferaties treden in deze neurale plaat — vooral in het gebied van de laminae alares — veelvuldig op. Er werden daarnaast geen murale

proliferaties van het neuro-ectoderm in de richting van de amnionholte („intraventriculair”) waargenomen; daarentegen wel in de richting van het mesenchym (Plaat V, fig. 3). Naast de exencephalie tonen alle embryonen van deze groep een microcephalie van de gesloten hersendelen. Deze is op de reeds eerder beschreven wijze tot stand gekomen. Het mesenchym is, waar de neurale buis open is, zeer losmazig en vaatrijk.

Ook wanneer de exencephalie gelocaliseerd is ter hoogte van het diencephalon, kunnen toch normale oogbekers worden aangetroffen. Is echter de neurale plaat in dit gebied door een proliferatief proces zeer ernstig gedeformeerd, dan vindt men ook stoornissen in de ontwikkeling van de oogbeker.

5. Embryonen met proliferatieve processen in combinatie met *hydrocephalie*: 12 (16.0 %). Bij 12 embryonen werd naast proliferatie van het neuro-ectoderm ook *hydrocephalie* vastgesteld. Hierbij zijn de ventrikels van alle hersendelen relatief veel te groot, en zijn de wanden ondanks de aanwezigheid van proliferaties te dun. Andere afwijkingen komen bij deze embryonen niet voor (Plaat V, fig. 4).

Naast de beschreven hersenmisvormingen werden bij de embryonen van deze experimentele serie geen afwijkingen van de chorda gevonden. Bij één embryo werd, zoals is aangestipt, een misvorming van het binnenoor opgemerkt; deze wordt in het volgende hoofdstuk nader beschreven.

EXPERIMENTELE SERIE V

Op de 12^e dag na de conceptie, werden bij 25 muizen, die vier dagen tevoren waren bestraald, 195 embryonen uit de uteri vrijgeprepareerd. Hiervan waren er 75 wel bestraald en 120 niet. Alle levende embryonen werden na macroscopische inspectie gefixeerd.

A Controle-embryonen (onbestraald)

Van de 120 controle-embryonen bleken er bij fixatie 16 (13.3 %) geresorbeerd. Van de 104 niet geresorbeerde embryonen werden er 30 histologisch onderzocht; het volgende normale beeld werd gevonden:

De hemisferen van het telencephalon en het diencephalon hebben in dit stadium nog steeds één gemeenschappelijk lumen. In het gebied van de latere foramina interventricularia wordt het lumen

echter reeds wat nauwer. De plaats, waar zich de telencephale plexus chorioideus zal gaan ontwikkelen, is door een dun blijvend deel in de mediale wand van de hemisfeer aangeduid. Van het diencephalon zijn de zijwanden — de toekomstige thalami — nog weinig ontwikkeld. Uit de bodem heeft zich de neuro-hypophyse gevormd, die dicht tegen de van het stomodaeum uitgroeide oro-hypophyse aanligt. Het mesencephalon blijkt nu bij de overige hersendelen in groei achter te zijn gebleven. Het lumen erin is echter nog groot en de wanden tonen nog weinig differentiatie. Door de sterke ontwikkeling van de pontine flexuur is de lengte-as van het metencephalon loodrecht op die van het myelencephalon komen te staan. Als gevolg van deze kromming is de tela chorioidea van het myelencephalon geplooid op de plaats waar de plexus chorioideus van de IV^e ventrikel zich zal gaan ontwikkelen. De aanleg van het cerebellum is in dit stadium nog niet te zien. Vooral in het metencephale gebied is in de basale plaat (pons) de marginale zone — waarin veel vezels lopen — reeds goed ontwikkeld.

Met betrekking tot de zintuigen valt op te merken, dat de oogontwikkeling is gevorderd tot het stadium, waarin de lens binnen de opening van de oogbeker is gekomen. Het binnenblad van de oogbeker (de retina) toont reeds enige differentiatie; het buitenblad (het pigmentblad) ligt er als een dunne laag van pigmentcellen tegenaan (Plaat VII, fig. 1a, b, c en d en Plaat XIV, fig. 9).

Voor een beschrijving van het ontwikkelingsstadium, dat het binnenoor heeft bereikt, wordt verwezen naar het volgende hoofdstuk.

Bij de controle-embryonen werd geen abnormale ontwikkeling van de hersenen of de zintuigen waargenomen.

B Bestraalde embryonen

Van de 75 bestraalde embryonen konden er 44 (58.7 %) als gevolg van resorptie niet histologisch worden bestudeerd. De resterende 31 werden zowel macroscopisch als microscopisch onderzocht. Zij konden op grond van hun kenmerken weer in vijf groepen worden ingedeeld.

1. Embryonen zonder aantoonbare hersenmisvormingen 3 (4.0 %). Deze embryonen zijn in alle opzichten volkomen normaal.
2. Embryonen met proliferatieve processen in het neurale epitheel: 3 (4.0 %). De tot deze groep behorende embryonen tonen zeer geringe

afwijkingen, in de zin van geïsoleerde intramesenchymale proliferaties. Deze zijn uitsluitend gelocaliseerd ter hoogte van het mesencephalon. De algemene vorm van de hersenen en de zintuigen is echter geheel normaal.

3. Embryonen met proliferatieve processen in combinatie met *microcephalie*: 19 (25.3 %). Bij de embryonen van deze groep waren van het proliferatieve proces, met uitzondering van de geïsoleerde intra-ventriculaire en de juxta-ectodermale proliferaties, alle verschijningsvormen nog aanwezig. De geïsoleerde intramesenchymale proliferaties blijken echter duidelijk in aantal en omvang afgenomen te zijn. Blijkens de waarnemingen speelt zich hierbij waarschijnlijk het volgende af: De neuro-ectodermale cellen schrompelen ineen en de mitotische activiteit neemt af. Op deze wijze ontstaat geleidelijk een massief celklompje zonder centraal lumen. In de cellen treden dan verschijnselen van desintegratie op, en zo gaat het celklompje in het omgevende mesenchym te gronde (Plaat VII, fig. 3). In het geheel zijn de hersenen geringer van omvang dan bij de controle-embryonen, doordat óf alle óf enkele hersenblaasjes in groei achterblijven. De histologische differentiatie van de wand is echter, op de plaatselijke murale proliferaties na, geheel normaal (Plaat VII, fig. 4).

4. Embryonen met proliferatieve processen in combinatie met *microcephalie* en *exencephalie*: 2 (2.7 %). De hersenen van deze embryonen zijn gedeeltelijk gekenmerkt door een te geringe omvang, gedeeltelijk ook door een openblijven van de neurale groeve. Dit laatste is hier beperkt tot het gebied van het telencephalon, het diencephalon en het mesencephalon. De dikte van de open gebleven neurale plaat is geringer dan de wanddikte van een normaal ontwikkelde neurale buis; niettemin zijn verschillende lagen waarneembaar. Bij beide embryonen is het lumen van de IV^e ventrikel geheel opgevuld met prolifererende neuro-ectodermale cellen. Het mesenchym is ter hoogte van de open hersendelen zeer losmazig en vaatrijk.

Ter hoogte van het binnenoor is bij één van de tot deze groep behorende embryonen de continuïteit van het myelencephalon plaatselijk — als gevolg van een desintegratieproces — verbroken (Plaat XI, fig. 1, 2 en 3 en Plaat XIV, fig. 7 en 8). Bij twee embryonen werd bovendien naast de hersenmisvormingen samenhang van de beide oorblaasjes waargenomen. Voor een uitvoerige beschrijving hiervan wordt naar hoofdstuk IV verwezen.

5. Embryonen met proliferatieve processen in combinatie met *hydrocephalie*: 4 (5.3 %). Bij de embryonen van deze groep zijn alle ventrikels te wijd. De wand van de hersenen is hier dunner dan bij de controle-embryonen, zelfs ondanks het feit, dat vooral in het mesencephalon — maar ook elders — zowel murale als intramurale proliferaties voorkomen (Plaat VII, fig. 2).

Bij geen der embryonen van deze experimentele reeks werden afwijkingen van de chorda waargenomen.

EXPERIMENTELE SERIE VI

Op de 13^e dag na de conceptie, werden bij 25 muizen, die vijf dagen tevoren waren bestraald, 223 embryonen uit de uteri verkregen; 75 hiervan waren bestraald, 148 niet. Na macroscopische inspectie werden alle embryonen, die voor verder microscopisch onderzoek in aanmerking kwamen, gefixeerd.

A Controle-embryonen (onbestraald)

Van de 148 controle-embryonen bleken er bij fixatie 18 (12.2 %) geresorbeerd. Van de 130 niet geresorbeerde embryonen werden er in totaal 30 histologisch onderzocht. De normale hersenen toonden in dit stadium de volgende bouw:

Door de groei van zowel het corpus striatum van het hemisfeerblaasje als de zijwand van het diencephalon heeft de verbinding tussen zijventrikel en III^e ventrikel zich vernauwd tot het foramen interventriculare. De dunne bovenwand van dit foramen plooit zich in de ventrikel. Het corpus striatum is door een groeve aan de bovenzijde in een mediaal deel en een lateraal deel gesplitst. De telencephale cortex toont verder nog weinig differentiatie. Door verdikking van de zijwanden van het diencephalon is de III^e ventrikel tot een smalle ruimte geworden. De neuro-hypophyse is innig met de oro-hypophyse vergroeid. Het lumen van het mesencephalon, hoewel nog zeer wijd, is in vergelijking met het vorige stadium iets nauwer geworden, doordat de laterale wanden en de bodemplaat in dikte zijn toegenomen. In het gebied van het metencephalon is uit de dakplaat de parige cerebellumaanleg ontstaan, die van bovenaf in de IV^e ventrikel uitgroeit.

Wat de zintuigen betreft, hebben de zenuwvezels, die uit het reukepitheel komen, de bulbi olfactorii bereikt. Het lumen in de oogsteel is sterk vernauwd; tegelijk is de dikte van de N. opticus toegenomen. Tussen retina en lens begint men het corpus vitreum te zien; de lens zelf is opgebouwd uit lensvezels en lenspitheel. Voor de ontwikkelingsgraad van het binnenoor in dit stadium zij verwezen naar het volgende hoofdstuk.

Bij geen der controle-embryonen werden macroscopische of microscopische afwijkingen van hersenen of zintuigen waargenomen.

B Bestraalde embryonen

Van de 75 bestraalde embryonen konden er 49 (65.3 %) als gevolg van resorptie niet verder worden bestudeerd. De overige 26 werden zowel macroscopisch als microscopisch onderzocht; zij konden op grond van de gevonden afwijkingen in de volgende drie groepen worden ingedeeld.

1. Embryonen met proliferatieve processen in het neurale epitheel: 1 (1.3 %). Bij slechts één embryo werden proliferatieve processen zonder meer waargenomen. Dit waren twee murale extraventriculaire proliferaties, die waren uitgegroeid van het neuro-ectoderm van het mesencephalon. De omvang en de histologische differentiatie van de hersenen waren volkomen normaal in vergelijking met die van de controle-embryonen.

2. Embryonen met proliferatieve processen in combinatie met *microcephalie*: 22 (29.3 %). Evenals in de vorige serie, waren de embryonen met deze combinatie van afwijkingen het grootst in aantal. Ondanks proliferatieve processen van het neurale epitheel is de hersenomvang als geheel toch ten achter gebleven, hetgeen vooral in het gebied van het telencephalon, het diencephalon en het mesencephalon opvalt. De ventrikels zijn klein en bovendien door de lokaal verdikte en misvormde wanden sterk vernauwd. Bij enkele microcephale embryonen is de laterale uitstulping van het prosencephalon niet tot stand gekomen; hier ontbreken dus de hemisferen van het telencephalon.

In vergelijking met de vorige serie is het proliferatieve proces, waarvan dezelfde verschijningsvormen aanwezig zijn, hier minder sterk uitgesproken. Het prolifererende murale neuro-ectoderm toont dezelfde histologische differentiatie-verschijnselen als de normale neurale buis;

de perifere lagen krijgen dus een vezelstructuur, terwijl in de binnenste laag de celdelingen plaatsvinden.

Bij één embryo werd naast de genoemde hersenmisvormingen samenhang van de beide binnenoorstructuren waargenomen. De verschijnselen van *microcephalie* zijn hier gelocaliseerd in het myelencephalon. Voor een nadere beschrijving van dit embryo wordt verwezen naar hoofdstuk IV.

3. Embryonen met proliferatieve processen in combinatie met *microcephalie* en *exencephalie*: 3 (4.0 %). Deze embryonen tonen tegelijkertijd *exencephalie* en een sterke achterstand in groei van de hersenen (Plaat XV, fig. 16). De neurale plaat heeft de kop omgroeid, zodat deze plaatselijk niet met gewoon ectoderm maar met neuro-ectoderm is bekleed. De differentiatie van de opengebleven neurale plaat is wat de indeling in lagen betreft normaal, maar histologisch is — in vergelijking met de situatie bij de controle-embryonen — de celdichtheid sterk verminderd, behalve in de germinatieve zone en ter plaatse van intramurale proliferatie. Het mesenchym toont in het gebied van de opengebleven hersendelen weer de typische losmazigheid en vaatrijkdom. Met betrekking tot de zintuigen bleek, dat bij deze embryonen noch het oog, noch de bulbus olfactorius tot ontwikkeling is gekomen; het binnenoor daarentegen is normaal gevormd.

Hydrocephale embryonen werden in deze experimentele serie niet aangetroffen.

Bij geen enkel van de embryonen waren afwijkingen van de chorda aanwezig.

Tenslotte wordt in Tabel I nog eens een overzicht gegeven van alle onderzoekresultaten, tenminste voorzover deze de (abnormale) ontwikkeling van de hersenen betreffen. In de tabel zijn de embryonen van alle zes proefseries ondergebracht in categorieën, die bepaald zijn door het hoofdkenmerk van de hersenontwikkeling van de betreffende embryonen. Dit laatste houdt dus in, dat een embryo met bijvoorbeeld proliferatieve veranderingen en *microcephalie* opgenomen is in de categorie „*microcephalie*”. Tevens zijn in de tabel vermeld de aantallen der geresorbeerde embryonen en der embryonen zonder aantoonbare hersenmisvormingen. Daar het aantal exemplaren in elke proefreeks hetzelfde is, kunnen in de tabel vermelde absolute getallen tevens beschouwd worden als verhoudingsgetallen.

Uit de tabel blijkt in de eerste plaats, dat het aantal bestraalde embryonen, dat geresorbeerd wordt, in de achtereenvolgende proefseries steeds groter wordt. Deze toename is statistisch significant ($P < 0.001$)¹⁾. Dit betekent dus, dat met een toenemend tijdsverloop na de bestraling een steeds groter aantal der bestraalde embryonen sterft. Voorts blijkt, dat het aantal van de embryonen, die geen eigenlijke hersenmisvormingen (maar althans in de eerste paar dagen wel verschijnselen van verval van hersenweefsel) tonen, zeer snel met de tijd afneemt. Deze daling is statistisch significant ($P < 0.001$). Eveneens wordt met de tijd een duidelijke daling gevonden van het aantal van de embryonen, die als enige afwijking het voorkomen van proliferatieve veranderingen hebben ($P < 0.001$). Het verschijnsel van de microcephalie (gecombineerd met proliferatie) doet zich na het ontwikkelingsstadium van $9\frac{1}{2}$ dag (serie II) steeds veelvuldiger voor; hoewel de stijging niet groot is, en ook niet geheel regelmatig, is ze niettemin significant ($P < 0.001$). Het aantal der embryonen, die exencephalie (gecombineerd met microcephalie en proliferatieve veranderingen) tonen, neemt in de onderzochte ontwikkelingsperiode geleidelijk af. De hier geconstateerde daling is statistisch significant ($P < 0.001$). De hydrocephalie blijkt een afwijking te zijn, die onregelmatig voorkomt. Zoals uit de tabel al wel is te vermoeden, is er in de aantallen van de embryonen met deze afwijking geen tendentie tot stijging of daling aan te tonen. Ten slotte behoeft het geen verwondering te wekken, dat er onder de embryonen van serie I (9 dagen) nog geen worden vermeld, die microcephalie, exencephalie of hydrocephalie tonen; in dit stadium zijn namelijk de embryonen nog niet ver genoeg ontwikkeld om de aanwezigheid van deze hersenmisvormingen (met voldoende zekerheid) te kunnen vaststellen.

¹⁾ Voor de statistische bewerking is hier gekozen de toets van Terpstra tegen het verloop in steekproeven. P geeft de kans aan, die men heeft, dat men zich bij de betreffende uitspraak vergist. Is dus de waarde van P kleiner dan 0.001, dan betekent dit, dat de kans op een vergissing bij de vermelde uitspraak kleiner is dan één op duizend. Een uitkomst zal als statistisch significant worden beschouwd, als de waarde van P kleiner is dan 0.05.

TABEL I

Samenvatting der onderzoekresultaten, tenminste voorzover deze de (abnormale) ontwikkeling van de hersenen betreffen. Tevens is vermeld, hoeveel embryonen geresorbeerd waren en hoeveel er geen hersenmisvormingen toonden.

CATEGORIËN DER AFWIJINGEN	ONDERZOEKREEKSEN					
	Serie I (9 dagen)	Serie II (9½ dag)	Serie III (10 dagen)	Serie IV (11 dagen)	Serie V (12 dagen)	Serie VI (13 dagen)
Geresorbeerd.	11	22	24	35	44	49
Geen aantoonbare misvormingen.	45	10	8	2	3	0
Uitsluitend proliferatieve veranderingen.	19	13	13	2	3	1
Microcephalie	—	14	19	17	19	22
Exencephalie.	—	14	11	7	2	3
Hydrocephalie	—	2	0	12	4	0
Totaal.	75	75	75	75	75	75

HOOFDSTUK IV

WAARNEMINGEN OVER HET ONTSTAAN VAN MISVORMINGEN VAN HET BINNENOOR

Zoals reeds terloops werd vermeld, werden bij een aantal embryonen — naast de reeds beschreven misvormingen van de hersenen — afwijkingen van het binnenoor waargenomen. Deze afwijkingen waren van dien aard, dat zij te samen als een teratomorfe reeks mogen worden beschouwd. De afstand tussen de aanleg van rechter en linker binnenoor wordt in deze reeks in toenemende mate kleiner dan normaal, waarbij het tenslotte komt tot een samenhang (synotie).

In het onderstaande zal van elk der bestudeerde ontwikkelingsstadia (9, 9½, 10, 11, 12 en 13 dagen na de conceptie) eerst een korte beschrijving van de normale verhoudingen worden gegeven, waarna dan telkens in aansluiting de gevonden abnormaliteiten worden besproken.

De normale ontwikkeling van het binnenoor begint aan het einde van de 9^e dag na de conceptie met het verschijnen van de beide oorplacoden, lateraal van het zich vormende rhombencephalon. Dit gedeelte van de neurale buis is op het moment, waarop de ectodermverdikking ter plaatse van de placoden optreedt, nog niet gesloten. Vanuit de rand van de neurale plaat, die door slechts enkele ectodermcellen van de oorplacode is gescheiden, migreren cellen van de neurale lijst tussen de placode en de wand van het rhombencephalon door naar ventraal (Plaat VIII, fig. 1).

Bij de embryonen van de eerste experimentele reeks, gefixeerd op de 9^e dag, werden geen embryonen waargenomen, waarbij rechter en linker oorplacode ontwikkelingsstoornissen toonden of dichter bij elkaar lagen dan normaal.

Op 9½ dag na de conceptie wijken bij de normale embryonen de laminac alares van het inmiddels gesloten rhombencephalon lateraalwaarts uit, waardoor de typische vorm van dit hersenblaasje ontstaat.

Het dunne dak — één cellaag dik — is innig met het er overheen liggende ectoderm vergroeid. Door instulping zijn uit de oorplacoden de oorblaasjes ontstaan. In dit stadium der ontwikkeling staat de ruimte binnen elk blaasje nog door een kleine opening met de amnionholte in verbinding. Het lateraalwaarts uiteenwijken van de rhombencephale laminae alares heeft de afstand tussen de aanleg van het rechter en linker binnenoor vergroot (Plaat VIII, fig. 2).

In de overeenkomstige tweede experimentele serie (9½ dag na de conceptie), kwamen 9 embryonen voor, die in het rhombencephalon ter hoogte van de oorblaasjes misvormingen toonden; zij werden op grond van hun hersenafwijkingen in groep 3 van deze serie (proliferatieve processen in combinatie met *microcephalie*) ondergebracht. Ten aanzien van deze rhombencephale misvormingen kan worden opgemerkt, dat: (1) de dorso-ventrale doorsnede van het rhombencephalon te klein is, (2) de laminae alares niet lateraalwaarts zijn uitgeweken, waardoor (3) het dunne dak van dit hersenblaasje ontbreekt en (4) het rhombencephalon vrij ligt van het er overheen liggende ectoderm. Door de geringe ontwikkeling van dit deel der hersenen ontbreekt de normaliter aanwezige ronding ter plaatse van het achterhoofd; hier bestaat een sterke afplatting (Vergelijk Plaat VIII, de fig. 2 en 3).

De vorm, grootte en graad van differentiatie van de oorblaasjes zijn bij deze embryonen normaal. In alle gevallen is echter de afstand tussen de twee oorblaasjes kleiner dan bij overeenkomstige controle-embryonen; en deze afstand is daarbij des te sterker verkleind, naarmate de misvorming van het rhombencephalon sterker uitgesproken is (Vergelijk Plaat VIII, de fig. 2 en 3).

Op de 10^e dag zijn bij een normale ontwikkeling de laminae alares van het rhombencephalon nog verder naar lateraal uitgeweken; het dunne dak ligt nog steeds tegen het ectoderm aan. De open verbinding van het lumen van het oorblaasje met de amnionholte is in de meeste gevallen verdwenen, soms is als rest daarvan nog een epitheelstreng te vinden. De wand van het oorblaasje is nu aan de onderzijde uit meer cellagen opgebouwd dan aan de bovenzijde; hierdoor zijn de eerste verschillen tussen het onderste, cochleaire deel en het bovenste, vestibulaire deel dus reeds aangeduid (Plaat VIII, fig. 4). Tegen de vooronderzijde van het oorblaasje is het stato-acustische ganglion gelegen.

Bij 11 bestraalde embryonen van de derde experimentele serie, die

eveneens 10 dagen oud waren, werd een sterke onderontwikkeling van het rhombencephalon ter hoogte van de zich ontwikkelende oorblaasjes vastgesteld. Evenals bij de embryonen van $9\frac{1}{2}$ dag het geval was, ligt ook hier het rhombencephalon vrij van het ectoderm. In de germinatieve zone van de laminae alares is de mitotische activiteit sterk verminderd; in die van de laminae basales is deze activiteit normaal. Dienovereenkomstig is dan ook het aantal cellagen in de laminae alares te klein, en in de laminae basales normaal. Ook bij deze embryonen valt de sterke afplatting van het achterhoofdsgebied op.

Bij tien van deze 11 bestraalde embryonen wordt als enige afwijking gevonden, dat de oorblaasjes te dicht bij elkaar liggen; hun grootte en hun histologische differentiatie is echter normaal (Vergelijk Plaat VIII, de fig. 4 en 5). Bij één embryo van deze serie (CR I_a) is evenwel het rhombencephalon — vooral wat betreft de laminae alares — extreem in ontwikkeling achtergebleven. Tussen de dakplaat ervan en het ectoderm is een dunne buis gelegen, die rechter en linker oorblaasjes met elkaar verbindt. Deze buisvormige verbinding, die dus dorsaal van het rhombencephalon ligt, staat op één plaats met het er overheen liggende ectoderm in contact, waarbij de cellen van de wand van de buis en die van het ectoderm met elkaar een continue laag blijken te vormen (Plaat VIII, fig. 6 en 7). Blijkens de wasmodellen en tekeningen, gemaakt van dit embryo en een even oud controle-embryo, is het rhombencephalon van het bestraalde embryo — ter hoogte van de tot fusie gekomen binnenooraanleg — sterk versmald en bovendien in zijn geheel aanzienlijk in ontwikkeling achtergebleven (Plaat XII, fig. 1a en 1b; Plaat XIII, fig. 1 en 2).

Op de 11^e dag van de normale embryonale ontwikkeling is, zoals reeds vermeld, een duidelijke histologische differentiatie van de laminae basales van het myelencephalon zichtbaar. Tussen het dak van dit hersendeel en het er overheen liggende ectoderm bevindt zich vaatrijk mesenchym, dat waarschijnlijk van belang is voor de vorming van de plexus chorioideus van de IV^e ventrikel.

De dicht tegen de laminae alares gelegen oorblaasjes, zijn als gevolg van de sterke verbreding van het myelencephalon in latero-ventrale richting verplaatst. Uit het vestibulaire deel (met dun epitheel) zijn in medio-dorsale richting de ductus en saccus endolymphaticus uitgegroeid; uit het cochleaire deel (met dikker epitheel) ontwikkelt zich in

ventro-mediale richting de ductus cochlearis. Het stato-acustische ganglion is nog steeds één grote ophoping van neurale cellen (Plaat IX, fig. 1). Craniaal van dit ganglion ligt het ganglion geniculi van de N. facialis.

Onder de bestraalde embryonen van de vierde experimentele reeks (eveneens gefixeerd op de 11^e dag) kwamen er 10 voor met een sterke misvorming van het myelencephalon. Het meest opvallende kenmerk van deze misvorming was, zoals ook bij de overeenkomstige embryonen van de vorige serie werd gevonden, een plaatselijke versmalling.

Bij zeven embryonen was deze versmalling juist craniaal van het gebied van de ooraanleg gelocaliseerd; en in al deze gevallen werd een verbinding tussen rechter en linker ganglion geniculi gevonden, dorsaal van de neurale buis (Plaat IX, fig. 5). Ten aanzien van de oorblaasjes werd hier géén misvorming geconstateerd, al waren zij dichter bij elkaar gelegen dan normaal (Plaat IX, fig. 2).

Bij één embryo (AR XX_c) waren zowel het metencephalon als het myelencephalon over vrijwel hun gehele lengte versmald, en dorsaal bleken zowel het rechter en linker oorblaasje met elkaar verbonden te zijn als ook de ganglia van de N. facialis en de N. stato-acusticus (Plaat IX, fig. 3 en 4).

Bij de resterende twee embryonen was de versmalling beperkt tot het gebied caudaal van de binnenooraanleg. Hier lagen de beide oorblaasjes te dicht bij elkaar. Misvormingen werden echter niet waargenomen; de rechter en linker ganglia van de Nn. glossopharyngeus en vagus waren op hun normale plaats gelegen en niet met elkaar verbonden.

De vormontwikkeling van de oorblaasjes is bij alle 10 embryonen vertraagd; zo zijn de ductus en saccus endolymphaticus en de ductus cochlearis nog niet gevormd. Dat ook hun omvang geringer is dan normaal, hangt waarschijnlijk samen met de algehele onderontwikkeling van de betreffende embryonen.

Wat in de transversaal gesneden coupes niet onmiddellijk tot uiting komt, maar uit de wasmodellen en reconstructie-tekeningen wél duidelijk blijkt, is, dat de bovengenoemde versmallingen resulteren in een diepe dwarse groeve aan de dorsale zijde van het (metencephalon en) myelencephalon; deze groeve viel al bij de macroscopische bestudering van de embryonen sterk op (Plaat XII, fig. 2a en 2b; en Plaat XIII, fig. 3 en 4).

Op de 12^e dag na de conceptie is als gevolg van het ontstaan van de

pontine flexuur het basale deel van het myelencephalon naar voren gekanteld, en bij dezelfde snijrichting (transversaal op de kruin-stuitlijn), wordt nu dus tussen de oorblaasjes een iets lager deel van het myelencephalon aangesneden dan tevoren. Hierdoor wordt in de microscopische coupes het aspect van het aangesneden deel van de hersenaanleg gewijzigd.

Uit de weergegeven coupes van een controle-embryo (Plaat X, fig. 1 en 2) blijkt, dat het vestibulaire deel van het oorblaasje zich normaliter al sterk ontwikkeld heeft; het heeft zich in drie loodrecht op elkaar staande vlakken afgeplat. De ductus cochlearis is verder in ventro-mediale richting uitgegroeid. Het stato-acustische ganglion is morfologisch nog niet te verdelen in een vestibulair en een cochleair deel, maar de zenuwbundels komende van het ganglion lopen reeds gescheiden naar beide delen van het binnenoor. Antero-lateraal van het stato-acustische ganglion ligt het ganglion van de N. facialis; het motorische deel van deze zenuw, komende van het myelencephalon, loopt tussen de beide ganglia door in de richting van de tweede kieuwboog.

Onder de bestraalde embryonen van de vijfde experimentele reeks (12^e dag na de conceptie) komen er 4 voor, waarbij het metencephalon en het myelencephalon geheel of gedeeltelijk gedeformeerd zijn. Bij twee hiervan is deze deformatie betrekkelijk gering. Hier toonden de oorblaasjes geen misvormingen, al lagen ze dan dicht bij elkaar dan normaal. Ook de ganglia van de N. facialis en de N. stato-acusticus toonden geen afwijkingen.

Het wasmodel en de reconstructie-tekening van het derde embryo (DR XIX_a) laten duidelijk zien, dat in dit geval een diepe groeve in het occipitale gebied bestaat, die maakt dat de kop slechts weinig naar ventraal is gebogen (Plaat XII, fig. 3a en 3b; en Plaat XIII, fig. 5 en 6). Microscopische bestudering toont, dat er ter plaatse van deze groeve slechts resten van de laminae basales van het myelencephalon bestaan; de laminae alares ontbreken. Dorsaal van deze resten zijn de primordia van rechter en linker binnenoor met elkaar verbonden. Geheel rechts en links zijn normale cochleaire en vestibulaire delen te zien. De verbinding bestaat uit een buis, die gevormd wordt door de beide ductus endolymphatici. In de mediaanlijn ligt een onparige saccus endolymphaticus. Verder zijn ook de rechter en linker stato-acustische ganglia met elkaar verbonden; de overige ganglia hebben echter geen verbinding met elkaar (Plaat X, fig. 3, 4 en 5).

Bij het vierde embryo (DR IV_a) zijn er, naast ernstige exencephale

misvormingen van de drie voorste hersendelen, in het gebied van het myelencephalon en van het cervicale deel van het ruggemerg onderbrekingen in de continuïteit van de neurale buis (Plaat XIV, fig. 7 en 8). Ter hoogte van de myelencephale onderbreking liggen mediaan de breed met elkaar verbonden oorblaasjes. De wand hiervan is vrijwel ongedifferentieerd; cochleaire en vestibulaire delen zijn er niet met zekerheid aan te onderscheiden (Plaat XI, fig. 1, 2 en 3).

Op de 13^e dag na de conceptie is het normale binnenoor, als gevolg van een ventraalwaartse migratie, lateraal van de basis van het myelencephalon komen te liggen. De halfcirkelvormige kanalen hebben zich gevormd; de ductus cochlearis groeit spiraalvormig uit, waarbij het deel van het stato-acustische ganglion, dat het ganglion spirale wordt, aan de binnenzijde van deze buis meegroeit en zijn kromming volgt. Verder zijn ook de sacculus en utriculus gevormd. De ductus endolymphaticus is in dorsale richting verder uitgegroeid, zodat de saccus endolymphaticus nu vlak bij de recessus lateralis van de IV^e ventrikel ligt.

Bij de even oude bestraalde embryonen van de zesde experimentele reeks zijn er 4, waarbij de hersenen ter hoogte van het binnenoor gedeformeerd zijn. Macroscopisch gaat deze deformatie weer met de reeds bekende, uitwendig zichtbare groeve in het occipitale gebied gepaard (Plaat XV, fig. 16). Bij drie van deze embryonen lagen rechter en linker binnenoor alleen maar te dicht bij elkaar; hun vormontwikkeling was normaal.

Bij één embryo (GR XIX_a) werd evenwel een samenhang van het rechter en linker binnenoor waargenomen. Deze samenhang droeg hetzelfde karakter als die, gevonden bij het embryo DR XIX_a van de vorige experimentele reeks; alleen wordt hier de verbindingsbuis gevormd door de beide ductus endolymphatici (mediaal) en het rechter en linker crus commune van de halfcirkelvormige kanalen (lateraal). De overige binnenoorden hebben zich beiderzijds in normale zin verder ontwikkeld (Plaat XI, fig. 4 tot en met 7; Plaat XII, fig. 4a en 4b; Plaat XIV, fig. 10 en 11; en Plaat XV, fig. 12 en 13).

Uit hetgeen in het voorgaande is beschreven, blijkt, dat vanaf het stadium van 9½ dag — het eerste stadium waarin in het gebied van het rhombencephalon ontwikkelingsstoornissen, leidend tot onderontwikkeling, worden waargenomen — abnormaliteiten in de localisatie van de oorblaasjes worden gezien. Deze abnormaliteiten variëren in elk

van de proefseries II tot en met VI in gradatie. Telkens kan men, zonder overigens te letten op de ernst van de ontwikkelingsstoornissen van het rhombencephalon (later het myelencephalon), de gevallen van abnormale topografie van de oorblaasjes ongedwongen rangschikken in een zeer bepaalde volgorde. Een goed voorbeeld hiervan wordt gevormd door de vier beschreven embryonen van de proefserie V. Bij twee daarvan waren de oorblaasjes weliswaar normaal ontwikkeld, maar lagen zij dicht bij elkaar. Bij het ene embryo (DR XXIII_c) was de afstand tussen de beide binnenoorprimordia echter niet zoveel te klein als bij het andere (DR XXII_b). Uitgaande van de afstand bij normale controle-embryonen was deze dus bij het embryo DR XXIII_c enigszins kleiner, en bij het embryo DR XXII_b aanmerkelijk kleiner. Bij het embryo DR XIX_a was de afstand tussen rechter en linker binnenooraanleg nog weer aanzienlijk kleiner; bij dit embryo blijkt nu een samenhang te zijn opgetreden, die daarin bestaat dat de beide ductus endolymphatici — duidelijk als zodanig te herkennen — te samen één buis vormen, die mediaan een dorsale uitstulping, een onparige saccus endolymphaticus, heeft. De volledige gepaardheid van de binnenooraanleg is hier dus verloren gegaan: in plaats van twee sacci endolymphatici is er hier één. Bij het vierde embryo (DR IV_a) liggen de beide primordia van het binnenoor zeer dicht bij elkaar. Onder deze voorwaarde is er van enige gepaardheid nauwelijks nog sprake. Slechts een geringe insnoering in de mediaanlijn verraadt, dat men hier te maken heeft met een blaas, die in aanleg gepaard was of dit geweest moet zijn. In de andere proefseries, waarin mede embryonen met synotie voorkomen, treft men iets geheel overeenkomstigs aan. Ook daar komen gevallen voor, waarin de primordia van rechter en linker binnenoor in wisselende mate dicht bij elkaar liggen dan normaal, maar samenhang tussen deze primordia wordt weer alleen gezien, waar de afstand die hen scheidt het allerkleinst is.

Deze waarnemingen, gedaan in vier van de vijf beschikbare proefreeksen (de serie II omvat geen embryonen met synotie), duiden met stelligheid aan, dat men hier inderdaad heeft te doen met wat men verstaat onder een teratomorfe reeks, t.w. een reeks van ontwikkelingsanomalieën van in beginsel hetzelfde karakter maar met een verschijningsvorm, die afhankelijk is van de graad van sterkte waarin de eraan ten grondslag liggende abnormaliteit zich voordoet. Zo mag men dan ook concluderen, dat het te dicht bij elkaar liggen van de beide oorblaasjes

TABEL II

Overzicht van de waargenomen abnormaliteiten in de localisatie, resp. de ontwikkeling van de beide oorblaasjes bij verschillende graden van onderontwikkeling van het rhombencephalon of (later) myelencephalon.

Aard van de waargenomen abnormaliteiten	Graad van onderontwikkeling van de neurale buis ter hoogte van de oorblaasjes:		
	licht	matig	ernstig
Rechter en linker binnenooraanleg liggen slechts weinig dicht bij elkaar	9	0	0
Rechter en linker binnenooraanleg liggen veel te dicht bij elkaar	5	14	5
Synotie	0	0	5

pas dan leidt tot samenhang, wanneer een bepaalde drempelwaarde van de afstand is overschreden; en dat, indien dit laatste het geval is, de mate van samenhang — dus de mate van synotie — geheel afhankelijk is van de mate, waarin die drempelwaarde in een gegeven geval overschreden is.

Tenslotte wordt in Tabel II nog een overzicht gegeven van de waargenomen abnormaliteiten in de localisatie en eventueel ook in de ontwikkeling van de beide oorblaasjes in relatie tot de bij de betreffende waargenomen graad van onderontwikkeling van het rhombencephalon, resp. het myelencephalon. Deze mate van onderontwikkeling is in de tabel uitgedrukt in drie graden van ernst, t.w. licht, matig en ernstig. Als criteria voor een lichte onderontwikkeling golden: (1) de aanwezigheid van geringe ontwikkelingsstoornissen in de laminae alares, (2) een nog enigszins lateraalwaarts uiteenwijken van deze laminae, (3) een te vroeg tot stand komende scheiding van de dakplaat en het ectoderm, of (later) een wat te grote afstand hiertussen, en (4) een geheel normale ontwikkeling van de laminae basales. Tot het bestaan van een matige onderontwikkeling werd besloten, als (1) de laminae alares ernstig in ontwikkeling waren gestoord, (2) de IV^e ventrikel slechts werd gerepresenteerd door een smalle dorso-ventrale spleet, (3) er een veel te grote afstand tussen dakplaat en ectoderm bestond, en (4) de laminae basales

geringe ontwikkelingsstoornissen toonden. Als ernstig werden die gevallen gekwalificeerd, die de volgende kenmerken hadden: (1) desintegratie of afwezigheid van de laminae alares, (2) een zeer brede strook mesenchym tussen de neurale buis en het ectoderm, en (3) een zeer sterke onderontwikkeling of zelfs totale afwezigheid van de laminae basales. Met betrekking tot de abnormaliteiten in de localisatie, resp. in de ontwikkeling van de oorblaasjes werden drie categorieën onderscheiden. Daarbij werd als criterium voor de beide eerste in de tabel vermelde categorieën alleen het uiteraard enigszins arbitraire kenmerk van het afstandsverschil toegepast; de derde categorie — die van de synotie — omvat natuurlijk alleen die gevallen, waarin tussen de oorblaasjes samenhang bestond.

Wanneer nu, zoals in Tabel II is gebeurd, alle 38 embryonen waarbij ten aanzien van de aanleg van rechter en linker binnenoor enigerlei anomalie werd gevonden, naar de hiervoor genoemde criteria worden ingedeeld, wordt op slag het zeer sterke verband tussen de ernst der rhombencephale, resp. myelencephale ontwikkelingsstoornissen en de anomalieën van de oorblaasjes duidelijk. Blijkens de getallen worden de waargenomen anomalieën van deze blaasjes recht evenredig ernstiger met toenemende ernst van de ontwikkelingsstoornissen van de genoemde hersendelen. Het heeft er alle schijn van, dat de graad van de anomalieën in de localisatie en in de ontwikkeling van de oorblaasjes wordt bepaald door de ernst van de stoornissen in de ontwikkeling van het tussen hen in gelegen deel van de neurale buis, en dat dus de mogelijkheid tot het bestaan van de teratomorfe reeks van de waargenomen oorblaasanomalieën in wezen hierop is terug te voeren. Deze indruk, dat op de een of andere wijze de oorblaasanomalieën secundair zijn aan de stoornissen in het rhombencephalon, en eventueel ook in het myelencephalon, wordt nog aanzienlijk versterkt door het feit, dat terwijl blijken van deraillering in het neurale weefsel overvloedig zijn, abnormaliteiten in de vormdifferentiatie en ook in de histologische differentiatie van de oorblaasjes eerder uitzondering dan regel zijn. En voorts is in dit verband nog van belang, dat ook verbindingen van rechts en links kunnen ontstaan van andere structuren dan de oorblaasjes. Immers, als een matige of ernstige onderontwikkeling van de neurale buis niet optreedt precies ter hoogte van de oorblaasjes maar iets meer naar craniaal, dan blijken — zoals is beschreven — de ganglia geniculi met elkaar te zijn verbonden. Ook met de stato-acustische ganglia kan dit overigens het geval zijn.

HOOFDSTUK V

BESCHOUWINGEN

Met betrekking tot de materiële en technische voorzieningen, die voor de uitvoering van dit onderzoek moesten worden getroffen, werd in de hoofdstukken I en II vooropgesteld, dat een zo groot mogelijke constantheid van variabele factoren — van welke aard dan ook — de eerste vereiste was.

Ten aanzien van het uitgangsmateriaal — de proefdieren — werd op verschillende manieren getracht dit te bereiken. In de eerste plaats zijn embryonen gebruikt, waarvan het gerechtvaardigd is aan te nemen, dat zij in hun genetische eigenschappen gelijk waren. Verder is het milieu, waarin de moederdieren verbleven, steeds gelijk gehouden; ook de verzorging, die zij genoten, was steeds dezelfde. Door in de stal de dag te veranderen in nacht en omgekeerd de nacht in dag kon verder worden bereikt, dat de periode waarin de copulatie optreedt sterk wordt bekort: hier bestaat geen grotere variatiebreedte dan 2 uur. Voegt men hierbij de niet te beïnvloeden variatie in de tijdsduur, die verloopt tussen de copulatie en de bevruchting — gemiddeld 4 uur —, dan blijft dus in totaal nog een variatiebreedte van rond 6 uur bestaan. Deze variatiebreedte is echter aanzienlijk kleiner dan die, welke bij vrijwel alle in de literatuur vermelde onderzoeken bestond. De omkering van het dag-en-nachtrithme heeft er dus in hoge mate toe bijgedragen, dat de variatie in de ontwikkelingsgraad van de embryonen van de verschillende moederdieren aanmerkelijk kleiner was dan gewoonlijk. Tenslotte werd door de selectie van de moederdieren op het totale aantal embryonen, op de verdeling der embryonen over de uterushoorns en op de aanwezigheid van resorpties, een sterke verkleining van de variatie in de ontwikkeling van de embryonen van *hetzelfde* moederdier bereikt. Door al deze voorzorgen en maatregelen werd een uitgangsmateriaal verkregen van een grotere homogeniteit dan waarover men tevoren beschikte.

De toegepaste operatiemethode en de wijze van bestraling waren geheel gestandaardiseerd. In zeker opzicht was het een nadeel de be-

straling gepaard te doen gaan met een operatie. Immers, het complex van narcose en operatietrauma bleek te resulteren in een stijging van het bij de gebruikte proefdieren als normaal te beschouwen resorptiepercentage van 5 tot een hoogte van 9-13 procent (bij de controle-embryonen). Dit nadeel werd echter op de koop toe genomen, omdat hiertegenover het veel grotere voordeel stond, dat men op deze wijze zowel bestraalde embryonen als ook controle-embryonen van hetzelfde moederdier kan verkrijgen. Dit toch betekent, dat deze embryonen bij elk moederdier slechts in één opzicht aan een verschillende behandeling onderworpen waren, nl. al dan niet waren bestraald; overigens bleven hun milieu-omstandigheden praktisch gesproken gelijk. Een zodanig grote gelijkheid van milieu-omstandigheden voor de bestraalde embryonen en de controle-embryonen — op zichzelf bezien ook weer een factor, die de vergelijkbaarheid in hoge mate bevordert — is bij „total body irradiation” ten enen male onbereikbaar, omdat daar de controle-embryonen noodzakelijkerwijs embryonen moeten zijn van een ander moederdier. Een ander voordeel van de gebruikte methode boven de „total body irradiation” is dan natuurlijk verder nog, dat de invloed van de bestraling op het moederdier door de toegepaste afscherming tot een minimum beperkt bleef. Het gebruik van röntgenstralen als teratogeen agens heeft natuurlijk stellig nadelen; de straling werkt in beginsel specifiek en het is ook niet uit te maken, hoever de invloed ervan zich in de embryonale weefsels eigenlijk precies uitstrekt. Ditzelfde geldt echter evenzeer voor vrijwel alle andere lokaal te appliceren teratogene agentia. En tegenover deze laatste heeft de röntgenbestraling dan het grote voordeel, dat men deze uiterst nauwkeurig kan doseren. Met betrekking tot deze dosering moet nog worden opgemerkt, dat de bij de experimenten steeds gebruikte dosis van 400r blijkens de literatuurgegevens als vrij hoog moet worden beschouwd. Deze dosis werd echter gekozen, omdat daarbij te verwachten was, dat hersenmisvormingen — om de bestudering waarvan het hier in eerste instantie te doen was — zich in een hoog percentage der gevallen zouden voordoen. De hierbij eveneens te verwachten toename van het aantal resorpties behoefde niet als een al te groot nadeel te worden gezien, omdat de embryonen reeds betrekkelijk kort na de bestraling werden gefixeerd.

Uit het voorgaande moet men dus concluderen, dat de gebruikte onderzoeksmethode de beste is, die op het ogenblik binnen het bereik ligt, al voldoet zij stellig nog niet aan de allerhoogste eisen.

De uitkomsten van het onderzoek geven in de eerste plaats aanleiding tot de vraag, waaraan het te wijten is, dat bij toenemende leeftijd het aantal der gestorven (geresorbeerde) bestraalde embryonen zo sterk toeneemt. Hieraan zal natuurlijk stellig een kleine bijdrage zijn geleverd door het trauma van de narcose en de operatie, juist zoals dit het geval bleek bij de controle-embryonen. Blijkens de gegevens, vermeld in Tabel I, kan ook de sterfte zowel onder de embryonen met uitsluitend proliferatieve veranderingen als onder de exencephale embryonen aan de sterke toename van het aantal geresorbeerde embryonen hebben bijgedragen. Veel méér echter lijkt de met de tijd optredende daling in het aantal der embryonen zonder aantoonbare hersenafwijkingen van betekenis te zijn. Dit zou dan echter tot de paradoxale conclusie voeren, dat de sterfte onder de meest normale embryonen het hoogst zou zijn. Nog afgezien van het onwaarschijnlijke van deze conclusie, is het ook wel zeker, dat zij feitelijk onjuist is. Want hoewel geen beschrijving is gegeven van de embryonen, die gestorven waren, mag hier toch wel worden vermeld, dat de meeste daarvan juist ernstige misvormingen toonden, met name vaak exencephalie. Er moet dus wel een andere verklaring voor het verschijnsel zijn en deze is waarschijnlijk te vinden in het volgende. Vierentwintig uur na de bestraling zijn er naast de 11 geresorbeerde embryonen (14.7 %) — een percentage dat slechts weinig boven dat van de geresorbeerde controle-embryonen uitgaat — uitsluitend embryonen met proliferatieve veranderingen en embryonen zonder aantoonbare hersenafwijkingen te vinden. Een halve dag daarna, zijn de aantallen van deze laatste twee categorieën sterk afgenomen, terwijl nu voor het eerst embryonen met respectievelijk microcephalie, exencephalie en hydrocephalie worden gevonden. Het heeft er dus alle schijn van, dat met de tijd een doorschuiving optreedt, waarbij de embryonen geleidelijk steeds ernstiger hersenmisvormingen gaan tonen. In het verloop van de volgende dagen neemt dan, met uitzondering van de gevallen van microcephalic, het aantal embryonen met hersenmisvormingen af. Het zijn dan — naar men stellig mag vermoeden — vooral de sterkst misvormde embryonen (die met exencephalie en hydrocephalie), die de belangrijkste bijdrage leveren aan de toename van het aantal der geresorbeerde embryonen.

Met betrekking tot de *hersenmisvormingen* moet in de eerste plaats worden opgemerkt, dat bij géén der controle-embryonen afwijkingen

gevonden zijn. Bij de bestraalde embryonen zijn 24 uur na de bestraling twee veranderingen in het neuro-ectoderm opgetreden.

- 1° Bij de meeste embryonen werd karyopycnosis en celdood gezien in die laag van het neurale ectoderm, waar normaliter de celdeling plaats vindt; necrotische celresten werden in de amnionholte en/of ventrikels teruggevonden. Dergelijke degeneratieve veranderingen werden in andere weefsels niet gezien. Deze waarnemingen komen overeen met die van MURAKAMI en KAMEYAMA (1958) en RUGH en GRUPP (1959 a, b).
- 2° Naast deze degeneratieve veranderingen, werden 24 uur na de bestraling plaatselijk, en ook wel meer diffuus, progressieve processen gezien, die eveneens tot het neuro-ectoderm beperkt bleven. Deze progressieve processen bestaan uit twee onderscheiden componenten: ten eerste een pre-proliferatieve component, en ten tweede een proliferatieve component.

Bij de normale vroege ontwikkeling en differentiatie van het neuro-ectoderm nemen tijdens de prophase van de celdeling de neurale cellen een ronde vorm aan, en de kern verplaatst zich in de richting van de ventrikel. Hier — in de zogenaamde germinatieve zone of matrix — vindt nu de kerndeling plaats, waarna dan de dochterkernen weer naar de periferie terug migreren. Deze theorie van de kern-migratie werd door F. C. SAUER (1935) opgesteld en is later door WATTERSON, VENEZIANO en BARTHA (1956), M. E. SAUER en CHITTENDEN (1959), M. E. SAUER en WALKER (1959) en SIDMAN, MIALE en FEDER (1959) op haar juistheid getoetst en bevestigd.

Bij de bestraalde embryonen is nu dit normale gedragpatroon verstoord. De kern-migratie in de richting van de ventrikel wordt voortijdig onderbroken, waardoor in de middenlagen van de wand abnormale ophopingen van afgeronde neuro-ectodermale cellen optreden. Deze cellen wijken in morfologisch opzicht niet af van dergelijke cellen in de germinatieve zone; de enige abnormaliteit is gelegen in de localisatie.

De vorming van zulke abnormale celophopingen wordt in dit onderzoek bestempeld als een *pre-proliferatieve verandering*. Deze pre-proliferatieve verandering gaat geleidelijk over in een *proliferatieve verandering*, die dan gekenmerkt is door een overmatige toename van het aantal mitosen. Daardoor ontstaan in het neurale weefsel abnormale centra van proliferatie.

Wanneer deze pre-proliferatieve en proliferatieve veranderingen zeer

plaatselijk ontstaan, resulteren zij in de vorming van intramurale, muraal intraventriculaire, muraal extraventriculaire, geïsoleerd intraventriculaire en geïsoleerd extraventriculaire proliferaties. WILSON, BRENT en JORDAN (1952) hebben eveneens deze verschillende proliferatievormen bestudeerd, in verband met hun mogelijke samenhang met het ontstaan van hersentumoren. Hun conclusies ten aanzien van het uiteindelijke lot van deze plaatselijke proliferaties komen met hetgeen de eigen waarnemingen leren overeen. Het aantal en de grootte van deze proliferaties neemt aanvankelijk toe, maar neemt daarna geleidelijk weer af. Omtrent de oorzaak hiervan tast men nog in het duister; de genoemde auteurs zagen in elk geval geen verband tussen het verdwijnen van deze „tumoren” en tekorten in de vaatvoorziening. Een dergelijk verband werd ook bij het eigen onderzoek niet gevonden.

Behalve dat deze veranderingen in het gedragpatroon van de neuro-ectodermale cellen plaatselijk voorkomen, kunnen zij — zoals gezegd — ook meer diffuus aanwezig zijn. Het zijn deze diffuse veranderingen, die voor het ontstaan van de ernstige hersenmisvormingen mede van groot belang zijn. Alvorens hierop in te gaan, dient men zich echter af te vragen, in hoeverre de degeneratieve processen en de proliferatieve processen in het neuro-ectoderm typische gevolgen zijn van de röntgenbestraling. Immers, men zou willen weten, in hoeverre de beelden waargenomen bij dit onderzoek overeenstemmen met die, welke men onder andere omstandigheden vindt.

Voorzover in de literatuur kon worden nagegaan, worden degeneratieve veranderingen in het neurale weefsel, zoals hier beschreven, uitsluitend na röntgenbestraling gezien. Deze veranderingen moeten hiervan dus wel een direct gevolg zijn en moeten dan ook beschouwd worden als een typisch stralingseffect.

De proliferatieve veranderingen, plaatselijk zowel als diffuus, worden daarentegen veelvuldig beschreven, zowel bij embryonen van de mens als bij embryonen van proefdieren. Zo beschrijven o.m. ARIËNS KAPPERS (1955; 1957) en VAN LIMBORGH (1956) respectievelijk een embryo van de mens met embryopathia rubeolosa, en een embryo met „spontane” hersenmisvormingen, waarbij in het neuro-ectoderm plaatselijk proliferatieve veranderingen werden gevonden, die geresulteerd waren in intraventriculaire uitgroei. In een onderzoek naar de regeneratieve potenties van neurale weefsel, na extirpatie van bepaalde delen van de neurale plaat of beschadiging van het rhombencephalon, beschrijven

o.m. HARRISON (1947) bij amphibiën, en KÄLLÉN (1955), BERGQUIST (1959), JELINEK en KLIKA (1961) en KLIKA en JELINEK (1961) bij vogel-embryonen eveneens intramurale en intraventriculaire proliferaties van het neuro-ectoderm. Hieruit mag men dus concluderen, dat het proliferatieve proces een aspecifieke reactie van het neurale weefsel is, die na beschadiging van verschillende aard kan ontstaan.

Blijkens het voorgaande moeten dus de degeneratieve veranderingen gezien worden als een typisch effect van de röntgenbestraling, maar de progressieve veranderingen niet. Deze laatste onderscheiden zich in geen enkel opzicht van die, welke men onder andere omstandigheden waarneemt.

In aansluiting nu aan zowel de degeneratieve veranderingen als de diffuus optredende proliferatieve veranderingen van het neuro-ectoderm werden drie soorten van hersenmisvormingen gevonden:

microcephalie, exencephalie en hydrocephalie.

Microcephalie

De microcephalie — of eigenlijk beter de micro-encephalie — kan op twee manieren tot stand komen:

- a. door een vermindering van de mitotische activiteit in de laminae alares, maar ook — zij het minder uitgesproken — in de laminae basales, hetgeen zich uit in een vertraagde groei en differentiatie van de neurale buis.
- b. door een geleidelijk optredende desintegratie van het normale, maar ook van het tijdens de proliferatie gevormde overtollige neuro-ectoderm.

De onder (a) genoemde factor heeft voor het ontstaan van de microcephalie een veel grotere betekenis dan die, genoemd onder (b). De vertraging van de groei omvat immers één of meer hersenblaasjes in hun geheel. Bij de embryonen van de eerste twee experimentele reeksen was het vaststellen van microcephalie buitengewoon moeilijk, omdat een achterblijven in ontwikkeling van het neurale weefsel zich bij deze embryonen nog slechts alleen verraaft in een verminderde mitotische activiteit. Belangrijk is echter te constateren, dat de aanleg van de neurale plaat volkomen normaal moet zijn geweest, en dat de microcephalie dus secundair is.

Men kan zich de vraag voorleggen, hoe het komt, dat er na een ernstige

schade door een bestraling later toch altijd nog weer een aanmerkelijke groei optreedt, ook al is deze minder dan normaal. RUGH (1958) verklaart dit verschijnsel als volgt. Hij neemt aan, dat in het embryo de neuroblasten de meest stralingsgevoelige cellen zijn. Slechts zelden zouden deze cellen een dosering van 40r overleven. Daar echter in de wand van de neurale buis een reserve aan minder gevoelige voorstadia van deze cellen aanwezig is, zouden de beschadigde neuroblasten vervangen worden en kan zodoende toch nog een topografisch normale, maar in kwantiteit te geringe, ontwikkeling van de hersenen volgen. Als deze opvatting ten aanzien van de microcephale ontwikkeling juist is, zou het mogelijk zijn een goede verklaring te geven voor het grote aantal microcephale embryonen bij het eigen onderzoek: hoge doses veroorzaken immers sterke degeneratieve veranderingen en dus een relatief groot verlies van neurale weefsel.

De onder (b) genoemde factor, de desintegratie, is minder van algemeen belang maar speelt plaatselijk een grote rol. Deze desintegratie treedt op in de proliferaties, in de laminae alares en bij uitzondering ook in de laminae basales. Soms is zij zo sterk, dat (locaal) van de neurale buis nauwelijks iets overblijft, of zelfs een totale onderbreking van deze buis resulteert. De wijze, waarop de desintegratie hier tot stand komt, toont veel overeenkomst met die van de reeds eerder besproken proliferaties van kleine omvang. De neuro-ectodermale cellen schrompelen ineen, hun mitotische activiteit neemt af, het celverband gaat verloren, en uiteindelijk gaan de cellen geheel te gronde.

Zoals vermeld, zijn de verschijnselen van achterblijven in groei, proliferatie en desintegratie in de laminae alares veel sterker uitgesproken dan in de laminae basales. Dit wijst op een aanmerkelijk verschil in eigenschappen van deze laminae; een verschil, dat ook in andere opzichten al werd aangetoond. Zowel morfogenetische als histochemische verschillen werden gevonden door o.m. CHIQUOINE (1954), JURAND (1961), BENNETT, BADENHAUSEN en DUNN (1959) bij muize-embryonen, door BRACHET en DELANGE-CORNIL (1959) bij amphibiën, en door CORLISS en ROBERTSON (1963) bij vogel-embryonen.

Resumerend kan men dus zeggen, dat bij de microcephale ontwikkeling degeneratie, vermindering der mitotische activiteit en desintegratie, vooral van de laminae alares, de hoofdrol spelen. De proliferatieve processen zijn hier slechts bijkomstig.

Exencephalie

Deze misvorming van de hersenen kon pas in de tweede experimentele serie (9½ dag na de conceptie) voor het eerst worden vastgesteld, omdat tevoren de neurale groeve altijd nog open ligt. De exencephalie kan gelocaliseerd zijn in het telencephalon en/of diencephalon en/of mesencephalon, terwijl deze anomalie bij geen enkel embryo in het gebied van het rhombencephalon werd waargenomen.

De exencephalie berust op een niet sluiten van de neurale plaat. Naar alle waarschijnlijkheid wordt doordat zich in het neurale weefsel de degeneratieve en proliferatieve processen afspelen, het sluitingsmechanisme verstoord. Dit mechanisme — het naar mediaal toe bewegen en vergroeiën van de randen der neurale wallen — blijft echter ook bij de exencephale embryonen potentieel wel aanwezig. Immers, de als geheel naar lateraal omgebogen laminae alares tonen aanvankelijk aan hun randen een naar mediaal gerichte tegenkromming. Deze tegenkromming gaat echter bij de verdere ontwikkeling (zie de experimentele series V en VI) verloren. Dit moet worden toegeschreven aan de hier zeer sterke, diffuse proliferatieprocessen, die er tevens toe leiden, dat het openliggende neurale weefsel overmatig uitgroeit. De aangedane hersendelen worden a.h.w. binnenste-buiten gekeerd, geëverteerd.

De embryonen, gebruikt bij dit onderzoek, toonden nog niet die ernstige afwijkingen van het aan de oppervlakte gelegen neurale weefsel, die door GIROUD, DELMAS en MARTINET (1959) werden gevonden bij oudere embryonen. Aan deze onderzoekers bleek namelijk, dat de exencephalie door lytische veranderingen in de geëverteerde neurale plaat verandert in anencephalie. Om dit verschijnsel te kunnen waarnemen waren de bestudeerde embryonen evenwel te jong.

De kenmerken, hier gevonden bij embryonen van de muis, komen geheel overeen met die bij de door PATTEN (1952; 1953) beschreven exencephale embryonen van de mens en van het varken. Omtrent de genese van de exencephalie, meent deze auteur dat zij wellicht door „overgrowth” (d.i. proliferatieve veranderingen) tot stand kan komen. Dit is dus met de eigen opvatting in overeenstemming. De reeds eerder genoemde onderzoekers JELINEK en KLIKA (1961) menen evenwel, dat de exencephalie niet het gevolg is van een proliferatieproces, maar dat omgekeerd de proliferatieve veranderingen in het neurale weefsel pas optreden, als er een exencephalie bestaat. Hoewel het niet uitgesloten is,

dat dit laatste ook wel kan voorkomen, is het toch onwaarschijnlijk, gezien de eigen waarnemingen, dat dit (secundaire) proces hier van belang is geweest.

Ten slotte dient nog nader ingegaan te worden op de vraag, of wellicht het mesenchym bij de ontwikkeling tot exencephalie een rol speelt. Onder de geëverteerde neurale plaat ligt steeds — zoals beschreven — zeer losmazig mesenchym, waarin vele grote bloedvaten lopen. Uit een vergelijkend onderzoek bij exencephale embryonen en controle-embryonen blijkt echter van een verschil in de hoeveelheid mesenchym niets of hoegenaamd niets. Het maakt geheel de indruk, dat het mesenchym zich bij exencephale ontwikkeling van de hersenen passief gedraagt en door het samenvallen van de neurale groeve wordt uitgerekt. Het is niet onmogelijk, dat deze secundaire veranderingen in het mesenchym uiteindelijk resulteren in een verminderde bloedtoevoer naar het neurale weefsel, waardoor ten slotte secundaire lytische veranderingen daarin ontstaan. Hiervan blijkt echter bij de bestudeerde embryonen (nog) niets.

Resumerend kan dus worden vastgesteld, dat bij de exencephale ontwikkeling proliferatieve processen, optredend in de laminae alares vóór de sluiting van de neurale buis, de hoofdrol spelen. Desintegratie is hier van zeer ondergeschikte betekenis.

Hydrocephalie

Bij vele experimenten, waarbij zwangere ratten en muizen worden bestraald, wordt als misvorming van de hersenen hydrocephalie beschreven. Deze hersenmisvorming kon in dit onderzoek pas in de tweede experimentele serie (9½ dag na de conceptie) worden vastgesteld, omdat eerst dan de neurale buis gesloten is. De hydrocephalie kan in één of in alle hersendelen tegelijk voorkomen.

Bij hydrocephalie bestaat een te grote omvang van de hersenen. Evenals bij de exencephale embryonen het geval was, wordt ook hier in de laminae alares een diffuus proliferatief proces gevonden, dat vooral in het gebied van de sluitingsranden zeer sterk is. Als gevolg van dit proces gaat de wand, mede doordat deze dun blijft, een te grote ventrikel omspannen. Van belang is, dat bij de twee hydrocephale embryonen van de tweede experimentele reeks de neurale buis caudaal nog niet gesloten was, terwijl geen obstructies van het ventrikel-systeem in de reeds gesloten

delen bestonden. Er was dus een open verbinding met de amnionholte, zodat de opvatting als zou hydrocephalie door enigerlei afsluiting moeten ontstaan, ten aanzien van deze embryonen geen steek houdt. Het is daarom wellicht beter hier niet van hydrocephalie, maar van macrocephalie te spreken.

Mogelijk is deze vorm van hydrocephalie een voorstadium van de communicerende congenitale hydrocephalus, een misvorming die ook een enkele maal bij de mens wordt waargenomen (BIEMOND, 1961).

De conclusies ten aanzien van de hydrocephale ontwikkeling dienen zeer voorzichtig gesteld te worden, omdat juist in de tweede en derde experimentele serie embryonen met een dergelijke hersenmisvorming niet of in een klein aantal voorkomen. Een mogelijke verklaring voor dit laatste is, dat op de 8^e dag van de embryonale ontwikkeling van de muis de „kritieke periode” voor het ontstaan van hydrocephalie gewoonlijk nog niet is bereikt. Doordat het proliferatieve proces bij de meeste embryonen optreedt vóór de sluiting van de neurale buis, valt een hydrocephale ontwikkeling ook niet te verwachten. Dat deze anomalie niettemin bij een klein aantal embryonen werd waargenomen wijst erop, dat ondanks de getroffen voorzorgen ten aanzien van de selectie der proefdieren, de ontwikkeling van een klein aantal embryonen toch iets vóór was. Voor het relatief grote aantal hydrocephale embryonen in alleen de vierde experimentele reeks is niet met stelligheid een verklaring te geven.

Resumerend kan dus worden vastgesteld, dat deze vorm van hydrocephale ontwikkeling optreedt, wanneer een diffuus proliferatief proces in de laminae alares ontstaat ná de sluiting van de neurale buis. Het proces van desintegratie speelt bij de hydrocephale ontwikkeling geen enkele rol.

Overziet men nu al hetgeen hiervóór over de ontwikkeling van de hersenmisvormingen is gezegd, dan kan men dus tot de volgende slotsom komen. De basis voor alle volgende ontwikkelingsanomalieën wordt gelegd door degeneratieve processen enerzijds en pre-proliferatieve en proliferatieve processen anderzijds. Als de degeneratieve processen niet al te sterk zijn en de proliferatieve processen zeer lokaal, dan ontstaat, ten minste in eerste instantie, het beeld van betrekkelijk normale hersenen met een wisselend aantal proliferaties van kleine omvang. Bij ernstige

degeneratieve veranderingen, gevolgd door achterblijven in groei en desintegratie, volgt ontwikkeling in de richting van microcephalie; proliferatieve processen die tegelijkertijd kunnen voorkomen spelen dan geen rol van betekenis. Gaan de degeneratieve veranderingen gepaard met zeer sterke proliferatieve veranderingen, vooral in de laminae alares, dan wordt sluiting van de neurale buis belet en volgt ontwikkeling in de richting van de exencephalie; een ontwikkeling die later tot anencephalie zal leiden. Treden sterke intramurale proliferatieve veranderingen in de wand van de neurale buis op nadat deze al is gesloten, dan volgt ontwikkeling in de richting van hydrocephalie van een type, dat later vermoedelijk wordt gerepresenteerd door de communicerende congenitale hydrocephalus.

Aldus blijken de verschillende bestudeerde afwijkingen alle een gemeenschappelijke basis te hebben en is de verschijningsvorm der uiteindelijke afwijkingen afhankelijk van het moment waarop, de plaats waar en de mate waarin de degeneratieve veranderingen en de proliferatieve veranderingen, en eventueel ook de desintegratie optreden.

Met het voorgaande is dus de eerste vraag, in hoofdstuk I ten aanzien van de vroege genese van de hersenafwijkingen gesteld, beantwoord. De tweede vraag, die naar het percentage waarin deze misvormingen reproduceerbaar zijn, is als volgt te beantwoorden. Bij bestraling van de embryonen op de 8^e ontwikkelingsdag, is steeds een hoog percentage van gevallen van microcephalie of exencephalie te verwachten. Als op de genoemde dag nog bij geen enkel embryo het hersengedeelte van de neurale plaat ver ontwikkeld zou zijn, zou het percentage van deze afwijkingen samen (na bestraling met 400r) vermoedelijk 100 zijn of dit getal dicht naderen. Blijkens het resultaat der onderzoeken is er op de 8^e ontwikkelingsdag meestal al een klein aantal embryonen waarbij de ontwikkeling van de neurale plaat al zover is voortgeschreden, dat sluiting van de hersenblaasjes optreedt, vóórdat ernstige proliferatieve veranderingen ontstaan. Ten aanzien van de vraag, in welke verhouding de afwijkingen zich na verschillend tijdsverloop voordoen, geeft Tabel I uitsluitsel. En zoals hiervoor al werd uiteengezet, is er alle aanleiding te veronderstellen, dat gedurende de eerste anderhalf tot twee dagen een verschuiving optreedt van nog normaal uitzijnde embryonen en embryonen met nog geringe afwijkingen, naar de embryonen met ernstiger afwijkingen. Als deze verschuiving eenmaal tot stand gekomen is, blijft

gedurende de eerstvolgende dagen het aantal embryonen met microcephalie relatief hoog (in feite neemt dit aantal zelfs toe), terwijl het aantal der embryonen met exencephalie en vermoedelijk ook van die met hydrocephalie afneemt, waarschijnlijk door sterfte. Ten slotte moet de vierde vraag, d.i. de vraag of in de histologische beelden iets blijkt van stoornissen in de beïnvloeding van het neurale weefsel door het eronder liggende mesoderm, ontkennend worden beantwoord. Noch de chorda dorsalis, noch het mesenchym toont ook maar enig teken van abnormaliteit, daargelaten natuurlijk de secundaire losmazigheid, die het mesenchym in geval van exencephalie toont. Er is dus, tenminste op histologische gronden, geen reden te besluiten tot het bestaan van stoornissen in inductie. De in beginsel normale, zij het ook meer of minder sterk achterblijvende, voortgaande differentiatie van het neurale weefsel — ook bij zeer ernstige misvormingen — wijst er tevens op, dat het proces der determinatie in de neurale buis ongestoord is.

Wat de *synotie* betreft, mag in de eerste plaats worden opgemerkt, dat hier met deze term een andere afwijking wordt aangeduid dan men soms in de literatuur doet. Daar gebruikt men de term *synotie* wel als synoniem voor *otocephalie*. Zoals in hoofdstuk I werd uiteengezet, verstaat men onder *otocephalie* een samenhang tussen het rechter en het linker uitwendige oor en/of het rechter en het linker middenoor; een samenhang aan de ventrale zijde van het grensgebied tussen hals en hoofd. Wat bij dit onderzoek onder *synotie* wordt verstaan is echter iets geheel anders, namelijk een samenhang tussen de rechter en de linker binnenooraanleg, die dan dorsaal van de neurale buis is gelegen.

Een afwijking van dit type werd tot nu toe nog slechts éénmaal beschreven en dan bij amphibiën, na extirpatie van de neurale plaat en de neurale lijst ter hoogte van het rhombencephalon (HÖRSTADIUS en SELLMAN, 1946). Omdat ook bij het eigen onderzoek *synotie* werd gezien bij zeer ernstige schade aan de neurale buis ter hoogte van de oorblaasjes, is dus röntgenbestraling blijkbaar een ingreep, die op één lijn is te stellen met extirpatie. Hiermee is dus de eerste vraag, die in hoofdstuk I bij de inleiding over de misvormingen van het binnenoor werd gesteld, beantwoord. De tweede vraag, nl. die over de invloed van een dergelijke beschadiging van de neurale buis op de morfogenese van het binnenoor, is als volgt te beantwoorden. In hoofdstuk IV werd uiteengezet, dat de vijf gevallen van *synotie* deel uit maken van, resp. onder te brengen zijn

in een teratomorfe reeks, waarvoor kenmerkend is dat de afstand tussen de aanleg van het rechter en het linker binnenoor in toenemende mate kleiner is. De gevallen van samenhang tussen het rechter en het linker oorblaasje zijn in deze reeks uitersten, waarbij de afstand tussen rechts en links onder een minimumwaarde is komen te liggen. Bovendien werd in dit hoofdstuk aannemelijk gemaakt dat het dichter bij elkaar komen te liggen van, resp. de samenhang tussen de beide oorblaasjes te beschouwen zijn als verschijnselen, die *secundair* zijn aan stoornissen die gelijktijdig in het tussen hen in liggende deel van de neurale buis optreden.

Met betrekking tot de ontwikkelingsphysiologische mechanismen, die hier werkzaam zijn, kan naar aanleiding van de waarnemingen nog het volgende worden overwogen. De abnormaliteiten in de localisatie van de oorblaasjes kunnen — als zij sterk zijn — in beginsel op twee manieren tot samenhang tussen het rechter en het linker binnenoor hebben geleid: (a) door een secundaire versmelting van twee oorspronkelijk afzonderlijk ontstane blaasjes, en (b) doordat de blaasjes in onderlinge samenhang zijn aangelegd en zich aldus hebben ontwikkeld. Ten aanzien van de eerstgenoemde mogelijkheid werd bij de vijf embryonen met *synotie* geen enkel beeld waargenomen, dat hiervoor een argument zou kunnen leveren. Met betrekking tot de tweede mogelijkheid is dit echter anders. Immers, bij twee der embryonen werd in de mediaanlijnt een wezenlijk enkelvoudige saccus endolymphaticus gevonden en bij één ander embryo een gemeenschappelijke ductus endolymphaticus, nog in samenhang met het ectoderm. Deze bevindingen wijzen er duidelijk op, dat de oorblaasjes zich in deze gevallen in samenhang ontwikkelden.

Wanneer men nu deze gegevens beziet in het licht van de verschillende hypothesen, die er over de regeling van de ontwikkeling van de binnenooraanleg bestaan, dan moet men vaststellen dat zij zouden kunnen pleiten voor de door DALCQ (1933), SCHMIDT (1937), YNTEMA (1939), ZWILLING (1941) e.a. veronderstelde inductieve werking van het parachordale mesoderm. Want bij de embryonen, waar het hier om gaat, bevindt zich dit mesoderm niet alleen lateraal van de neurale buis — waar het behoort te zijn —, maar ook dorsaal van deze buis; en dit mesoderm kan dus het ectoderm niet alleen lateraal bereiken, maar ook dorsaal. In dit geval zou men mogen verwachten dat de omvang van de samenhangende oorblaasjes te zamen, aanzienlijk groter is dan de som

van twee normale oorblaasjes. Dit blijkt bij drie van de vier gevallen van synotie inderdaad het geval te zijn. En als deze veronderstelling nu juist is, zou dit betekenen, dat dan de oorblaasjes niet noodzakelijkerwijs dicht bij elkaar behoeven te liggen; maar dit laatste blijkt — zoals vermeld — nu juist altijd wél het geval te zijn. Het heeft er dus alle schijn van, dat in werkelijkheid bij het ontstaan van de synotie een combinatie van factoren een rol speelt. Het zou zo kunnen zijn, dat door de sterke misvorming van de neurale plaat of buis, het parachordale mesoderm niet alleen in mediale richting wordt verplaatst — waardoor de oorplacoden dicht bij elkaar komen te liggen dan normaal —, maar dat bovendien de hoeveelheid van dit mesoderm naar mediaal toeneemt, zodat als resultaat een samenhangende rechter en linker oorplacode ontstaat, die in omvang groter is dan twee normale placoden te samen. Het moment, waarop de toename van het parachordale mesoderm in mediale richting optreedt — in afhankelijkheid van het moment waarop de desintegratie van het neurale weefsel ontstaat —, zou dan dus voor de ontwikkeling van de synotie van essentieel belang zijn. Het is echter niet onmogelijk, dat de zojuist aan het parachordale mesoderm toegedachte invloed op het ontstaan van de oorplacoden in feite door cellen van de neurale lijst wordt uitgeoefend, zoals door TRAMPUSCH (1941) werd beschreven. Een argument voor deze laatste opvatting zou kunnen zijn, dat ook het naar lateraal uitzwermen van de cellen van de neurale lijst — gezien de abnormale ontwikkeling van het ganglion geniculi van de N. facialis bij een aantal embryonen — gestoord kan verlopen.

Een bijkomstige secundaire inductieve werking van het rhombencephalon (later het myelencephalon), zoals verondersteld door LOPASHOF (1937), KOGAN (1939; 1944) en GORBUNOVA (1949), lijkt in eerste instantie minder waarschijnlijk. Immers, een (gemeenschappelijke) ductus endolymphaticus is bij drie van de vier beschreven gevallen van synotie ook aanwezig wanneer van het rhombencephalon, resp. het myelencephalon op het niveau van de oorblaasjes nauwelijks iets meer over is. Niet onmogelijk is echter, dat het betreffende deel van de neurale buis zijn inductieve invloed nog heeft kunnen uitoefenen, voordat het te gronde ging. Ten slotte moet ook nog in overweging worden genomen, dat deze secundaire beïnvloeding eerst dan geheel achterwege behoeft te blijven, wanneer het rhombencephalon ter hoogte van de binnenoor-aanleg geheel ontbreekt. Dit laatste werd bij één embryo waargenomen;

en hier is inderdaad geen ductus endolymphaticus gevormd. Dit zou dus stellig voor een secundaire inductieve invloed van het rhombencephalon kunnen pleiten. Gezien het feit, dat het hier slechts om één embryo gaat, en erop volgende ontwikkelingsstadia in het materiaal ontbreken, is het evenwel onmogelijk om ten aanzien van deze invloed conclusies te trekken.

Resumerend kan dus worden vastgesteld, dat afhankelijk van het moment waarop en de mate waarin degeneratieve veranderingen, resp. desintegratie van het neurale weefsel optreden, de afstand tussen rechter en linker binnenoor-aanleg in toenemende mate kleiner wordt. Komt deze afstand onder een minimumwaarde te liggen, dan is samenhang ervan (synotie) het gevolg. Ten slotte geven de waarnemingen geen aanleiding tot de veronderstelling, dat er bij de muis ten aanzien van de vorming van het binnenoor andere inductie-mechanismen werkzaam zijn dan bij amphibieën en vogels.

SAMENVATTING

Uit literatuurgegevens bleek, dat na röntgenbestraling tijdens de embryonale ontwikkeling verschillende soorten van hersenmisvormingen kunnen ontstaan, t.w. microcephalie, exencephalie — later overgaand in anencephalie —, en hydrocephalie. Bij de bestudering van het voorkomen van deze afwijkingen, die wat hun morfologie betreft sterk uiteenlopen, zijn tot nu toe alle onderzoekers zuiver registrerend te werk gegaan. Morfogenetische verbanden tussen de verschillende genoemde anomalieën werden niet gelegd of zelfs maar gezocht. Ook over de eerste fasen van de abnormale hersenontwikkeling na röntgenbestraling bleken nog maar weinig gegevens beschikbaar.

Op grond van deze bevindingen werd nu in dit experimentele onderzoek getracht antwoord te verkrijgen op de volgende vragen. Bestaat er enig verband tussen de ontstaanswijze van de microcephalie, de exencephalie en de hydrocephalie? Zijn deze hersenmisvormingen door röntgenbestraling te reproduceren, en zo ja, in welk percentage der gevallen? Wijst het waar te nemen histologische beeld op bepaalde stoornissen in de ontwikkelingsfysiologie?

Naast de genoemde hersenmisvormingen werden bovendien misvormingen van het binnenoor bestudeerd, die herhaaldelijk bleken voor te komen. Zulke misvormingen werden tot nu toe in de literatuur nog alleen maar beschreven bij amphibieën, na extirpatie van het rhombencephale deel van de neurale plaat en de neurale lijst. Getracht werd na te gaan, of door röntgenbestraling bij zoogdieren een effect kan worden bereikt, dat op één lijn is te stellen met extirpatie, en of dan de gevonden anomalieën in de binnenoorontwikkeling in samenhang staan met dit effect. Tevens werd getracht de bestaande opvattingen over de ontwikkelingsfysiologie van het binnenoor te toetsen.

Met betrekking tot de materiële en technische voorzieningen van het onderzoek werd vooropgesteld, dat een zo groot mogelijke constantheid van variabele factoren de eerste vereiste was. Zo zijn embryonen gebruikt, die in hun genetische eigenschappen gelijk waren: embryonen van de ($\text{♀ AEA} \times \text{♂ 0}_{20}/\text{A}$) F_1 generatie. Door in de stal de dag te veranderen in nacht en omgekeerd de nacht in dag kon verder worden bereikt, dat de periode waarin de copulatie optreedt sterk wordt bekort: hier bestaat

geen grotere variatiebreedte dan 2 uur. Voegt men hierbij de niet te beïnvloeden variatie in de tijdsduur, die verloopt tussen de copulatie en de bevruchting — gemiddeld 4 uur —, dan blijft dus in totaal de als een minimum te beschouwen variatiebreedte van rond 6 uur bestaan. Deze voorzorgen hebben er toe bijgedragen, dat de variatie in de ontwikkelingsgraad van de embryonen van de verschillende moederdieren aanmerkelijk kleiner was dan gewoonlijk. Door een selectie van de moederdieren op het totale aantal embryonen, op de verdeling der embryonen over de uterusshoorns en op de aanwezigheid van resorpties, kon bovendien een sterke verkleining van de variatie in de ontwikkeling van de embryonen van hetzelfde moederdier worden bereikt. Ook de toegepaste operatiemethode en de wijze van bestraling waren geheel gestandaardiseerd. Om de rol, die de bestraling van het moederdier bij het ontstaan van embryonale misvormingen wellicht zou kunnen spelen, zo klein mogelijk te doen zijn, werd een verbeterde, op WILSON'S (1951) techniek geïnspireerde methode toegepast. Bij de zwangere muizen werden op de 8^e dag van de zwangerschap telkens 3 embryonen in utero, maar zonder de moeder en de overige embryonen te exponeren, met 400r bestraald. Deze behandeling werd in totaal bij 150 muizen toegepast, die verdeeld werden over zes gelijke groepen. De muizen van deze groepen werden resp. 1, 1½, 2, 3, 4 en 5 dagen na de bestraling gedood, waarna de bestraalde en onbestraalde embryonen werden gefixeerd en voor histologisch onderzoek in serie-coupees werden gesneden.

Uit de resultaten (Tabel I) blijkt, dat na bestraling op de 8^e dag van de zwangerschap verschillende hersenmisvormingen ontstaan, die echter met de tijd niet in dezelfde verhouding aanwezig blijven; er treden verschuivingen op. Bij de embryonen, die 24 uur na de bestraling werden onderzocht, werden zowel degeneratie (karyopycnosis en celdood) als progressieve processen in het neurale weefsel gezien. Bij deze progressieve processen werden twee componenten onderscheiden: een preproliferatieve component — gekenmerkt door abnormale ophopingen van afgeronde neuro-ectodermale cellen — en een proliferatieve component — gekenmerkt door een overmatige toename van het aantal mitosen in deze celophopingen. Deze pathologische veranderingen kwamen zowel plaatselijk, als ook diffuus in het neurale weefsel voor. De locale proliferatieve veranderingen, die zich zowel in de wand van de neurale buis als daarbuiten ontwikkelen, bleken slechts geringe consequenties te hebben: na enkele dagen reeds namen de ontstane

celgroepjes door desintegratie sterk in aantal en grootte af. Desintegratie kwam overigens niet alleen in de locale proliferaties voor, maar soms ook in de diffuse, meer uitgebreide vormen. Het bleek nu in aansluiting aan ernstige degeneratieve veranderingen en de *diffuus* optredende proliferatieve veranderingen (eventueel met desintegratie) te zijn, dat de microcephalie, de exencephalie en de hydrocephalie ontstaan. De waarnemingen laten de volgende conclusies toe. Ernstige degeneratie, gevolgd door achterblijven in groei en desintegratie, resulteert in ontwikkeling van microcephalie. Exencephalie ontstaat, wanneer de proliferatieve processen voor de sluiting van de neurale buis zeer sterk uitgesproken zijn. De ontwikkeling van hydrocephalie volgt, wanneer een sterke proliferatie pas ontstaat na de sluiting van de neurale buis. De bestudeerde misvormingen blijken dus alle een gemeenschappelijke basis te hebben in de degeneratie, de proliferatieve processen en eventueel ook de desintegratie. De uiteindelijke verschijningsvorm der afwijkingen is slechts afhankelijk van het moment waarop, de plaats waar en de mate waarin deze processen optreden.

Uit Tabel I blijkt tevens duidelijk, dat na bestraling op de 8^e dag een hoog percentage van de embryonen aan exencephalie en microcephalie gaat lijden; bestraling op een iets later stadium zal leiden tot een hoger percentage van embryonen met hydrocephalie.

De histologische beelden geven geen aanleiding tot de veronderstelling, dat de bestraling op de 8^e dag leidt tot storingen in inductie. De determinatie lijkt in de verschillende hersendelen eveneens ongestoord.

Met betrekking tot het binnenoor wordt in Tabel II een overzicht gegeven van de waargenomen abnormaliteiten in de localisatie, en eventueel ook in de ontwikkeling, van de beide oorblaasjes in relatie tot de misvormingen van het neurale weefsel. Uit het onderzoek blijkt, dat de afstand tussen de rechter en de linker binnennooraanleg des te kleiner was, naarmate de degeneratieve veranderingen, resp. de desintegratie van het neurale weefsel op het niveau hiervan ernstiger waren. Komt deze afstand onder een minimumwaarde te liggen, dan is synotie, dit is een samenhang van de oorblaasjes, dorsaal van de neurale buis, het gevolg. Hieruit blijkt, dat de röntgenbestraling bij het embryo van de muis inderdaad een effect kan sorteren, dat gelijk is te stellen aan dat van extirpatie van de neurale plaat en de neurale lijst.

De inductie-mechanismen, werkzaam bij de ontwikkeling van het binnenoor, lijken bij de muis dezelfde te zijn als bij amphibieën en vogels.

Ten slotte zij opgemerkt, dat verder onderzoek zal moeten leren, op welke wijze precies de röntgenbestraling direct en/of indirect ingrijpt op de biochemische of biophysische processen in de neuro-ectodermale cellen. Pas dan zal men inzicht kunnen krijgen in het wezen van de veranderingen, die de morphogenese van het neurale weefsel door de röntgenbestraling ondergaat.

SUMMARY

In medical literature it has been reported, that following x-irradiation during embryonic development, a variety of malformations of the central nervous system may arise, i.e. microcephaly, exencephaly — which later develops into anencephaly —, and hydrocephaly. In studying the occurrence of these malformations which are morphologically highly different, all investigators have up to now only limited their scope to registration. Morphogenetic relations between the various anomalies mentioned have not been made yet or even sought. Also about the earliest stages of the abnormal development of the neural tube after x-irradiation, only a few data appeared to be available.

Since these data are highly fragmentary, it was tried in this experimental study to get an answer to the following questions. Are there any relationships in the mode of origin of microcephaly, exencephaly and hydrocephaly? Can these malformations be reproduced by x-irradiation, and if so, in what percentage of the cases? Do the histological pictures observed indicate certain disturbances in the developmental physiology?

In addition to the malformations of the central nervous system, malformations of the inner ear, which were repeatedly present, were studied. Such malformations have up to now only been described in amphibians after extirpation of the rhombencephalic part of the neural plate and the neural crest. It was tried to decide whether in mammals x-irradiation may produce an effect similar to that of extirpation, and whether the anomalies of the development of the inner ear are dependent on this effect. At the same time the current views regarding the developmental mechanics of the inner ear were tested.

As regards the material and methods used in this investigation, it was premised that the variability of any type should be reduced as much as possible. The embryos used, ($\text{♀} \text{AEA} \times \text{♂} \text{O}_{20}/\text{A}$) F_1 generation, were identical with regard to their genetic properties. In the animal room, day was changed into night and night into day; as a result of this procedure, the period in which copulation occurs was greatly shortened: in this respect the degree of variability did not exceed a period of 2 hours. Adding to this the natural variation in the time interval between the copulation and the fertilization — averaging 4 hours —, a total degree

of variation of about 6 hours remains. In this way, embryos from different animals, were obtained, which showed less variation in their degree of development than usually. By excluding from the experiment all pregnant mice with more than 10 implantations, those with an unequal distribution of the embryos over the cornua and those in which resorption had occurred, the variation in development of the embryos of the same mouse was considerably reduced. The operative procedure applied, as well as the mode of irradiation were entirely standardized. In order to decrease the influence of the irradiation on the mother — which might play a part in the origin of embryonic malformations — an improved method, based on WILSON'S (1951) technique, was used. On the 8th day of pregnancy in each case 3 embryos in utero were irradiated with 400r; the mother and the other embryos were shielded. This treatment was applied to 150 mice in all and they were subdivided into 6 equal groups. The mice of these groups were sacrificed 1, 1½, 2, 3, 4 and 5 days after irradiation; the irradiated embryos as well as the protected embryos (controls) were fixed and serially sectioned at 10 μ for histological examination.

The results (Table I, p. 41) show that following irradiation on the 8th day of pregnancy various malformations of the brain develop, the ratio of which, however, changes with time. In the embryos which had been fixed 24 hours after irradiation, both degeneration (karyopycnosis and cellular necrosis) and progressive changes were observed in the neural tissue. Regarding the progressive changes two components were distinguished: a pre-proliferative component — characterized by anomalous clusters of rounded neuro-ectodermal cells — and a proliferative component — characterized by an excessive increase of mitoses in these clusters. These pathological changes in the neural tissue were observed locally as well as diffusely. The *local* proliferative changes which developed within the wall of the neural tube as well as outside this wall, had only slight consequences: after a few days already the number and size of these clusters of cells diminished as a result of disintegration. Disintegration was not only seen in the local proliferations, but sometimes also in the diffuse, more extensive ones. It became apparent that following serious degenerative changes and *diffuse* proliferative changes (possibly with disintegration), the microcephaly, the exencephaly and the hydrocephaly develop. The observations justify the following conclusions. Serious degeneration, followed by a delay in development and disinte-

gration, results in the development of microcephaly. Exencephaly develops, when the proliferative processes are very extensive before the closure of the neural tube. The development of hydrocephaly occurs, when an extensive proliferation develops after the closure of the neural tube. So it is evident that the anomalies studied are all due to the same basic pathological processes, i.e. degeneration, proliferation and sometimes also disintegration. The ultimate appearance of the malformations only depends on the moment when, the place where and the degree in which these processes occur.

At the same time (Table I), it becomes quite apparent that after irradiation on the 8th day a high percentage of the embryos will be affected by exencephaly and microcephaly; irradiation at a later stage will lead to a higher percentage of embryos with hydrocephaly.

The histological pictures do not support the supposition that irradiation on the 8th day leads to derangements in induction. The determination of the various parts of the nervous system seems to be undisturbed as well.

In regard to the inner ear, Table II (p. 49) gives a survey of the observed abnormalities in the localisation and in the development of the two ear vesicles, in relation to the malformations of the neural tissue. From this table it is clear that the distance between the primordia of the right and the left inner ear was smaller, according as the degenerative changes, respectively the disintegration of the neural tissue on this level were more serious. If this distance assumes a minimum value or less, the result will be synotia, that is a direct connection between the two ear vesicles dorsal to the neural tube. From this fact it is apparent that the x-irradiation in the embryo of the mouse may indeed bring about an effect which is comparable to that resulting from extirpation of the neural plate and the neural crest.

The induction processes, active in the development of the inner ear, seem to be the same in mice as in amphibians and birds.

Finally it may be remarked that further investigations will have to show the exact way in which the x-irradiation affects directly and/or indirectly the biochemical or biophysical processes in the neuro-ectodermal cells. Only then the nature of the variations which the morphogenesis of the neural tissue undergoes after x-irradiation, can be better understood.

LITERATUUR

- ALTMAN, F., The ear in severe malformations of the head. *Arch. Otolaryng.* **66** (1957) 7-25.
- ARCHANGELSKY, B. A., Zur Frage von der Wirkung der Röntgenstrahlen auf das Frühstadium der Gravidität. *Arch. f. Gynäk.* **118** (1923) 1-17.
- ARIËNS KAPPERS, J., Hersenafwijkingen bij een embryo van ruim 6 weken met embryopathia rubeolosa. *Ned. Tijdschr. v. Geneeskunde* **99** (1955) 1297-1304.
- ARIËNS KAPPERS, J., Developmental disturbance of the brain induced by german measles in an embryo of the 7th week. *Acta Anat.* **31** (1957) 1-20.
- BARDEEN, CH. R., Further studies on the variation in susceptibility of amphibian ova to the x-rays at different stages of development. *Amer. J. Anat.* **11** (1911) 419-498.
- BENNETT, D., BADENHAUSEN, S. en DUNN, L. C., The embryological effects of four late-lethal *r*-alleles in the mouse, which affect the neural tube and skeleton. *J. Morph.* **105** (1959) 105-144.
- BERGQUIST, H., Experiments on the "overgrowth" phenomenon in the brain of chick embryos. *J. Embr. Exp. Morph.* **7** (1959) 122-127.
- BIEMOND, A., Hydrocephalus congenitus. In *Hersenziekten*, blz. 570-574. De Erven F. Bohn N.V., Haarlem, 1961.
- BRACHET, J. en DELANGE-CORNIL, M., Recherches sur le rôle des groupes sulfhydryles dans la morphogénèse. *Devel. Biol.* **1** (1959) 79-100.
- BRENT, R. L., The indirect effect of irradiation on embryonic development. I. Irradiation of the mother while shielding the embryonic site. *Amer. J. Dis. Child.* **100** (1960) 94-102.
- BRENT, R. L. en McLAUGHLIN, M. M., The indirect effect of irradiation of the mother while shielding the embryonic site. II. Irradiation of the placenta. *Amer. J. Dis. Child.* **100** (1960) 103-108.
- CHIQUEINE, A. D., Distribution of alkaline phosphomonoesterase in the central nervous system of the mouse embryo. *J. Comp. Neur.* **100** (1954) 415-439.
- CORDIER, A. D. en DALCO, A., Organe stato-acoustique. In *Traité de Zoologie. Tome XII.*, blz. 453-521. Masson en Cie, Paris, 1954.
- CORLISS, C. E. en ROBERTSON, G. G., The pattern of mitotic density in the early chick neural epithelium. *J. Exp. Zool.* **153** (1963) 125-140.
- DALCO, A., La détermination de l'oreille interne chez les vertébrés. *Bull. Ac. Roy. Belg.* **13** (1933) 544-558.
- EMERY, F. E. en SCHWABE, E. L., The vaginal smears of rats as influenced by frequent examinations. *Anat. Rec.* **64** (1936) 147-154.
- GIROUD, A., DELMAS, A. en MARTINET, M., Etude morphogénétique sur des embryons anencéphales. *Arch. Anat. (Strasbourg)*. **42** (1959) 201-230.

- GORBUNOVA, G. P., Concerning inductive capacity of medulla oblongata in embryos of amphibians. C. R. Acad. Sci. URSS. **23** (1939) 298-301.
- HARRISON, R. G., Woundhealing and reconstitution of central nervous system of the amphibian embryo after removal of parts of the neural plate. J. Exp. Zool. **106** (1947) 27-84.
- HEMMINGSEN, A. M. en KARUP, N. B., *Rhythmic diurnal variation in the oestrus phenomena of the rat and their susceptibility to light and dark*. Levin and Munksgaard, København, 1937.
- HENNEBERG, B., *Normentafeln zur Entwicklungsgeschichte der Wirbeltiere*. Verlag von Gustav Fischer, Jena, 1937.
- HERTWIG, P., Die Genese der Hirn- und Gehörorganmissbildungen bei röntgen mutierten Kreisler-Mäusen. Ztschr. menschl. Vererb. u. Konstitutionslehre. **28** (1944) 327-354.
- HICKS, S. P., Mechanism of radiation anencephaly, anophthalmia and pituitary anomalies. Arch. Pathol. **57** (1954a) 363-378.
- HICKS, S. P., The effects of ionizing radiation, certain hormones and radiometric drugs on the developing nervous system. J. Cell. and Comp. Physiol. **43** (1954b) 151-178.
- HICKS, S. P., O'BRIEN, R. C. en NEWCOMB, E. C., Developmental malformations produced by radiation. Amer. J. Roentgenol. **69** (1953) 272-293.
- HÖRSTADIUS, S. en SELLMAN, S., Experimentelle Untersuchungen über die Determination des knorpeligen Kopfskelettes bei Urodelen. Nova Acta Regiae Soc. Sci. Upsaliensis. **13** (1946) 5-170.
- HUBER, G. C., The development of the albinoratus, *mus norvegicus albinus*. J. Morph. **26** (1915) 247-359.
- Jaaroverzicht Bevolking en Volksgezondheid 1962*. Mededelingen van het Centraal Bureau voor de Statistiek te 's Gravenhage.
- JELINEK, R. en KLIKA, E., Cellular proliferation in the experimentally produced "overgrowth" of the neural tube. Čs. Morfol. **9** (1961) 406-414.
- JOB, T. T., LEIBOLD, A. J. en FITZMAURICE, H. A., Biological effects of roentgen rays. Amer. J. Anat. **56** (1935) 97-141.
- JURAND, A., Further investigations on the cytotoxic and morphogenetic effects of some nitrogen mustard derivatives. J. Embryol. Exp. Morph. **9** (1961) 492-506.
- KÄLLÉN, B., Regeneration in the hindbrain of neural tube stages of chick embryos. Anat. Rec. **123** (1955) 169-182.
- KAVEN, A., Röntgenmodifikationen bei Mäusen. Ztschr. menschl. Vererb. u. Konstitutionslehre. **22** (1939a) 238-246.
- KAVEN, A., Das Auftreten von Gehirnmissbildungen nach Röntgenbestrahlung von Mäuseembryonen. Ztschr. menschl. Vererb. u. Konstitutionslehre. **22** (1939b) 247-257.
- KLIKA, E. en JELINEK, R., Histogenesis of the experimental exencephalia in the chick. Čs. Morfol. **9** (1961) 162-172.
- KNOPP, J. en TRAUTMAN, J., Die Wirkungen von 200r Röntgenganzbestrahlungen auf die Placenta der weissen Maus. Strahlentherapie. **110** (1959) 70-82.

- KOGAN, R. E., Inductive action of medulla oblongata on the body epithelium of amphibia. C. R. Acad. Sci. URSS. **23** (1939) 307-310.
- KOGAN, R. E., The chorda mesoderm as an inductor of the ear vesicle. C. R. Acad. Sci. URSS. **45** (1944) 39-41.
- KRIEGL, H., LANGENDORFF, H. en SHIBATA, K., Die Beeinflussung der Embryonalentwicklung bei der Maus nach einer Röntgenbestrahlung. Strahlentherapie. **119** (1962) 349-370.
- LAWRENCE, M. en MERCHANT, D. J., Tissue culture techniques for the study of the isolated otic vesicle. Ann. Otol., etc. **62** (1953) 770-785.
- LIMBORGH, J. v., A 9 mm human embryo with several closure defects of the neural tube. Acta Morph. Neerl.-Scand. **1** (1956) 51-62.
- LOPASHOF, G. V., Über die Organbildung bei nervenlosen Organismen. C. R. Acad. Sci. URSS. **15** (1937) 283.
- MURAKAMI, U. en KAMEYAMA, Y., Effects of low-dose x-radiation on the mouse embryo. Amer. J. Dis. Child. **96** (1958) 272-277.
- MURAKAMI, U., KAMEYAMA, Y. en MAJIMA, A., A dynamic observation on the formation of developmental abnormalities of the fetus caused by x-radiation. Ann. Rep. Environ. Med. Nagoya Univ. **8** (1960) 101-115.
- MURAKAMI, U., KAMEYAMA, Y., MAJIMA, A. en SAKURAI, T., Patterns of radiation malformations of the mouse fetus and subjected stage of development. Ann. Rep. Environ. Med. Nagoya Univ. **9** (1961) 71-81.
- PATTEN, B. M., Overgrowth of the neural tube in young human embryos. Anat. Rec. **113** (1952) 381-393.
- PATTEN, B. M., Embryological stages in the establishing of myeloschisis with spina bifida. Amer. J. Anat. **93** (1953) 365-395.
- PETER, K., *Die Methoden der Rekonstruktion*. Verlag von Gustav Fischer, Jena, 1906.
- POBISCH, R., Die Einwirkung der Röntgenstrahlen auf den Kaninchenembryo mit besonderer Berücksichtigung der postnatalen Entwicklung. Radiologia Austriaca. **11** (1960) 1-82.
- RUGH, R., Responses of the developing fetal nervous system to roentgen irradiation. Radiology. **71** (1958) 729-731.
- RUGH, R. en GRUPP, E., Exencephalia following x-irradiation of the pre-implantation mammalian embryo. J. Neuropath. Exp. Neurol. **18** (1959a) 468-481.
- RUGH, R. en GRUPP, E., X-irradiation exencephaly. Amer. J. Roentgenol. **81** (1959b) 1026-1052.
- RUSSELL, L. B., X-ray induced developmental abnormalities in the mouse and their use in the analysis of embryological patterns. I. External and gross visceral changes. J. Exp. Zool. **114** (1950) 545-601.
- RUSSELL, L. B., X-ray induced developmental abnormalities in the mouse and their use in the analysis of embryological patterns. II. Abnormalities of the vertebral column and thorax. J. Exp. Zool. **131** (1956) 329-395.
- RUSSELL, L. B. en RUSSELL, W. L., Changes in the relative proportions of different axial skeletal types within inbred strains of mice brought about by x-irradiation at critical stages in embryonic development. Genetics. **35** (1950a) 689.

- RUSSELL, L. B. en RUSSELL, W. L., The effects of radiation on the pre-implantation stages of the mouse embryo. *Anat. Rec.* **108** (1950b) 521-522.
- RUSSELL, L. B. en RUSSELL, W. L., Radiation hazards to the embryo and fetus. *Radiology* **58** (1952) 369-377.
- RUSSELL, L. B. en RUSSELL, W. L., An analysis of the changing radiation response of the developing mouse embryo. *J. Cell. and Comp. Physiol.* **43** (1954) 103-149.
- SAUER, F. C., The cellular structure of the neural tube. *J. Comp. Neurol.* **63** (1935) 13-23.
- SAUER, M. E. en CHITTENDEN, A. C., Deoxyribonucleic acid content of cell nuclei in the neural tube of the chick embryo. *Exp. Cell. Res.* **16** (1959) 1-6.
- SAUER, M. E. en WALKER, B. E., Radioautographic study of interkinetic nuclear migration in the neural tube. *Proc. Soc. Exp. Biol. en Med.* **101** (1959) 557-560.
- SCHMIDT, G. A., Korrelationen bei der Entwicklung der Hörblase. *Zool. Anz.* **120** (1937) 143.
- SIDMAN, R. L., MIALE, I. en FEDER, N., Cell proliferation and migration in the primitive ependymal zone. An autoradiographic study of histogenesis in the nervous system. *Exp. Neurol.* **1** (1959) 322-333.
- SNELL, G. D., The early embryology of the mouse. In *Biology of the laboratory mouse*. The Blakiston Company, Philadelphia, 1961.
- SNELL, G. D., FEKETE, E., HUMMEL, K. P. en LAW, L. W., Reproductive responses of mice. *Anat. Rec.* **76** (1940) 39-54.
- Standardized nomenclature for inbred strains of mice*. Prepared by the committee on standardized nomenclature for inbred strains of mice. *Cancer Research* **12** (1952) 602-613.
- STOCKARD, CH. R., Developmental rate and structural expression: An experimental study of twins, "double monsters" and single deformities, and the interaction among embryonic organs during their origin and development. *Amer. J. Anat.* **28** (1921) 115-278.
- TRAMPUSCH, H. A. L., On ear-induction. *Acta Neerl. Morph.* **4** (1941) 195-213.
- WADDINGTON, C. H., The determination of the auditory placode in the chick. *J. Exp. Biol.* **14** (1937) 232-239.
- WARKANY, J. en SCHRAFFENBERGER, E., Congenital malformations induced by roentgen rays. *Amer. J. Roentgenol.* **57** (1947) 455-463.
- WATTERSON, R. L., VENEZIANO, P. en BARTHA, A., Absence of a true germinal zone in neural tubes of young chick embryos as demonstrated by the colchicine technique. *Anat. Rec.* **124** (1956) 379.
- WILSON, J. G., Differentiation and the reaction of rat embryos to radiation. *J. Cell. and Comp. Physiol.* **43** (1954) 11-37.
- WILSON, J. G. en KARR, J. W., Difference in the effects of x-irradiation in rat embryos of different ages. *Anat. Rec.* **106** (1950) 259-260.
- WILSON, J. G. en KARR, J. W., Effects of irradiation on embryonic development. I. X-rays on the tenth day of gestation in the rat. *Amer. J. Anat.* **88** (1951) 1-34.
- WILSON, J. G., BRENT, R. L. en JORDAN, H. CH., Neoplasia induced in rat embryos by roentgen irradiation. *Cancer Research* **12** (1952) 222-228.

- WILSON, J. G., BRENT, R. L. en JORDAN, H. CH., Differentiation as a determinant of the reaction of rat embryos to x-irradiation. *Proc. Soc. Exp. Biol. en Med.* **82** (1953a) 67-70.
- WILSON, J. G., JORDAN, H. CH. en BRENT, R. L., Effects of irradiation on embryonic development. II. X-rays on the ninth day of gestation in the rat. *Amer. J. Anat.* **92** (1953b) 153-177.
- YNTEMA, C. L., Self-differentiation of heterotopic ear ectoderm in the embryo of *amblystoma punctatum*. *J. Exp. Zool.* **80** (1939) 1-17.
- ZWILLING, E., The determination of the otic vesicle in *rana pipiens*. *J. Exp. Zool.* **86** (1941) 333-342.

- RUSSELL, L. B. en RUSSELL, W. L., The effects of radiation on the pre-implantation stages of the mouse embryo. *Anat. Rec.* **108** (1950b) 521-522.
- RUSSELL, L. B. en RUSSELL, W. L., Radiation hazards to the embryo and fetus. *Radio-logy* **58** (1952) 369-377.
- RUSSELL, L. B. en RUSSELL, W. L., An analysis of the changing radiation response of the developing mouse embryo. *J. Cell. and Comp. Physiol.* **43** (1954) 103-149.
- SAUER, F. C., The cellular structure of the neural tube. *J. Comp. Neurol.* **63** (1935) 13-23.
- SAUER, M. E. en CHITTENDEN, A. C., Deoxyribonucleic acid content of cell nuclei in the neural tube of the chick embryo. *Exp. Cell. Res.* **16** (1959) 1-6.
- SAUER, M. E. en WALKER, B. E., Radioautographic study of interkinetic nuclear migration in the neural tube. *Proc. Soc. Exp. Biol. en Med.* **101** (1959) 557-560.
- SCHMIDT, G. A., Korrelationen bei der Entwicklung der Hörblase. *Zool. Anz.* **120** (1937) 143.
- SIDMAN, R. L., MIALE, I. en FEDER, N., Cell proliferation and migration in the primitive ependymal zone. An autoradiographic study of histogenesis in the nervous system. *Exp. Neurol.* **1** (1959) 322-333.
- SNELL, G. D., The early embryology of the mouse. In *Biology of the laboratory mouse*. The Blakiston Company, Philadelphia, 1961.
- SNELL, G. D., FEKETE, E., HUMMEL, K. P. en LAW, L. W., Reproductive responses of mice. *Anat. Rec.* **76** (1940) 39-54.
- Standardized nomenclature for inbred strains of mice*. Prepared by the committee on standardized nomenclature for inbred strains of mice. *Cancer Research* **12** (1952) 602-613.
- STOCKARD, CH. R., Developmental rate and structural expression: An experimental study of twins, "double monsters" and single deformities, and the interaction among embryonic organs during their origin and development. *Amer. J. Anat.* **28** (1921) 115-278.
- TRAMPUSCH, H. A. L., On ear-induction. *Acta Neerl. Morph.* **4** (1941) 195-213.
- WADDINGTON, C. H., The determination of the auditory placode in the chick. *J. Exp. Biol.* **14** (1937) 232-239.
- WARKANY, J. en SCHRAFFENBERGER, E., Congenital malformations induced by roentgen rays. *Amer. J. Roentgenol.* **57** (1947) 455-463.
- WATTERSON, R. L., VENEZIANO, P. en BARTHA, A., Absence of a true germinal zone in neural tubes of young chick embryos as demonstrated by the colchicine technique. *Anat. Rec.* **124** (1956) 379.
- WILSON, J. G., Differentiation and the reaction of rat embryos to radiation. *J. Cell. and Comp. Physiol.* **43** (1954) 11-37.
- WILSON, J. G. en KARR, J. W., Difference in the effects of x-irradiation in rat embryos of different ages. *Anat. Rec.* **106** (1950) 259-260.
- WILSON, J. G. en KARR, J. W., Effects of irradiation on embryonic development. I. X-rays on the tenth day of gestation in the rat. *Amer. J. Anat.* **88** (1951) 1-34.
- WILSON, J. G., BRENT, R. L. en JORDAN, H. CH., Neoplasia induced in rat embryos by roentgen irradiation. *Cancer Research.* **12** (1952) 222-228.

- WILSON, L. G., BRENT, R. L. en JORDAN, H. CH., Differentiation as a determinant of the reaction of rat embryos to x-irradiation. *Proc. Soc. Exp. Biol. en Med.* **82** (1953a) 67-70.
- WILSON, J. G., JORDAN, H. CH. en BRENT, R. L., Effects of irradiation on embryonic development. II. X-rays on the ninth day of gestation in the rat. *Amer. J. Anat.* **92** (1953b) 153-177.
- YNTEMA, C. L., Self-differentiation of heterotopic ear ectoderm in the embryo of *amblystoma punctatum*. *J. Exp. Zool.* **80** (1939) 1-17.
- ZWILLING, E., The determination of the otic vesicle in *rana pipiens*. *J. Exp. Zool.* **86** (1941) 333-342.

HERSENMISVORMINGEN

PLAAT I

Fig. 1. Transversale doorsnede door het toekomstige rhombencephale gebied van een normaal embryo op de 8^e ontwikkelingsdag. De drie kiembladen zijn gevormd. Het licht V-vormige, meer cellagen dikke neuro-ectoderm (de neurale plaat) gaat lateraal over in het ectoderm, dat uit slechts één cellaag is opgebouwd. Dorsaal van de neurale plaat ligt de amnionholte, die van boven wordt begrensd door het amnion. In de mediaanlijn ligt de chorda dorsalis, die nog hecht verbonden is met zowel het neuro-ectoderm als het entoderm. Vergroting 160 $\times$.

EERSTE EXPERIMENTELE SERIE

Fig. 2. Doorsneden door het hersengebied van een onbestraald controle-embryo van 9 dagen (HC II₃).

a. Een doorsnede door het bovenste deel van het prosencephalon (op de foto onder) en door het mesencephalon (op de foto boven). In deze gebieden is de neurale buis nog open. De laterale uitbochtungen vormen de aanleg van de hemisfeerblaasjes. De mitotische activiteit in de germinatieve zone is ter hoogte van deze uitbochtungen groot. Vergroting 60 $\times$.

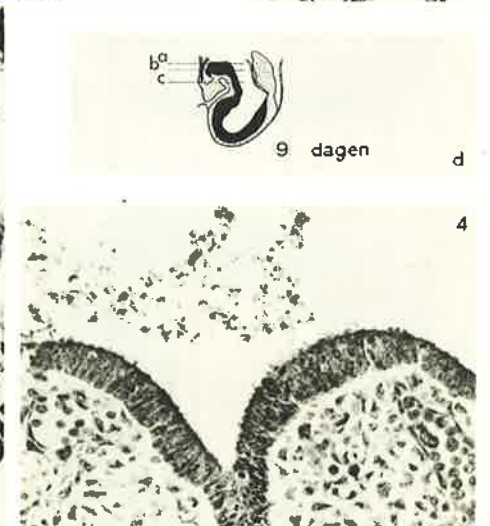
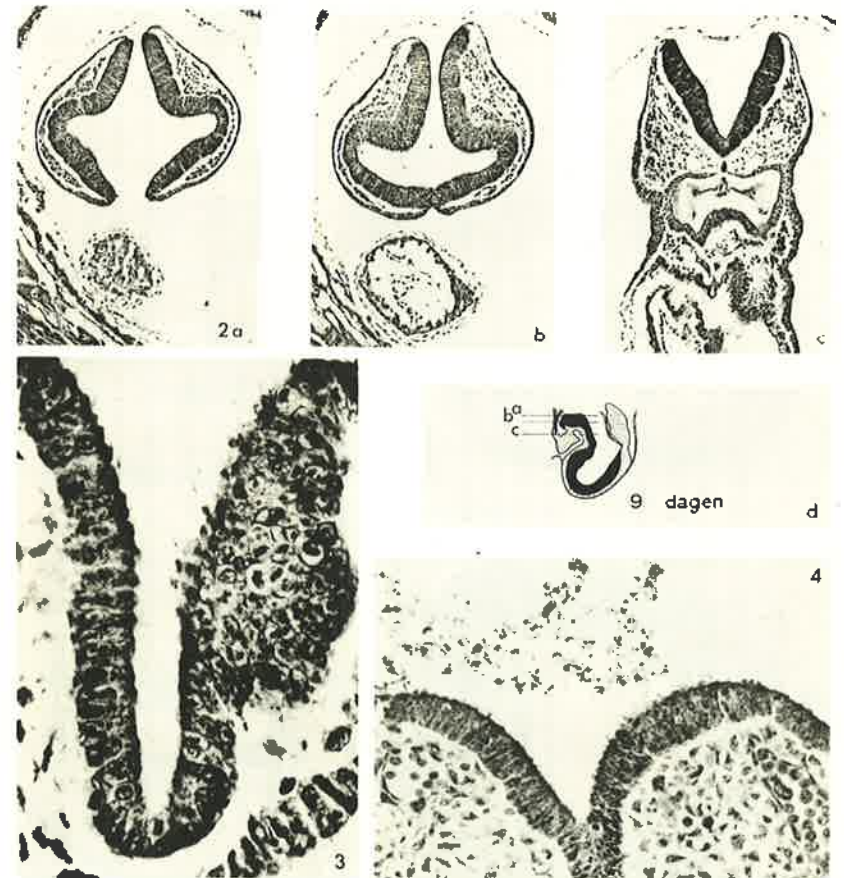
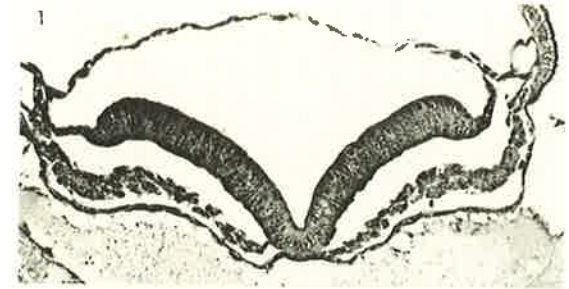
b. Een meer basale doorsnede dan de vorige. Hier is de voorwand van het prosencephalon gesloten (lamina terminalis); de laterale uitstulpingen op dit niveau zijn de beide oogblaasjes. Ook in de germinatieve zone van deze uitstulpingen is de mitotische activiteit groot. Vergroting 60 $\times$.

c. Een doorsnede ter hoogte van het metencephalon; in dit gebied is, evenals meer naar caudaal, de neurale buis open. De chorda ligt hier los van het neurale ectoderm maar is nog wel verbonden met het entoderm van de voordarm. Vergroting 60 $\times$.

d. Een schematische mediane doorsnede door een embryo van 9 dagen. Het embryo is in dit ontwikkelingsstadium sterk gekromd; in de tekening ligt het kopt gebied links-boven en het staartgebied rechts-boven. In het gebied van de kop is het niveau van de coupes *a*, *b* en *c* aangegeven.

Fig. 3. Transversale doorsnede door een deel van de aanleg van het rhombencephalon van een 9 dagen oud, bestraald embryo (HR XIV_b). Het neuro-ectoderm is als geheel in ontwikkeling achtergebleven; het is hier een dunnere laag dan bij overeenkomstige controle-embryonen. De mitotische activiteit in de germinatieve zone is over het geheel genomen gering. Hier en daar ziet men in deze zone pycnotische kernen. Rechts is de wand echter plaatselijk verdikt. Centraal in deze verdikking liggen groepjes van ronde, enigszins blazige neuro-ectodermale cellen en ook een groepje van cellen, die zich delen. Dit is het typische beeld van een gemengd pre-proliferatief en proliferatief intramuraal proces. Vergroting 375 $\times$.

Fig. 4. Transversale doorsnede door de aanleg van het rhombencephalon van een eveneens bestraald en 9 dagen oud embryo (HR XVIII_b). Ook hier is het neuro-ectoderm dunner dan bij normale controle-embryonen. Duidelijk is te zien, dat de mitotische activiteit in de germinatieve zone van zowel de laminae alares als de laminae basales gering is. Door afstoting van necrotische cellen heeft het oppervlak van de neurale plaat lokaal een rafelig aspect; in de amnionholte ziet men necrotische celresten. Het mesenchym is volkomen normaal. Vergroting 190 $\times$.



TWEDE EXPERIMENTELE SERIE

Fig. 1. Doorsneden door het hersengebied van een onbestraald embryo van $9\frac{1}{2}$ dag (EC XV₅).

a. Een doorsnede door het diencephalon (op de foto onder) en het mesencephalon (op de foto boven). Het lumen van deze hersenblaasjes is wijd; de mitotische activiteit in de germinatieve zone is groot. Vergroting $50\times$.

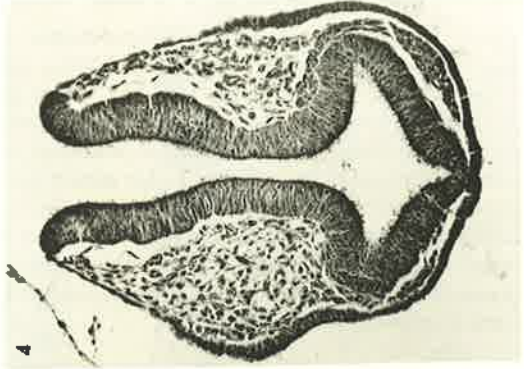
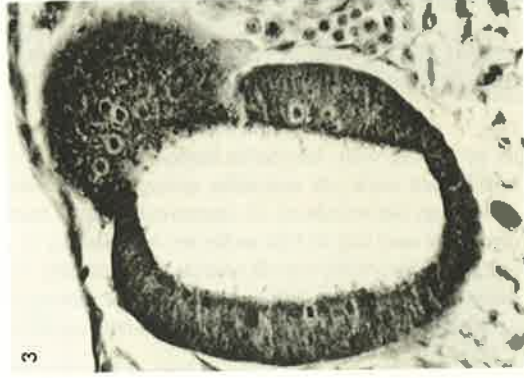
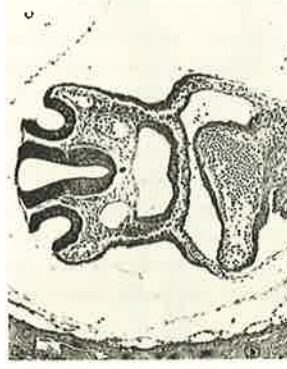
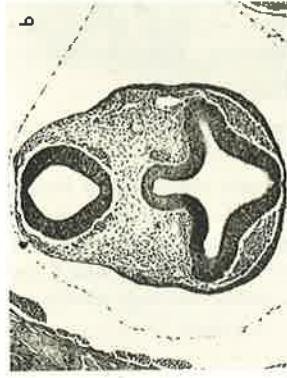
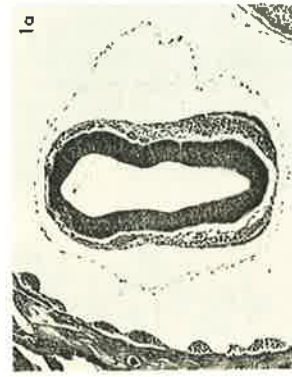
b. Een doorsnede door het basale deel van het diencephalon en de daarvan uitgaande oogblaasjes, die nog door een dun laagje mesenchym van het ectoderm zijn gescheiden, en door het metencephalon. Het mesenchym, waarin vele vaten lopen, is zeer losmazig. Vergroting $50\times$.

c. Een doorsnede door het rhombencephalon ter hoogte van de zich ontwikkelende oorblaasjes. Het dak van het rhombencephalon is dun en innig verbonden met het er overheen liggende ectoderm. De laminae alares wijken iets naar lateraal uit, waardoor de karakteristieke driehoekige vorm van de IV^e ventrikel ontstaat. De mitotische activiteit is in de germinatieve zone van de laminae alares groter dan in die van de laminae basales. De chorda ligt los tussen het rhombencephalon enerzijds en het entoderm van de voortdarm anderzijds. Vergroting $50\times$.

Fig. 2. Een transversale doorsnede door het metencephalon van een $9\frac{1}{2}$ dag oud, bestraald embryo (ER III_b). In het algemeen is de wand van de neurale buis hier normaal van dikte. De sluitingsranden prolifereren echter sterk en buigen hierbij om in de ventrikel. Dit is de eerste fase in het ontstaan van een intraventriculaire murale proliferatie. In de chorda (op de foto onder) is een mitose te zien. Vergroting $325\times$.

Fig. 3. Een doorsnede door het metencephalon van een ander, $9\frac{1}{2}$ dag oud, bestraald embryo (ER XX_c). De wand van genoemd hersendeel is hier ongelijk van dikte en toont verder aan de rechterzijde een sterk proliferatief proces in de lamina alaris. In het centrum van de uitwas zijn talrijke, zich delende neuro-ectodermale cellen gelegen. Deze uitwas representeert de eerste ontwikkelingsfase van een extraventriculair muraal proliferatieproces. Vergroting $250\times$.

Fig. 4. Een doorsnede door telencephalon, diencephalon en mesencephalon van een eveneens $9\frac{1}{2}$ dag oud, bestraald embryo (ER XXIII_b). In het gebied van het mesencephalon (op de foto boven) is de neurale buis niet gesloten. Bovendien echter is te zien, dat de sluitingsranden, in plaats van naar elkaar toe te komen, van elkaar af wijken en naar lateraal om buigen. De mitotische activiteit in de germinatieve zone van deze omkrukkende randen is groot. Dit ontwikkelingsbeeld stelt de eerste fase in het ontstaan van exencephalie voor. Vergroting $120\times$.



PLAAT III

TWEEDE EXPERIMENTELE SERIE (vervolg)

Fig. 5. Een doorsnede door het telencephalon, diencephalon en mesencephalon van een $9\frac{1}{2}$ dag oud, bestraald embryo (ER XX_b), dat de verschillende ontwikkelings-anomalieën naast elkaar toont. De wand van de genoemde hersenblaasjes is zeer onregelmatig van dikte, deels als gevolg van lokale onderontwikkeling, deels door toedoen van intramurale proliferatieve processen. In het nauwe ventrikelsysteem is necrotisch celmateriaal aanwezig. In het gebied van het mesencephalon (op de foto boven) bestaat exencephalie. De sluitingsranden in het gebied van de lamina terminalis (op de foto onder) prolifereren sterk, waarbij het extra gevormde neuro-ectoderm zowel naar intraventriculair als naar extraventriculair uitpuilt. Verder is nog het mesenchym, dat de neurale buis omgeeft, uiterst losmazig; het bevat abnormaal grote bloedvaten. Vergroting $125\times$.

Fig. 6. Een transversale doorsnede door het metencephalon van het $9\frac{1}{2}$ dag oude, bestraalde embryo ER III_c. Hier zijn de laminae alares van genoemd hersendeel plaatselijk verdwenen; men vindt ervan over desintegrerende cellen, gelegen in een zeer vaatrijk mesenchym. De laminae basales hebben zich afgerond om een klein centraal lumen. Aldus is opnieuw een neurale buis gevormd, die echter heel klein is en diep onder het ectoderm is gelegen. Vergroting $210\times$.

Fig. 7. Een frontale doorsnede door het gebied van de mesencephale sluitingsranden bij het $9\frac{1}{2}$ dag oude, bestraalde embryo ER XXI_c. Zowel de rechter als de linker rand prolifereren sterk; de overtollig gevormde neuro-ectodermale cellen wijken daarbij onderlangs het ectoderm uit (extraventriculaire murale proliferatie). Uitgaande van de rechter rand (op de foto onder het uiteinde van de proliferatie) is in het mesenchym een streng van cellen van de neurale lijst zichtbaar. In de ventrikel bevinden zich veel afgestorven cellen; de binnenwand van het mesencephalon-dak, heeft als gevolg van de afstoting van necrotische cellen een rafelig oppervlak. Vergroting $290\times$.

Fig. 8. Een transversale doorsnede door het diencephalon (op de foto onder) en het metencephalon (op de foto boven) van het $9\frac{1}{2}$ dag oude, bestraalde embryo ERXX_c. In de beide aangesneden hersendelen is de ventrikel zeer wijd. Verder is de wand van de neurale buis veel dunner dan die bij overeenkomstige controle-embryonen. Dit is dus een embryo, dat een eerste stadium van hydrocephalie toont. Opgemerkt zij echter, dat bij dit embryo tegelijk ook proliferatieve processen werden aangetroffen (zie Plaat II, fig. 3). Vergroting $75\times$.

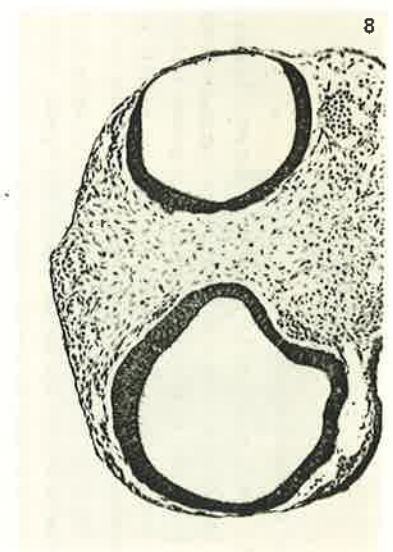
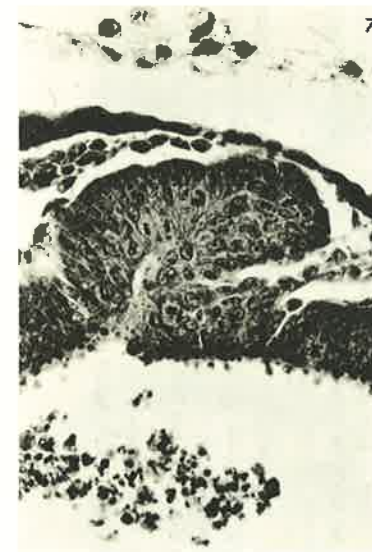
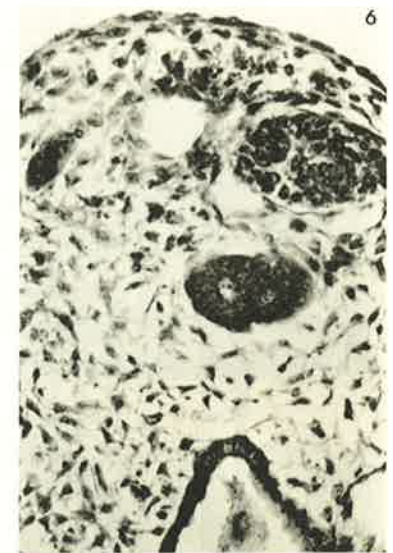
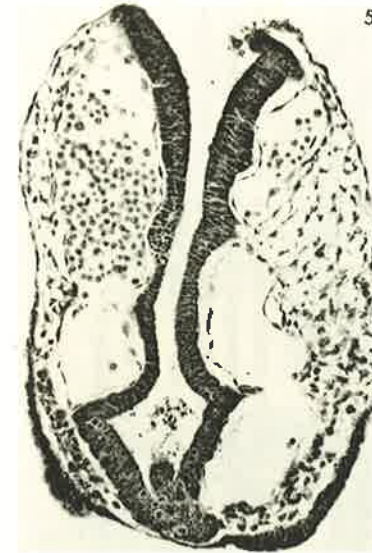


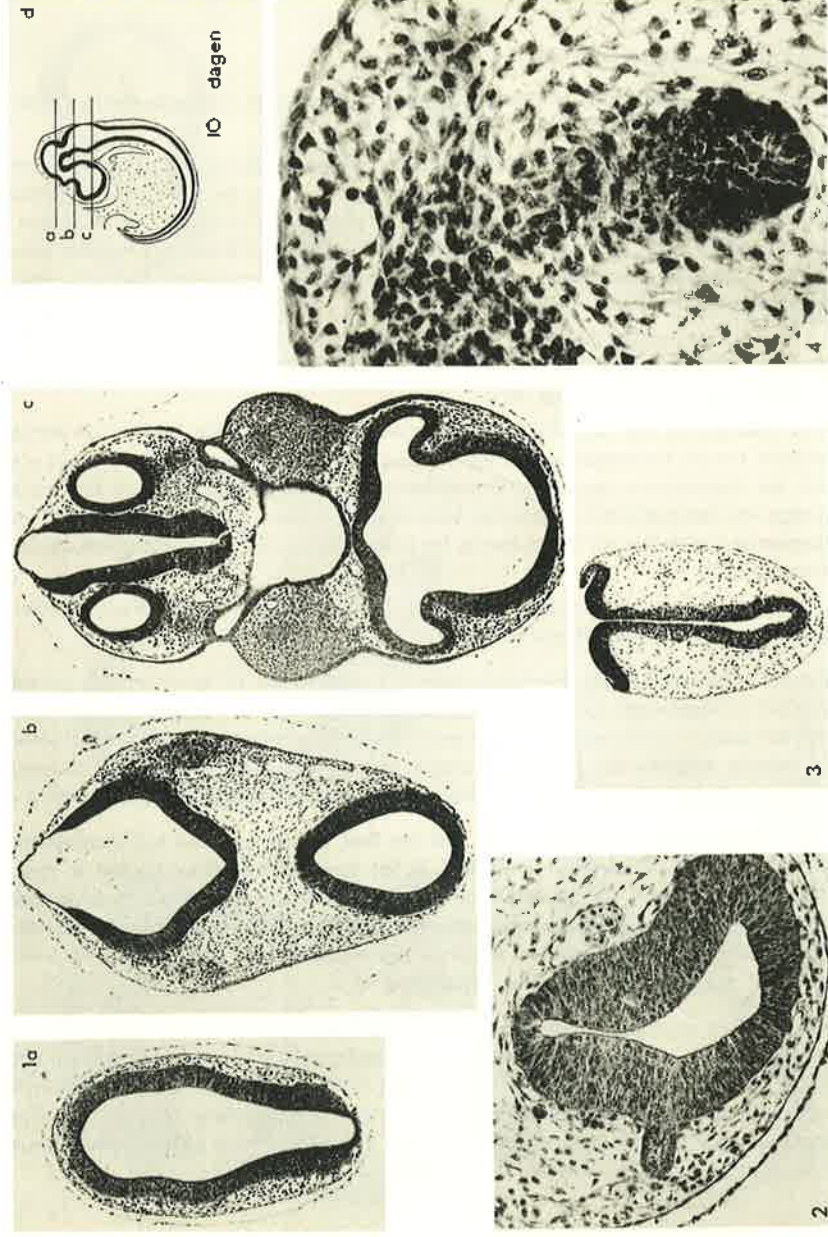
Fig. 1. Doorsneden door het hersengebied van een 10 dagen oud, normaal controle-embryo (CCX₄).

- a. Een doorsnede door het diencephalon (op de foto onder) en het mesencephalon (op de foto boven). Het lumen van deze hersendelen is nog wijd; de mitotische activiteit in de germinatieve zone is groot. Vergroting 45 $\times$.
- b. Een doorsnede door het diencephalon (op de foto onder) en het metencephalon (op de foto boven) Links en rechts naast het metencephalon is de aanleg van het ganglion semilunare van de N. trigeminus aangesneden. Vergroting 45 $\times$.
- c. Een doorsnede door het diencephalon en de aanleg der beide oogblaasjes (op de foto onder), en door het metencephalon, waarnaast de beide oorblaasjes zijn gelegen (op de foto boven). Onder tegen de oorblaasjes ligt het stato-acustische ganglion. Vergroting 45 $\times$.
- d. Een schematische mediane doorsnede door een embryo van 10 dagen. In het gebied van de kop is het niveau van de coupes a, b en c aangegeven.

Fig. 2. Een licht asymmetrische, transversale doorsnede door het diencephalon van een 10 dagen oud, bestraald embryo (CR XVIII₀). De ventrikel is hier nauw. Uitgaande van de rechter wand (de toekomstige rechter thalamus) is een neuro-ectodermale proliferatie te zien, die door de membrana limitans externa is heengebroken en in het omgevende mesenchym uisteeekt (extraventriculaire murale proliferatie). Vergroting 120 $\times$.

Fig. 3. Een doorsnede door het diencephalon en het mesencephalon van het 10 dagen oude, bestraalde embryo CR XVI₀. Bij dit exencephale embryo zijn de laminae alares van het mesencephalon (op de foto boven) naar lateraal omgebogen; de sluitingsranden geven een tegenkromming te zien. De wand van de neurale buis is door lokale degeneratieve en door lokale proliferatieve veranderingen zeer onregelmatig van dikte; het lumen lijkt samengevallen. Het mesenchym, dat de neurale buis omgeeft, is zeer losmazig. Vergroting 45 $\times$.

Fig. 4. Een transversale doorsnede door het metencephalon van het 10 dagen oude, bestraalde embryo CR XVI₀. De laminae alares desintegrerend; de laminae basales hebben zich tot een compacte ronde streng omgevormd. Vergroting 230 $\times$.



PLAAT V

VIERDE EXPERIMENTELE SERIE

Fig. 1. Doorsneden door het hersengebied van een normaal, 11 dagen oud controle-embryo (AC VIII₂).

a. Een doorsnede door het diencephalon (op de foto onder) en het mesencephalon (op de foto boven). Ook in dit ontwikkelingsstadium zijn de ventrikels van deze hersendelen nog wijd. De wand toont enkele plaatselijke (normale) verdikkingen. De mitotische activiteit in de germinatieve zone is in vergelijking met hetgeen men bij 10 dagen oude embryonen ziet, sterk afgenomen; dit verschijnsel doet zich voor in de gehele neurale buis. Vergroting 50 ×.

b. Een transversale doorsnede door het myelencephalon, ter hoogte van de oorblaasjes. Het dunne dak van dit hersendeel ligt nog dicht aan tegen het er overheen liggende ectoderm. Vergroting 50 ×.

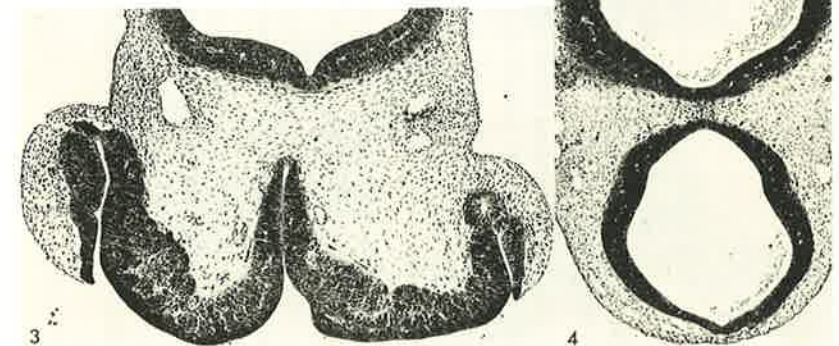
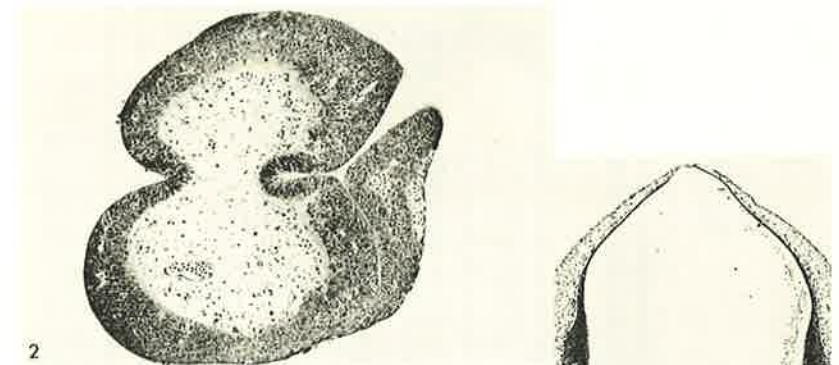
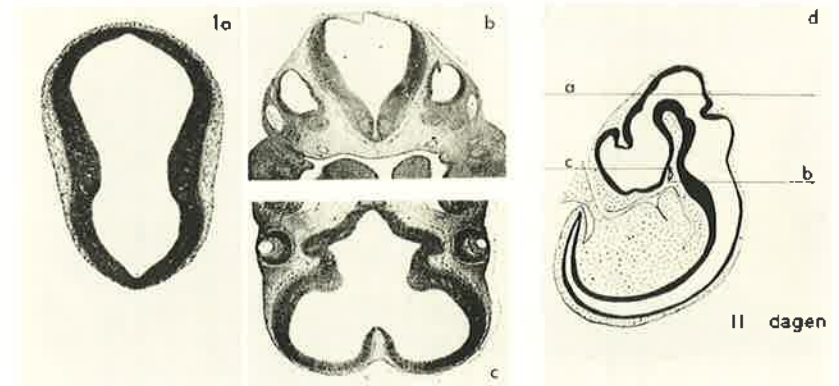
c. Als gevolg van de toegenomen kromming van de neurale buis en de sterke uitgroei van de hemisfeerblaasjes, zijn in deze coupe zowel de hemisfeerblaasjes als ook het diencephalon met de beide oogblaasjes aangesneden. Deze laatste zijn reeds uitgegroeid tot oogbekers, waarin het lensblaasje is gelegen. De gedeeltelijk getroffen oogsteel is nog slechts een dunne streng; het lumen hierin is vrijwel geheel geoblitereerd. Vergroting 50 ×.

d. Een schematische mediane doorsnede door een embryo van 11 dagen. In het gebied van de kop is het niveau van de coupes a, b en c aangegeven.

Fig. 2. Een transversale doorsnede door het diencephale en mesencephale gebied van het 11 dagen oude, bestraalde embryo AR XVIII₆. Op de foto is de dorsale zijde van het embryo rechts gelegen. Bij dit geval van exencephalie is de neurale plaat sterk in omvang toegenomen. Geheel dorsaal is nog een klein stukje ectoderm te zien, overigens is het gehele oppervlak bekleed met neurale weefsel. Vergroting 60 ×.

Fig. 3. Een transversale doorsnede van een deel van de kop van het exencephale embryo AR IV₆. Onderaan op de foto is het opengebleven diencephalon te zien, bovenaan de bodem van het metencephalon. De diencephale neurale plaat is niet alleen zeer breed, maar ook onregelmatig van dikte; dit laatste als gevolg van plaatselijke proliferatie. Het mesenchym onder de neuro-ectodermplaat is losmazig en doorwoerd met vele bloedcapillairen. Vergroting 45 ×.

Fig. 4. Een transversale doorsnede van het diencephalon (op de foto onder) en het metencephalon (op de foto boven) van het hydrocephale, bestraalde embryo AR VIII₆. De wand van de genoemde hersendelen is histologisch weinig gedifferentieerd en is ook dunner dan bij de overeenkomstige controle-embryonen. De ventrikels zijn sterk verwijd. Woekeringen van de wand zijn hier niet te zien; elders in de neurale buis zijn zij echter wel aanwezig. Vergroting 40 ×.



VIERDE EXPERIMENTELE SERIE (vervolg)

Fig. 5. Een transversale doorsnede door het myelencephalon van het 11 dagen oude, bestraalde embryo AR VII_a. Ook de oorblaasjes zijn aangesneden. Door intramuraal proliferatieve processen in de laminae alares is de IV^e ventrikel zeer sterk vernauwd; de laminae basales zijn praktisch normaal. Vergroting 45 ×.

Fig. 6. Een detail-vergroting van de rechter wand van het in de vorige foto afgebeelde myelencephalon. Deze foto toont een zg. rozet; duidelijk is het grote aantal mitosen hierin te zien. Vergroting 300 ×.

Fig. 7. Een doorsnede door het telencephalon en diencephalon van het 11 dagen oude, bestraalde embryo AR XVI_c. Door een uitgebreid intraventriculair muraal proliferatieproces zijn de laterale ventrikels en het dorsale gedeelte van de III^e ventrikel door plooivormige neuro-ectodermale woekeringen opgevuld. Het basale deel van het diencephalon doet aan dit proces niet mee. Vergroting 60 ×.

Fig. 8. Een deel van de wand van het mesencephalon van het 11 dagen oude, bestraalde embryo AR VII_b. Hier is een typische extra-ventriculair murale proliferatie te zien. Vergroting 120 ×.

Fig. 9. Een karakteristieke, geïsoleerd intramesenchymale proliferatie, waargenomen bij het bestraalde embryo AR XVI_c. De neuro-ectodermale cellen zijn gerangschikt rond een centraal lumen. Vergroting 120 ×.

Fig. 10. Een geïsoleerde, juxta-ectodermale proliferatie (embryo AR XVII_b). Evenals bij de intramesenchymale proliferaties het geval is, zijn ook hier de cellen gerangschikt rond een centraal lumen. Vergroting 120 ×.

Fig. 11. Een geïsoleerd intraventriculaire proliferatie (embryo AR XXIII_c). Zulke vrij in de ventrikel voorkomende bolletjes werden enkele malen waargenomen. Centraal in deze proliferaties is weer een lumen aanwezig. Vergroting 190 ×.

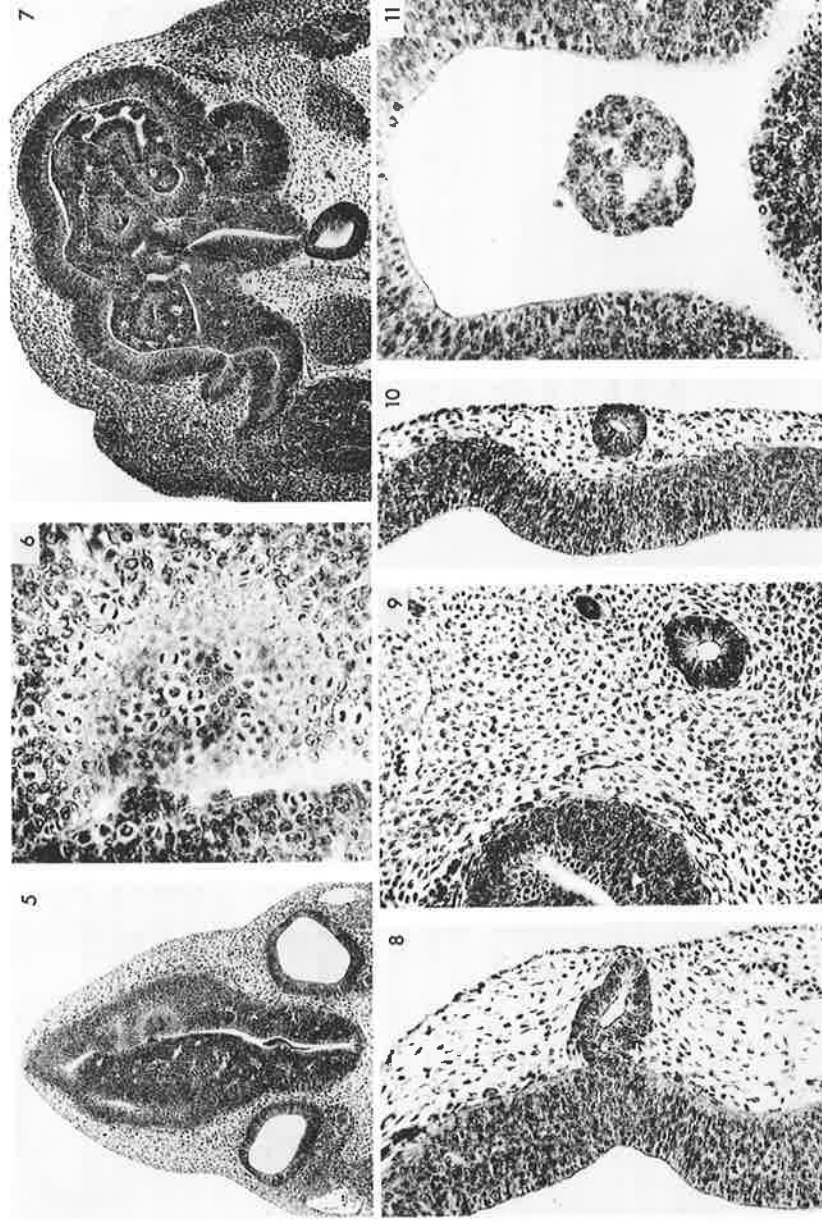


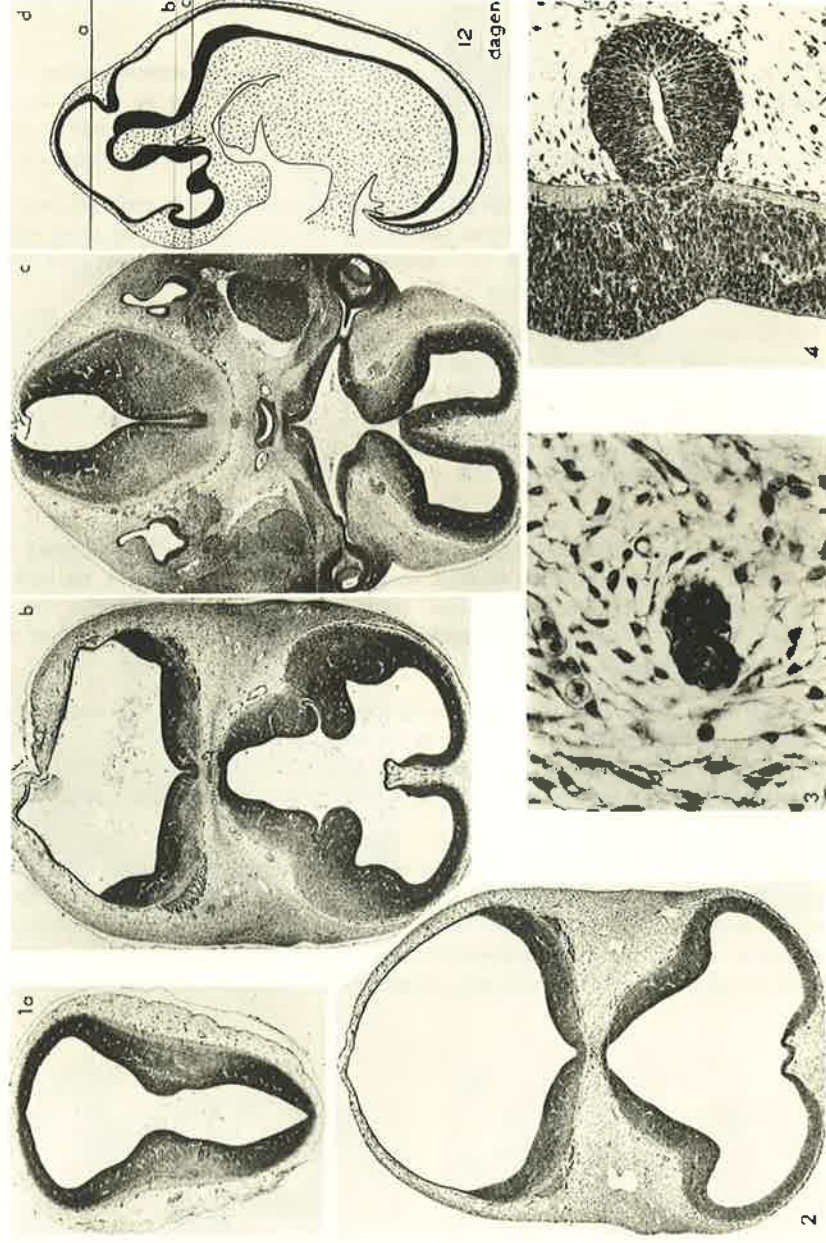
Fig. 1. Doorsneden door het hersengebied van een normaal, 12 dagen oud controle-embryo (DC VIII₀).

- a.* Een doorsnede door het diencephalon (op de foto onder) en het mesencephalon (op de foto boven). De wanden van vooral het diencephalon (thalamus) zijn in dikte toegenomen, waardoor het lumen nu kleiner is dan tevoren. Vergroting 20 ×.
- b.* Een transversale doorsnede door het diencephalon en de beide hemisfeerblaasjes (op de foto onder), en door het metencephalon (op de foto boven). Het dunne dak van de IV^e ventrikel (boven) is, waarschijnlijk door het onttrekken van vocht tijdens de histologische bewerking, ingevallen. De wanden van het diencephalon (thalamus) en ook de bodem van de hemisfeerblaasjes (corpus striatum) tonen histologisch reeds enige differentiatie. Vergroting 20 ×.
- c.* Een doorsnede, waarop te zien zijn, de basale zijde van de hemisfeerblaasjes en het diencephalon met de beide oogbekers (met lens) en de oro-hypophyse (op de foto onder), en het myelencephalon met de beide oorblaasjes (op de foto boven) Vergroting 20 ×.
- d.* Een schematische mediane doorsnede van een embryo van 12 dagen. In het gebied van de kop is het niveau van de coupes *a*, *b* en *c* aangegeven.

Fig. 2. Een transversale doorsnede door het diencephalon (op de foto onder) en het metencephalon (op de foto boven) van het 12 dagen oude, hydrocephale embryo DR III₀. In vergelijking met het normale aspect van deze hersendelen (zie Plaat VII, *fig. 1b*) valt op, dat de ventrikels hier zeer wijd zijn, en dat de histologische differentiatie van de wand sterk is achtergebleven. Vergroting 25 ×.

Fig. 3. Verschijnselen van de degeneratie in een geïsoleerde, intrameneschymale neuro-ectodermale proliferatie (embryo DR V₀). De cellen zijn ineengeschrompeld; de mitotische activiteit is sterk afgenomen. Er zijn geen aanwijzingen voor, dat deze degeneratie zou berusten op een verminderde vascularisatie. Vergroting 300 ×.

Fig. 4. Een voorbeeld van een extraventriculaire murale proliferatie, waarbij duidelijk is te zien, dat de prolifererende neuro-ectodermale cellen de marginale zone doorbreken en zo intrameneschymaal kunnen komen te liggen (embryo DR XXI₀). Vergroting 120 ×.



SYNOTIE

PLAAT VIII

Fig. 1. Een enigszins schuine, frontale doorsnede door het rhombencephalon en het halsmerg van een 9 dagen oud, normaal embryo (HC II₃). Aan de rechter zijde is het verdikte epitheel van de oorplacode te zien. De rand van deze placode en die van de neurale wal liggen op slechts kleine afstand van elkaar. Vergroting 95 ×.

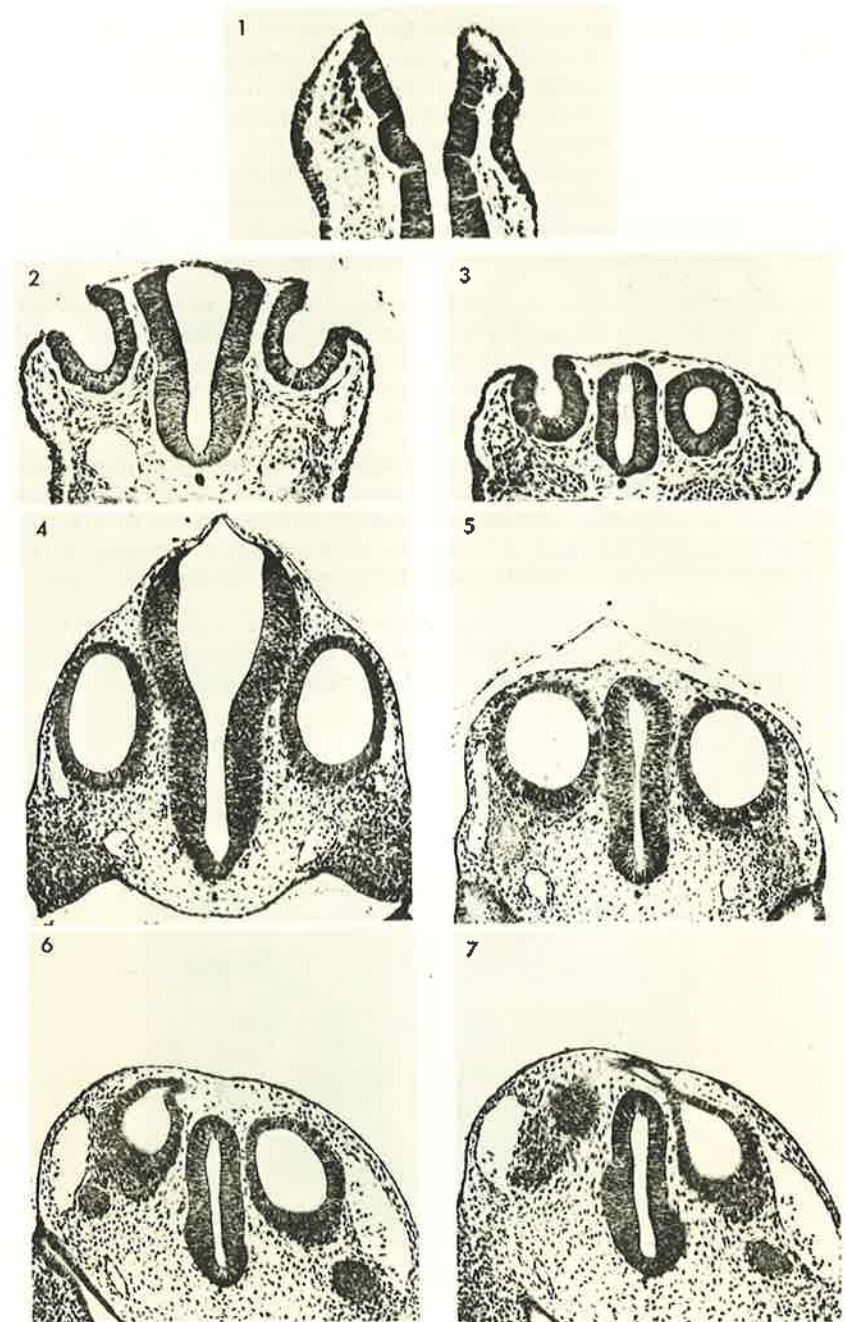
Fig. 2. Een transversale doorsnede door het rhombencephalon en de beide gekromde oorplacoden bij een normaal embryo van 9½ dag (EC XV₆). De laminae alares van het rhombencephalon wijken iets naar lateraal uit; het dak van de IV^e ventrikel ligt tegen het ectoderm aan. Vergroting 75 ×.

Fig. 3. Eenzelfde doorsnede als in de vorige figuur bij een embryo van 9½ dag, dat bestraald werd (ER X_a). Het rhombencephalon is aanzienlijk te klein en ligt los van het er overheen liggende ectoderm; de wand toont geen histologische differentiatie, en de mitotische activiteit in de germinatieve zone is gering. De oorblaasjes, vrijwel normaal van grootte, liggen dichter bij elkaar dan normaal. Het dorsale oppervlak is afgeplat. Vergroting 75 ×.

Fig. 4. Een transversale doorsnede door rhombencephalon en oorblaasjes van een 10 dagen oud, normaal embryo (CC XVI₂). Het alaire deel van het rhombencephalon is sterk in omvang toegenomen en wijkt verder dan tevoren naar lateraal. De beide oorblaasjes liggen vrij van het ectoderm; door verschil in wanddikte zijn het vestibulaire deel (boven-lateraal) en het cochleaire deel (onder-mediaal) van elkaar af te grenzen. Vergroting 75 ×.

Fig. 5. Eenzelfde doorsnede als in de vorige figuur bij een embryo van 10 dagen, dat bestraald werd (CR VI_c). Van het rhombencephalon is vrijwel alleen het basale deel behouden gebleven. De beide oorblaasjes, die nagenoeg normaal van grootte zijn, liggen vrij van het ectoderm; ze liggen meer naar mediaal dan normaal. Vergroting 75 ×.

Fig. 6 en 7. Deze twee coupes door het rhombencephale gebied van het 10 dagen oude, bestraalde embryo CR I_a tonen de verbinding, die hier bestaat tussen het linker en het rechter oorblaasje. Deze verbinding ligt dorsaal van het te kleine rhombencephalon, waarvan de laminae alares en de laminae basales door een verschil in wanddikte van elkaar te onderscheiden zijn. Vergroting 75 ×.



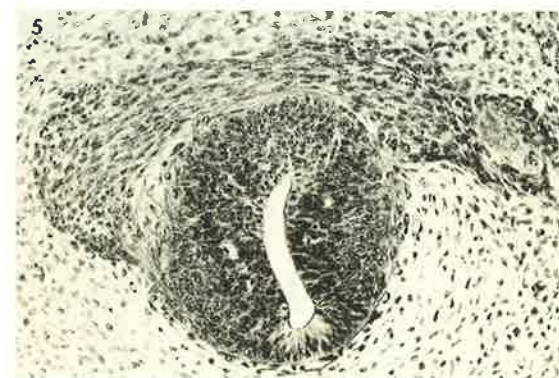
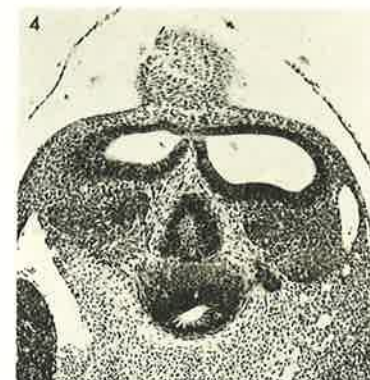
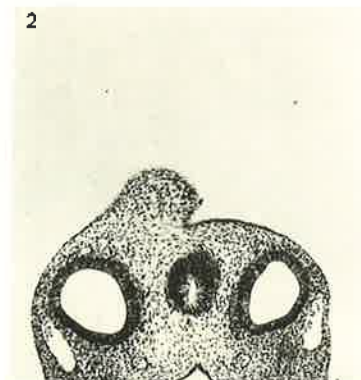
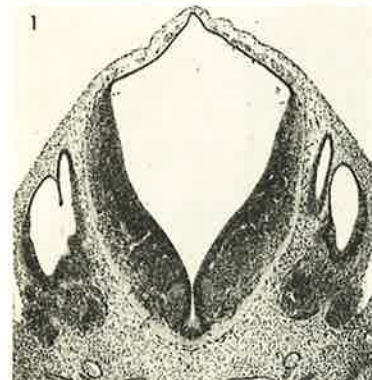
PLAAT IX

Fig. 1. Een transversale doorsnede door het voorste deel van het myelencephalon van een 11 dagen oud, normaal embryo (AC IV₁). Van het myelencephalon wijken de laminae alares naar lateraal; het dak is dun en ligt los van het ectoderm. Uit het mediale deel van de oorblaasjes vormt zich de ductus endolymphaticus, die in dorsale richting uitgroeit. Het bovenste, vestibulaire en het onderste, cochleaire deel van de oorblaasjes zijn door verschil in wanddikte duidelijk te onderscheiden. Tegen de onderzijde van elk oorblaasje liggen twee ganglia: mediaal het stato-acustische ganglion en iets ventro-lateraal daarvan het ganglion geniculi van de N. facialis; tussen deze beide in ligt het motorische deel van de N. facialis. Vergroting 45 ×.

Fig. 2. Eenzelfde doorsnede als in de vorige figuur bij een 11 dagen oud, bestraald embryo (AR XVIII_c). De laminae alares van het myelencephalon zijn hier geheel afwezig. De oorblaasjes liggen dicht bij elkaar dan normaal en tonen, al zijn zij van normale omvang, weinig differentiatie. De ganglia zijn, hoewel niet op deze coupe aangesneden, normaal gevormd. Vergroting 45 ×.

Fig. 3 en 4. Twee coupes door het myelencephale gebied van het 11 dagen oude, bestraalde embryo AR XX_e. Bij dit embryo zijn de oorblaasjes, vrijwel normaal van omvang, in de mediaanlijn met elkaar verbonden (*fig. 4*). De ganglia van de N. facialis staan wél (*fig. 3*), die van de N. stato-acusticus niet met elkaar in verbinding (*fig. 4*). Van het myelencephalon is alleen het basale deel aanwezig. Vergroting 45 ×.

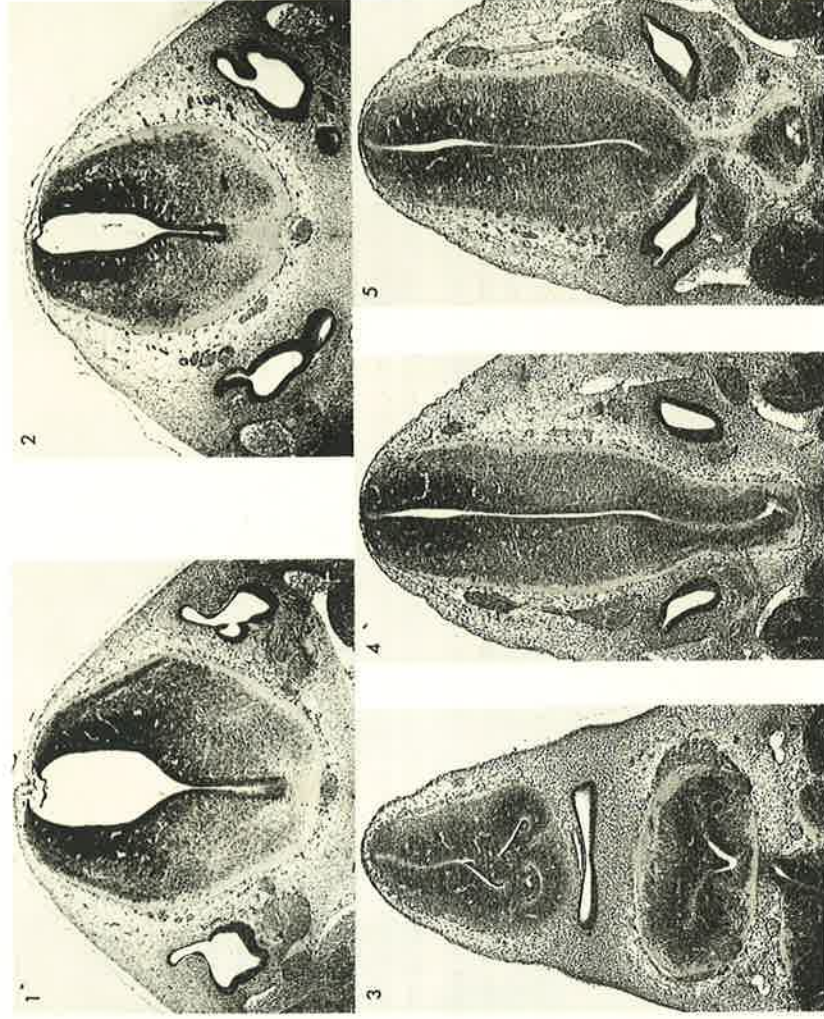
Fig. 5. Een transversale doorsnede door het myelencephalon van het 11 dagen oude, bestraalde embryo AR VII_a. Dorsaal van het veel te kleine myelencephalon bestaat samenhang tussen het rechter en linker ganglion geniculi. Vergroting 120 ×.



PLAAT X

Fig. 1 en 2. Twee coupes door het gebied van het myelencephalon van het 12 dagen oude, normale embryo DC VIII₄. Uit het vestibulaire deel van de oorblaasjes ontwikkelen zich de halfcirkelvormige kanalen (boven-lateraal), uit het cochleaire deel groeit de cochleabuisvormig uit (ventro-mediaal: *fig. 2*). De ganglia van de N. facialis en de N. stato-acusticus zijn in dit stadium geheel van elkaar gescheiden. Vergroting 35 $\times$.

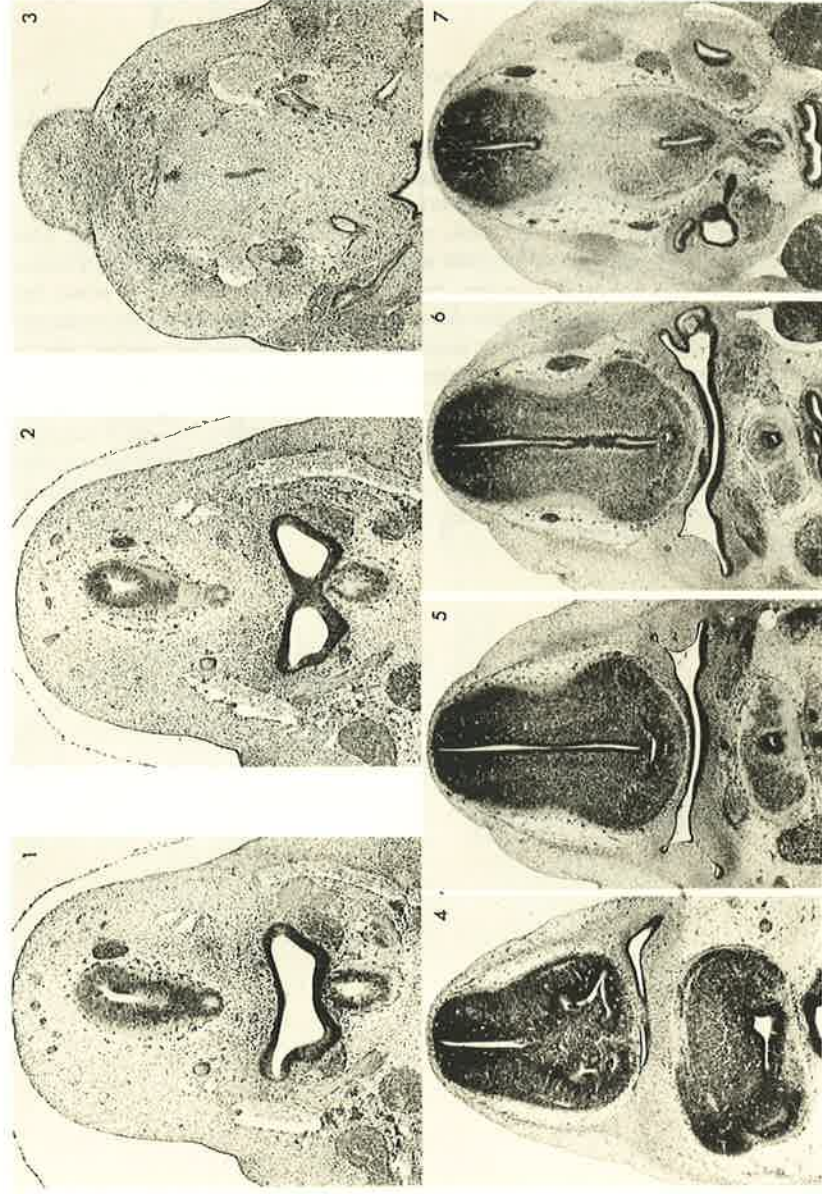
Fig. 3, 4 en 5. Drie coupes door het myelencephale gebied van het 12 dagen oude, bestraalde embryo DR XIX₈. Bij dit embryo is de neurale buis sterk gekromd; daardoor wordt deze in de coupes deels transversaal (*fig. 3*), en deels frontaal (de *fig. 4 en 5*) getroffen. Het voorste deel van het myelencephalon is, ondanks lokale proliferatie (*fig. 3*), sterk in ontwikkeling achtergebleven. In de hier ter plaatse bestaande, door de sterke kromming nog geaccentueerde, diepe dorsale groeve zijn de beide oorblaasjes met elkaar verbonden (*fig. 3*). Juist dorsaal van deze verbinding ligt mediaan de ongepaarde saccus endolymphaticus. De halfcirkelvormige kanalen en de ductus cochlearis zijn beiderzijds normaal aangelegd; ook de ganglia zijn normaal gevormd. In *fig. 4* zijn aan de linkerzijde de vezels van de N. facialis tussen het myelencephalon en het ganglion geniculi te zien. In *fig. 5* ziet men aan de onderzijde van de oorblaasjes het stato-acustische ganglion. Vergroting 35 $\times$.



PLAAT XI

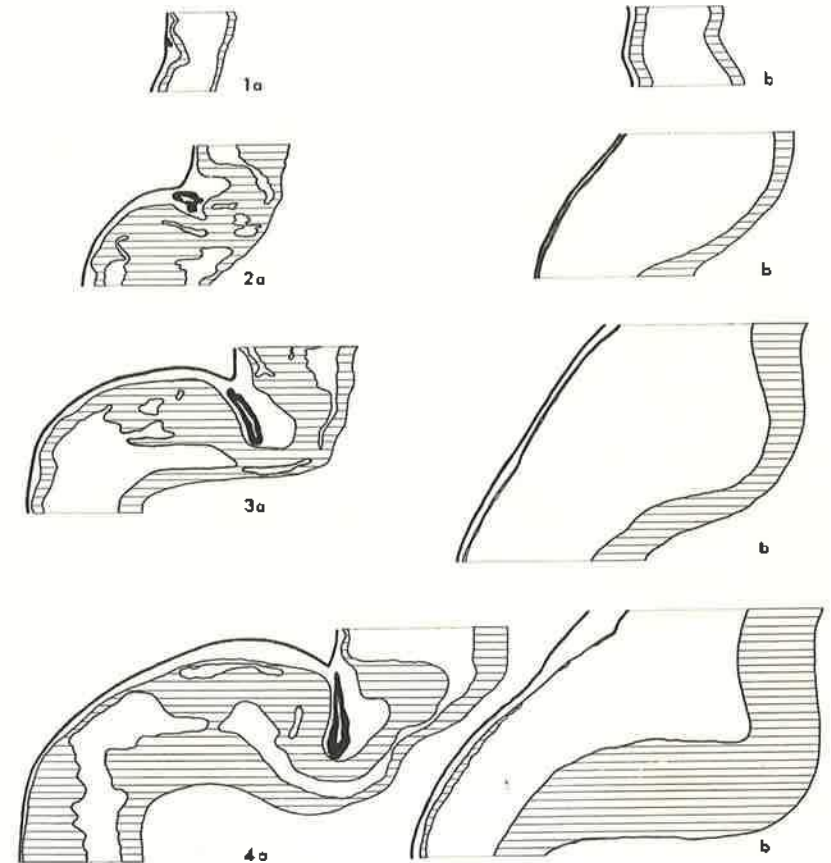
Fig. 1, 2 en 3. Drie doorsneden door het gebied van het metencephalon en myelencephalon van het 12 dagen oude, bestraalde embryo DR IV_a. Het metencephalon is klein (*fig. 1 en 2*), het myelencephalon ontbreekt plaatselijk (*fig. 3*). De oorblaasjes zijn in de mediaanlijn met elkaar verbonden; zij tonen nauwelijks enige differentiatie. De ganglia van de N. facialis en de N. stato-acusticus zijn rechts en links aan de basale zijde van de oorblaasjes gelegen (*fig. 1*). Deze ganglia hebben bij dit embryo geen verbindingen met elkaar. Vergroting 35 ×.

Fig. 4, 5, 6 en 7. Transversale doorsneden door het gebied van het metencephalon en myelencephalon van het 13 dagen oude, bestraalde embryo GR XIX_a. De beelden bij dit embryo tonen veel overeenkomst met die bij het embryo DR XIX_a (*Plaat X, fig. 3, 4 en 5*). Het metencephalon toont, ondanks lokale intramurale proliferatieve veranderingen (*fig. 4*), een sterke verkleining, waardoor een diepe dorsale groeve is ontstaan. In deze groeve ligt een verbinding tussen de rechter en linker binnenooraanleg. Zowel het vestibulaire als het cochleaire deel hiervan is vrijwel normaal ontwikkeld. Alleen met de ductus endolymphaticus en het crus commune, is dit niet het geval; deze zijn beiderzijds in de verbindingsbuis opgenomen (*fig. 5 en 6*). Ook bij dit embryo is de saccus endolymphaticus een enkelvoudige mediane uistulping van de dorsale wand van deze verbindingsbuis (*fig. 4*). De stato-acustische ganglia (*fig. 6 en 7*) zijn niet met elkaar verbonden, de beide ganglia geniculi wél (*fig. 5*). Vergroting 25 ×.



PLAAT XII

Reconstructie-tekeningen van mediane doorsneden door het metencephale en myelencephale gebied. Links zijn tekeningen gegeven van embryonen met synotie; respectievelijk 1a: embryo CR 1a (10 dagen), 2a: embryo AR XX_e (11 dagen) 3a: embryo DR XIX_a (12 dagen) en 4a: embryo GR XIX_a (13 dagen). Rechts zijn overeenkomstige tekeningen van even oude controle-embryonen (b) weergegeven. Alle tekeningen zijn vervaardigd op dezelfde schaal (25 ×), zodat zij onderling kunnen worden vergeleken. Duidelijk is te zien, dat bij de embryonen met synotie steeds het dorsale deel van het rhombencephalon (later het voorste deel van het myelencephalon) sterk is misvormd. Hier bestaat een aanzienlijk tekort aan neurale weefsel. Het is juist in de dwarse, dorsale groeve, die hiervan het gevolg is, dat de verbinding tussen de twee oorblaasjes te vinden is. De oppervlaktebekleding (dikke lijn) volgt min of meer de dorsale contour van de neurale buis; daardoor ontstaat een macroscopisch reeds zichtbare, diepe uitwendige groeve in de occipitaal-streek. In het gebied van de groeve, maar ook caudaal en craniaal daarvan, is de IV^e ventrikel door proliferatieve processen in de laminae alares – op enkele holten na – door neuro-ectodermaal weefsel opgevuld.

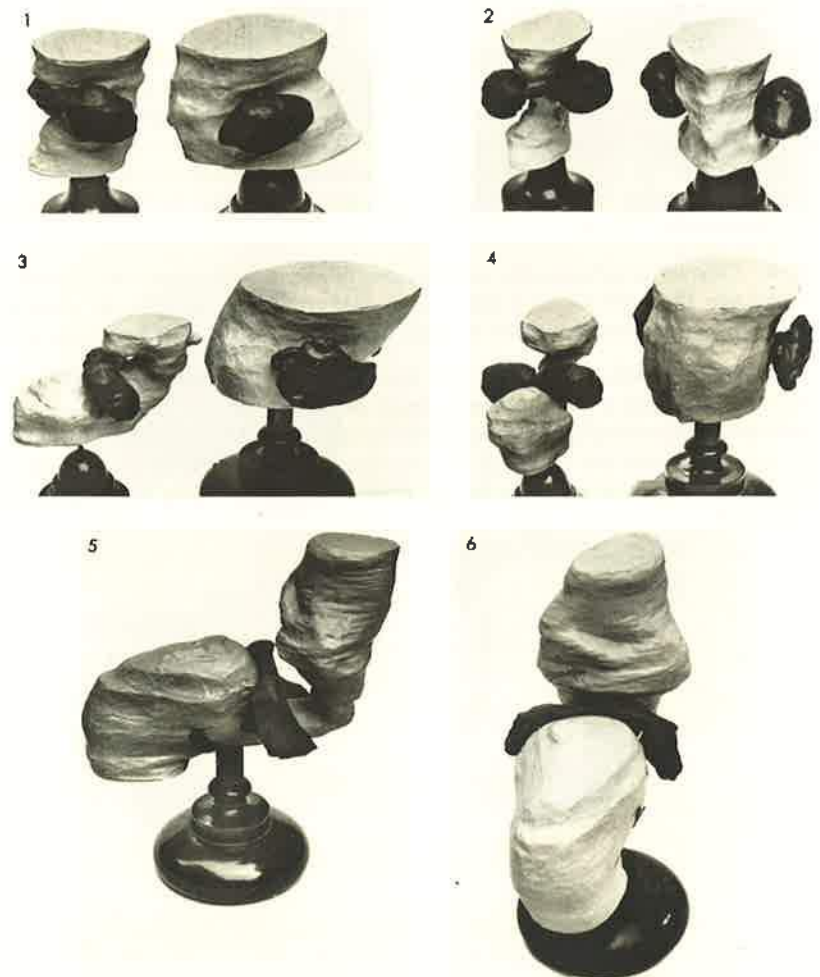


PLAAT XIII

Fig. 1 en 2. Lateraal aanzicht, resp. dorsaal aanzicht van de wasreconstructies van het rhombencephalon en de oorblaasjes van het 10 dagen oude, bestraalde embryo CR I₃ (links) en van het even oude normale embryo CC VII₂ (rechts). Bij het bestraalde embryo met synotie toont het rhombencephalon lokaal een diepe dorsale groeve; de in deze groeve liggende verbinding tussen de oorblaasjes is een dunne buis.

Fig. 3 en 4. Lateraal aanzicht, resp. dorsaal aanzicht van de wasreconstructies van het metencephalon, het myelencephalon en de oorblaasjes van het 11 dagen oude, bestraalde embryo AR XX_c (links) en van het even oude controle-embryo AC IV₁ (rechts). Bij het bestraalde embryo met synotie is het voorste deel van het myelencephalon diep ingesneden. In de dorsale groeve ligt de verbinding tussen de beide oorblaasjes, die in dit geval tamelijk breed is.

Fig. 5 en 6. Lateraal aanzicht, resp. dorsaal aanzicht van de wasreconstructie van het metencephalon, het myelencephalon en de oorblaasjes van het 12 dagen oude, bestraalde embryo DR XIX_a. De neurale buis toont ter hoogte van de verbinding tussen de beide oorblaasjes een diepe dorsale insnijding. Deze berust op het lokaal verloren gaan van de laminae alares en de dakplaat, maar wordt nog geaccentueerd door een bijkomende sterke kromming.

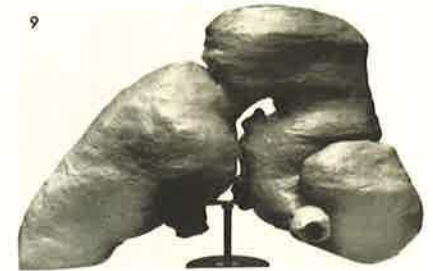


PLAAT XIV

Fig. 7 en 8. Lateraal aanzicht, resp. vooraanzicht van de wasreconstructie van de hersenen van het 12 dagen oude, bestraalde embryo DR IV_a, dat zowel exencephalie als synotie toont. De wasreconstructie laat zien, hoe het telencephalon, diencephalon en mesencephalon zijn geëverteerd. In het gebied van het metencephalon en het voorste deel van het myelencephalon is de continuïteit van de neurale buis verbroken. Op deze plaats ligt in de mediaanlijn een enkelvoudig oorblaasje (*fig. 7*) dat nagenoeg geen differentiatie toont.

Fig. 9. Lateraal aanzicht van een wasreconstructie van de hersenen van een controle-embryo van 12 dagen (DC X₁). Deze wasreconstructie toont duidelijk de normale bouw van de hersenen, en ook de normale topografie van oog- en binnenooraanleg.

Fig. 10 en 11. Lateraal aanzicht, resp. dorsaal aanzicht van een wasreconstructie van het metencephalon, het myelencephalon en de oorblaasjes van het 13 dagen oude, bestraalde embryo GR XIX_a. Ter hoogte van het voorste deel van het myelencephalon wordt de continuïteit van de neurale buis slechts gehandhaafd door een dunne neuro-ectodermale streng. In de diepe dorsale groeve ligt de verbinding tussen de twee oorblaasjes.



PLAAT XV

Fig. 12 en 13. Lateraal aanzicht, resp. dorsaal aanzicht van de wasreconstructie van de samenhangende oorblaasjes van het embryo GR XIX_a (13 dagen oud). De ductus cochlearis en de halfcirkelvormige kanalen zijn parig en normaal ontwikkeld. De verbinding tussen deze parige delen wordt hier gevormd door de ductus endolymphaticus, het crus commune, en de sacculus en utriculus. Dorsaal heeft deze verbinding mediaan een onparige uitstulping; dit is de saccus endolymphaticus.

UITWENDIG ASPECT DER EMBRYONEN

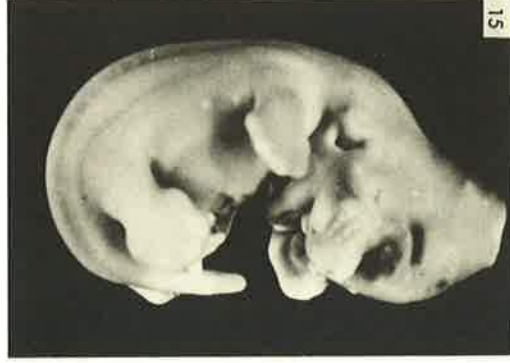
Fig. 14. Zij aanzicht van een normaal embryo van 13 dagen (GC XIII₂). Vergroting 15 ×.

Fig. 15. Zij aanzicht van een 13 dagen oud, bestraald embryo met microcephalie (GR XIII₃). Vergroting 15 ×.

Fig. 16. Zij aanzicht van een 13 dagen oud, bestraald embryo met exencephalie (GR XIII₄). De neurale plaat is geëverteerd in het telencephale, diencephale en mesencephale gebied. In de occipitaal-streek is bij dit embryo tevens de transversale groeve te zien, die zo kenmerkend is voor de beschreven ontwikkelingsstoornissen in het gebied van het metencephalon en/of het myelencephalon. Vergroting 15 ×.



14



15



16



12



13

STELLINGEN

I

Het zogenoemde „branchiogene carcinoom” berust altijd op een metastatisch proces.

II

Bij congenitale misvormingen van het oor is een poging tot operatief functieherstel aangewezen, mits de cochleaire perceptie niet in ernstige mate is gestoord.

III

Het is zeer waarschijnlijk dat de plasmacel afstamt van de lymphocyt.

IV

Het gebruik van de intra-oculaire plastic lens is het experimentele stadium nog niet te boven.

V

De door FRIEDE aangevoerde argumenten voor de opvatting dat de astrocyten een rol spelen bij het ionentransport in zenuwweefsel zijn onvoldoende gefundeerd.

R. L. FRIEDE (1964) *J. of Cell Biol.* 20, 17.

VI

De mogelijkheid kan niet worden uitgesloten dat de door SHANTA-VEERAPPA en BOURNE beschreven radiale banden in de myelineschede van zenuwen kunstproducten zijn.

T. R. SHANTHAVEERAPPA en G. H. BOURNE (1962) *Nature* 196, 1215.

VII

De auscultatie van de arteria subclavia is een onderzoekmethode, die onmisbaar is voor de differentiele diagnostiek van de brachialgie.

J. GILROY en J. S. MEYER (1960) *Brain* 86, 733.

VIII

Een verplichte stage als co-assistent in een eerste-hulp post van een academisch ziekenhuis zou de opleiding van medische studenten zeer ten goede komen.