Kausal-analytische Studien über die Befruchtung des Kanincheneies
II. Die Isolierung der auf das Eizytoplasma auflösend
wirkenden Substanzen aus den Spermatozoen¹⁾

Von

Jinshin Yamane

Zootechnisches Institut, Kaiserliche Universität, Taihoku, Formosa

(Mit 2 Tafeln)

Eingegangen am 20. April 1935

	Seite
Inhaltsverzeichnis	
I. Einleitung	474
II. Methodik	475
III. Experimente	475
1. Wirkungen der mit Toluol abgetöteten Spermatozoen	475
2. Wirkungen des frischen Samenextraktes.	476
3. Wirkungen des konservierten Samenextraktes.	476
4. Wirkungen des gekochten Samenextraktes.	477
5. Wirkungen des mit Kaolin behandelten Samenextraktes	478
IV. Besprechung der Ergebnisse.	479
V. Zusammenfassung	481
VI. Literatur	482
VII. Tafelerklärung	482

I. Einleitung

Aus den vorigen Besamungsversuchen an Kanincheneiern sowohl *in vivo* als auch *in vitro* habe ich gefunden, daß die Spermatozoen Fähigkeiten besitzen, die Follikelzellmasse in sehr kurzer Zeit zu dispersieren und die Coronazellen ablösend zu bewirken (YAMANE 1935). Dabei wurde eine chemische Wirkung der Spermatozoen als Hauptfaktor festgestellt, worauf die Konsistenzveränderungen der Follikelzellmasse und der Interzellulärsubstanzen der Coronazellen beruhen. Die lebhafteste Bewegung der Spermatozoen, die auch bei der Versprengung der Follikelzellmasse und der Coronazellen mechanisch mitwirkt, war nur als Nebenfaktor zu betrachten. Es fragt sich nun, ob man diese auf die Follikelzellmasse und Coronazellen ablösend wirksamen, chemischen Substanzen aus den Spermatozoen isolieren kann.

Folgende Experimente zeigen schon, daß dies in der Tat durch Extraktion der Spermatozoen möglich ist, und ferner, daß die in Frage gestellten Substanzen nicht nur auf die Follikelzellmasse und die Coronazellen sondern auch auf die Eizelle ihre Auflösungswirkung ausübt, eine Erscheinung, die bisher experimentell nicht bewiesen werden konnte.

¹⁾ Ausgeführt mit Unterstützung der Kaiserlichen Akademie der Wissenschaften.

II. Methodik

Als Untersuchungsmaterial wurden Kaninchenspermatozoen auf derselben Weise aus den kastrierten Nebenhodenschweife gewonnen, wie ich schon mehrmals beschrieben habe (YAMANE u. EGASHIRA 1925, YAMANE u. KATO 1928, YAMANE 1935, usw.). Bei der Extrahierung der Spermatozoen aus den Nebenhodengewebe wurde jedoch, abweichend von den früheren Angaben, Tyrodelösung anstatt des Dextrose-Phosphatpuffers verwendet, da die in der Tyrodelösung stets vorkommende Agglutination der Spermatozoen bei den vorliegenden Experimenten nicht unbedingt in Betracht zu ziehen brauchte.

Nachdem die Spermasuspension durch Abfiltrierung der Nebenhodenstückchen mittels eines Seidentuches von diesen befreit worden war, wurde sie unter Toluolzusatz 2 bis 3 Stunden lang mit Hilfe einer Schüttelmaschine stark geschüttelt, dann 30 Minuten lang zentrifugiert. Die Zahl der verwendeten Nebenhodenschweife und die Menge der hinzugesetzten Tyrodelösung schwankte je nach dem Experiment. Das durch Zentrifugierung gewonnene Flüssigkeit ist eine ebenso dicke opalisierende, wie das in der Gewebezüchtung allgemein übliche Embryonalextrakt. Wir bezeichnen dieses hinfert als „Samenextrakt“

Die Eier, die zur Prüfung der chemischen Wirkungen des Samenextraktes benutzt wurden, stammten ausschließlich von denjenigen Kaninchenweibchen, die 13 1/2 Stunden nach steriler Kopulation getötet wurden; sie sind stets mit der Follikelzellmasse ausgerüstet, deshalb für unseren Zweck gut geeignet (YAMANE 1935).

Die Reaktion des Eies auf das Samenextrakt wurde folgenderweise untersucht: Man bringt zuerst einige Tropfen des Samenextraktes in die Aushölung des Hohlobjektträgers; dann überträgt man die Eier mit einer Pipette in die Flüssigkeit, bedeckt mit einem Deckglas, um bis zur Untersuchung im Thermostat bei 37°C gehalten zu werden.

III. Experimente

1. Wirkungen der mit Toluol abgetöteten Spermatozoen

Der Suspension der Spermatozoen in Tyrodelösung ein Viertel Volumen Toluol zugesetzt; das Gemisch wurde 20 Minuten lang mit Hilfe einer Schüttelmaschine stark geschüttelt, dann 5 Minuten lang zentrifugiert, um die Suspension von der Toluolschicht zu trennen. Bei der mikroskopischen Untersuchung der Suspension erwies sich, daß die Spermatozoen noch in beträchtlicher Menge suspendiert, aber durch Toluol vollständig abgetötet waren. Hierauf wurden drei Tubeneier (TE 379, 380 u. 381) in diese Suspension übertragen. Die Untersuchung, die 40 Minuten darauf geschah, ergab sich, daß die Follikelzellmasse

schon vollkommen dispersiert waren und die Coronazellen, wenn sie auch als solches stehen blieben, sich sehr leicht beseitigen ließen (Taf. 19, Abb. 1). Das Ergebnis war hier genau dasselbe wie bei der Besamung mit lebhaft bewegenden Spermatozoen in allen vorhergehenden Versuchen (YAMANE 1935). Dieser Versuch ergänzt die Erwägung in der vorigen Mitteilung, daß bei der Dispersion der Follikelzellmasse der mechanische Einfluß der Spermatozoen kein Hauptfaktor ist.

2. Wirkungen des frischen Samenextraktes

Drei Nebenhodenschweife wurden mit 4 ccm Tyrodelösung extrahiert, unter Zusatz von 3 ccm Toluol 3 Stunden lang geschüttelt, und 30 Minuten lang zentrifugiert. Das auf diese Weise hergestellte Samenextrakt wurde vier Tubeneiern (TE 383, 384, 385, u. 386) hinzugesetzt und bei 37°C gehalten. Schon 10 Minuten darauf wurde bei jedem Ei die Follikelzellmasse vollständig dispersiert, indem die intakt gebliebenen Zellkerne auf dem Boden des Hohlobjektträgers ganz niedergeschlagen waren. Obwohl die Coronazellen hier auch immer noch an der Eihülle stehen blieben, erschienen sie ganz durchsichtig, was auf die Auflösung ihres Zytoplasmas beruht; sie hatten schon ihre radiäre Zellordnung verloren, so daß sie durch leichte Berührung mit einer Haarschlinge ohne Widerstand von ihrer Unterlage abtrennen ließen (Taf. 19, Abb. 2). Auch die Eihülle selber verlor ihre elastische Konsistenz; sie war leicht zerbrechlich. Auffallend war die zytolytische Erscheinung der Eizelle: Sie zeigte eine starke Volumenverminderung und ein runzeliges Aussehen und war ebenfalls leicht zerbrechlich (Taf. 19, Abb. 3). Das Experiment zeigt uns vor allem die Tatsache, daß das Samenextrakt imstande ist, die Follikelzellen zu dispersieren, das Lockerwerden der Corona radiata zu veranlassen, es enthält also etwas Chemisches. Die Konsistenz- bzw. Formveränderungen der Eihülle und der Eizelle weisen weiter darauf hin, daß diese chemischen Substanzen im Samenextrakt in hoher Konzentration vorhanden sind, denn derartige Erscheinungen kamen niemals bei der Besamung mit den Spermatozoen vor. Wenn man nämlich Abbildungen 1 und 2 in der Tafel 19 vergleicht, so versteht man sehr leicht wie stärker das Samenextrakt wirkt als die Spermasuspension.

3. Wirkungen des konservierten Samenextraktes

Dasselbe Samenextrakt wie beim Experiment 2 wurde unter Toluolzusatz 6 Tage lang im Eisschrank bei 5°C aufbewahrt und bezüglich seiner chemischen Wirkungen bei 37°C wieder geprüft (TE 395 u. 396). Die verwendeten Eier wurden in 8 Minuten nach dem Zusatz des Samenextraktes von den Follikelzellmassen vollkommen isoliert gefunden, und auch die Coronazellen verhielten sich genau dasselbe wie bei allen vor-

hergehenden Experimenten (Taf. 19, Abb. 4). Hieraus folgt, daß die chemisch wirkenden Substanzen des Samenextraktes der mehrere Tage langen Erhaltung fähig sind.

Hervorzuheben ist hier, daß selbst das so konservierte Samenextrakt seine Wirkung nicht nur auf die Follikelzellmasse und die Coronazellen sondern auch auf das Innere der Eizelle ausüben kann. Das eine (TE 395) der oben erwähnten zwei Eiern wurde nämlich in BOUINS Flüssigkeit fixiert, nachdem es 3 Stunden lang in konserviertem Samenextrakt verweilte. Bei der Schnittuntersuchung dieses Eies erwies sich folgendes Bild: Die Coronazellen haben schon zum größten Teil ihr Zytoplasma verloren und stellen eine Kernreihe dar. Im perivitellinen Raum befinden sich 8 oder, 9, in ihrer Größe verschiedenen Zytoplasmakügelchen in sehr dichtem Andrang, worunter 4 durch das Vorhandensein der Chromatinkörner als Abkömmlinge des ersten Richtungskörpers zu bestimmen sind (Taf. 20, Abb. 6). Unter diesen Zytoplasmakügelchen ähneln sich die größeren den Furchungszellen und die kleineren den Richtungskörpern. Auffällig ist nun das Verhalten der Chromosomen der Eizelle. Während die Chromosomen der Eiermutterzelle bei der normalen Reifungsteilung immer am Pol liegen, (vgl. Taf. 20, Abb. 9), sind sie hier fast im Zentrum des Eizytoplasmas verlagert. Und zwar befinden sie sich im späten Anaphasestadium der zweiten Reifungsteilung. Dieser Befund gibt uns einen sehr wichtigen Aufschluß über die aktivierenden Wirkungen des Samenextraktes auf die Eizelle.

4. Wirkungen des gekochten Samenextraktes

a) Dasselbe Samenextrakt beim Experiment 2 wurde auf dem Wasserbad 30 Minuten lang gekocht und zwei Tubeneiern (TE 387 u. 388) hinzugesetzt. 4 Stunden darauf zeigten ihre Follikelzellmasse keine Veränderungen, auch noch 2 Stunden später war bezüglich ihrer Konsistenz nichts Besonderes zu bemerken.

b) Es wurde zwei Nebenhodenschweifen je 3 ccm Tyrodelösung und Toluol zugesetzt, 3 Stunden lang geschüttelt, 1 Stunde lang zentrifugiert. Das so erhaltene Samenextrakt wurde in 3 gleiche Portionen geteilt; die erste Portion wurde zur Kontrolle als solches, die zweite erst nach 1 stündigem Kochen auf dem Wasserbad zur Untersuchung verwendet, und die dritte für das Experiment 5 überlassen.

In der ersten Portion wurde die starke, Follikelzellmasse disperrierende Fähigkeit des frischen Samenextraktes mittels zweier Eier (TE 456 u. 460) ebenso wie beim Experiment 2 festgestellt. Die Schnittuntersuchung der so behandelten Eier ergab folgende Befunde. Wie im Experiment 2 besteht die Corona radiata aus reinen Kernen, indem das Zytoplasma ganz aufgelöst worden ist. Die Eihülle ist ebenfalls als eine dünne Haut erhalten geblieben. Während die Eichromosomen bei TE 456

unterhalb des ersten Richtungskörpers im frühen Anaphasestadium der zweiten Reifungsteilung sich befinden, ist der Chromosomenkomplex bei TE 460 überraschenderweise im Zentrum der Eizelle ganz zerfallen, so daß die einzelnen Chromosomen im Zytoplasma zerstreut liegen (Taf. 20, Abb. 7). Somit wurde die starke Auflösungskraft des frischen Samenextraktes wieder festgestellt.

In der gekochten Portion desselben Samenextraktes hingegen blieb die Follikelzellmasse bei TE 459 sogar 8 Stunden lang ohne Dispersion. Im Schnitt zeigen die Coronazellen eine beträchtliche Degeneration, indem sie teils, mit Eisenhämatoxylin außerordentlich tief gefärbt, teils vakuolisiert sind (Taf. 20, Abb. 8). Die Eihülle ist noch ziemlich dick; die Eizelle und der erste Richtungskörper füllen sich den Innenraum der Eihülle. Die Chromosomen in der Eizelle und im ersten Richtungskörper sind schon klumperig. Im Eizytoplasma findet man eine Unzahl der tiefgefärbten Körnchen. Trotzdem sind etwaige auflösende Wirkungen des gekochten Samenextraktes weder außerhalb noch innerhalb der Eizelle zu erkennen.

Aus diesen zweierlei Versuchen mit gekochtem Samenextrakt in Verbindung mit einem Kontrollversuche ergibt sich, daß sowohl die auf die Follikelzellmasse dispersierend und die auf die Corona radiata und die Eizelle mehr oder weniger auflösend wirkenden Substanzen im Samenextrakt durch das Kochen auf dem Wasserbad vollkommen inaktiviert wird.

5. Wirkungen des mit Kaolin behandelten Samenextraktes

Der dritten Portion des Samenextraktes beim vorigen Experiment wurde ein Drittel Volumen Kaolin zugesetzt; das Gemisch wurde 3 Stunden lang mittels einer Schüttelmaschine stark geschüttelt und 1 Stunde lang zentrifugiert. In so behandeltem Samenextrakt wurden 2 Eier (TE 457 u. 458) übertragen und bei 37°C gehalten. 15 Minuten darauf wurde gefunden, daß jedes Ei von seiner Follikelzellmasse befreit war. Auffallend war jedoch, daß die Dispersion der Follikelzellmasse nicht so weit erfolgte wie bei TE 456 und 460 beim Experiment 4; selbst 30 Minuten nach dem Zusatz des Extraktes blieben die Teilchen der dispersierten Follikelzellmassen viel gröber (Tafel 19, Abb. 5).

Nach diesem Befund läßt sich bezüglich der Follikelzellmasse dispersierenden Fähigkeit des Samenextraktes feststellen, daß sie durch mit Kaolin gewissermaßen adsorbierbare Substanzen ausgeübt wird. Das immer noch erhaltene Dispersionsvermögen des Samenextraktes hierbei beruht whol auf den wenigen Potentialunterschied zwischen dem Adsorbens und hier in Frage gezogenen Substanzen.

Auf den Schnitten der beiden Eier TE 457 und 458, die nach 9 stündigem Verweilen im Samenextrakt ins BOUINS Gemisch übertragen

wurden, ist die Corona radiata aus reinen Kernen zusammengesetzt. Merkwürdigerweise ist hier die Eihülle spurlos aufgelöst. Während die Chromosomen im ersten Richtungskörper klumperig sind, zeigen sie in der Eizelle die beginnende Anaphase der zweiten Reifungsteilung (Taf. 20, Abb. 9 u. 10).

IV. Besprechung der Ergebnisse

Aus den Beschreibungen der obigen Experimente ist in erster Linie zu betonen, daß die auf die Follikelzellmasse und die Coronazellen des Kanincheneies ablösend wirksamen Substanzen sich durch Extraktion mit Tyrodelösung aus den Kaninchenspermatozoen isolieren lassen. Dies bestätigt und ergänzt die Ergebnisse in der ersten Mitteilung, bei der die ablösenden Wirkungen der Spermatozoen auf die Follikelzellmasse und die Coronazellen durch Besamungsversuche sowohl *in vivo* als auch *in vitro* festgestellt wurden und dabei die chemische Wirkung als Hauptfaktor und die physikalische Wirkung als Nebenfaktor zu betrachten war. Hervorzuheben ist nun, daß die betreffenden chemischen Substanzen im Samenextrakt in sehr hoher Konzentration enthalten sind. Sie greifen nämlich das Zytoplasma der Coronazellen so stark an, daß die Corona radiata nur aus einer Kernreihe besteht, was bei den Besamungsversuchen in der vorigen Mitteilung nicht vorkam. Infolge hoher Konzentration dieser Substanzen im Samenextrakt beschränken sich ihre Wirkungen nicht auf die Follikelzellmasse und die Corona radiata; sie diffundieren nämlich durch die Eihülle und die Zellhaut des Eies und üben auflösende Wirkungen auf die Eizelle aus. Bei den obigen Experimenten war jedoch auffällig, daß die Auflösungsleistung des Samenextraktes sowohl quantitativ als auch qualitativ starken Schwankungen unterworfen war. Im frischen Samenextrakt zeigte die Eizelle entweder eine ausgesprochene Zytolyse (Exp. 2, TE 383–386) oder das Zerfallen des Chromosomenkomplexes (Exp. 4, b, TE 460). Im konservierten Extrakt erwies sich aber eine Eizelle so lebhaftes Zytoplasmateilungen wie bei der Furchung des befruchteten Eies; ihre Chromosomen befanden sich in der späten Anapase der zweiten Reifungsteilung (Exp. 3, TE 395). Über die Ursache dieser Schwankungen läßt sich vorderhand nichts Sicheres aussagen. In Erwägung zu ziehen ist vielleicht die Möglichkeit, daß die auflösende Kraft des frischen Samenextraktes durch Konservierung dermaßen abgeschwächt wurde, daß es auf die Eizelle aktivierend wirken konnte. Es kam jedoch vor, daß selbst das mit Kaolin behandelte, deshalb schwach zu wirkende Samenextrakt die Eihülle spurlos aufgelöst hatte, ohne Chromosomenkomplex anzugreifen (Exp. 5, TE 456 u. 457). Diese Verhältnisse scheinen daher viel komplizierter zu sein.

Trotz dieser Mannigfaltigkeit der Wirkungsweise des Samenextraktes auf die Eizelle und ihre Ausrüstungen ist der Chemismus hier

prinzipiell ein und derselbe. Die Follikelzellmasse zur Dispersion führenden Substanzen wirken auf die interzellularen Substanzen oder auf das Protoplasma der Coronazellen auflösend, so daß diese von der Eihülle sich mechanisch leicht beseitigen lassen. In den stärkeren Dosen wird aber das Zytoplasma vollkommen aufgelöst, so daß die Corona radiata nur als eine Kernreihe auftritt. Alle Reaktionen der Eizelle auf das Samenextrakt lassen sich auch der Auflösung ihres Zytoplasmas zurückführen. Eine ausgeprägte Zytolyse und das Zerfallen des Chromosomenkomplexes sind Folgeerscheinungen bei den starken Dosen der in Frage stehenden Substanzen. Lebhaftes Plasma- und Kernteilung wie bei TE 395 im Experiment 3 zeigen wahrscheinlich eine mäßige Auflösung des Eizytoplasmas bei optimaler Dosis; die dadurch verursachte Viskositätsabnahme und Oberflächenspannungszunahme können vielleicht die Zellaktivität erleichtern, eine Auffassung, welche jedoch erst zu prüfen sein wird.

Die beiden Ergebnisse, daß die chemisch wirksamen Substanzen im Samenextrakt nicht thermostabil sind (Exp. 4) und durch Adsorbierung mit Kaolin ihre Dispersionsleistung für die Follikelzellmasse mehr oder weniger abgeschwächt wird (Exp. 5), zeigen ferner, daß es sich hier um fermentative Wirkungen handelt. Und da die darauf reagierenden Substanzen sowohl der Eizelle als auch ihrer Ausrüstungen Eiweißkörper sind und der pH-Wert der als Reaktionsmedium hier benutzten Tyrodelösung bei 7,7 liegt, so läßt sich schließen, daß die hier in Frage stehenden Substanzen Tryptasen sein müssen.

Wenn wir auch von der Frage absehen, ob diese Substanzen wirklich Tryptasen sind, imponiert uns vor allem die Tatsache, daß das Spermatozoon bestimmte, leicht extrahierbare Substanzen enthält, die imstande sind, das Protoplasma sowohl der Eizelle, der Follikelzellen und der Coronazellen als auch die Eihülle aufzulösen. Es ist daher leicht anzunehmen, daß das Spermatozoon bei der Befruchtung diese Substanzen in die Eizelle mit sich bringt. Sollte das Eizytoplasma auf diese Substanzen auch bei der normalen Befruchtung reagieren, so haben wir die Hoffnung die Kräfte des Spermatozoons, die die Eizelle zur Bildung des zweiten Richtungskörpers¹⁾ und zur Furchung aktivieren, experimentell zu erfassen.

In dieser Hinsicht interessiert uns besonders der in PINCUS' Experiment zutage geförderte überraschende Befund, daß das Kaninchenei *in vitro* leicht geneigt ist, „parthenogenetisch“ zu entwickeln (PINCUS 1930). Bei der Kultivierung der unbefruchteten Kanincheneier im Medium, welches aus Kaninchenplasma und Extrakt von Hühnerembryonen bestand, ergab sich nämlich, daß unter 213 Eiern 136 d.h. 63.8 proz. der

1) Die Abhängigkeit der Bildung des zweiten Richtungskörpers vom Eindringen des Spermatozoons in die Eizelle habe ich schon mitgeteilt (YAMANE 1930). Näheres darüber soll jedoch in der anderen Abhandlungen behandelt werden.

„Furchung“ unterworfen waren. Ein 37 Stunden nach steriler Kopulation gewonnenes Ei zeigte z.B. nach 6 stündiger Kultivierung schon etwa 36 Furchungszellen, was eine große Geschwindigkeit der Zellteilung andeutet. Wenn auch PINCUS diese parthenogenetische Furchung dem autonomen Entwicklungsvermögen des Eies zurückzuführen scheint, da er auf das Alter des Eies ein großes Gewicht legte, ist der Einfluß des Embryonalextraktes meines Erachtens auch ins Betracht zu ziehen, denn das Embryonalextrakt kann als eine Enzymenlösung betrachtet werden und könnte nicht nur als reine Nährstoffe sondern auch als zytolytische Stoffe für die kultivierten Eier dienen.

V. Zusammenfassung

Die vorliegenden Experimente wurden vorgenommen, um die Follikelzellmasse des Kanincheneies zur Dispersion führenden Substanzen aus den Spermatozoen zu isolieren; ferner um die Reaktionsfähigkeit der Eizelle, der Eihülle und der Coronazellen auf diese Substanzen zu prüfen. Die Ergebnisse waren folgende:

1. Die mit Toluol abgetöteten Spermatozoen können die Follikelzellmasse dispersieren und auf die Corona radiata ablösend wirken ebenso wie die lebhaft bewegenden Spermatozoen. Dies weist schon darauf hin, daß die chemische Wirkung der Spermatozoen hierbei die Hauptrolle spielt.

2. Die Follikelzellmasse zur Dispersion führenden Substanzen lassen sich mit Tyrodelösung ohne weiteres aus den Spermatozoen extrahieren.

3. Sie sind im Samenextrakt in so hoher Konzentration enthalten, daß ihre Wirkungen auf das Ei viel stärker zutage treten als bei der Besamung mit Spermasuspension.

4. Die Reaktionen des Eies auf diese Substanzen offenbaren sich sehr verschiedentlich: Dispersion der Follikelzellmasse, Ablösung der Coronazellen, Auflösung der Eihülle, lebhaftes Zytoplasma- und Kernteilung in der unbesamten Eizelle, das Zurücktreten der Eichromosomen von der Peripherie nach dem Zentrum des Zytoplasmas, das Zerfallen des Chromosomenkomplexes usw.

5. Diese Reaktionen sind jedoch prinzipiell gleich und lassen sich der Auflösung des Zytoplasmas zurückführen. Je nach der Stärke des Samenextraktes zeigt die Eizelle bald Zytolyse bald Zytoplasma- und Kernteilung.

6. Die in Frage stehenden Substanzen des Samenextraktes sind beim pH-Wert 7,7 leistungsfähig, wenigstens 6 Tage lang bei 5°C aufbewahrbar; sie werden jedoch durch Kaolin gewissermaßen adsorbiert und durch das Kochen vollständig inaktiviert.

7. Diese Eigenschaften deuten darauf an, daß sie Tryptasen sein müssen, was aber auf chemischem Wege noch prüfungsbedürftig ist.

VI. Literatur

- Pincus, G., Observations on the living eggs of the rabbit. Proc. Roy. Soc., B, Vol. 107, 1930.
- Yamane, J. u. Egashira, T., On the relation of copulation to ovulation in the rabbit as shown by means of artificial insemination. Jour. Jap. Soc. Veter. Science, Vol. 4, No. 2, 1925.
- Yamane, J. u. Kato, K., Über die Befruchtungsfähigkeit der in der mit Phosphat gepufferten Dextroselösung konservierten Spermatozoen beim Kaninchen. Biol. Zentralbl. Bd. 48, Hft. 8, 1928.
- Yamane, J., The proteolytic action of mammalian spermatozoa and its bearing upon the second maturation division of ova. Cytologia, Vol. 1, No. 4. 1930.
- Yamane, J., Kausal-analytische Studien über die Befruchtung des Kanincheneies. I. Die Dispersion der Follikelzellen und die Ablösung der Zellen der Corona radiata des Eies durch Spermatozoen. Cytologia, Bd. 6, Nr. 2/3, 1935.

VII. Tafelerklärung

Tafel 19 (Abb. 1-5)

Optische Schnittbilder der unbefruchteten Kanincheneier bei den Lebendbeobachtungen nach Behandlung mit dem Samenextrakt.

- Abb. 1. Zwei unbesamte Tubeneier (TE 379 u. 380) in einer Suspension der mit Toluol abgetöteten Spermatozoen (Exp. 1). Die Follikelzellmasse ist zum größten Teil disperiert; nur einige Schichten der Granulosazellen und die Corona radiata ist erhalten geblieben. Man sieht in der Umgebung der Eier vereinzelte oder geklumperte Spermatozoen. Vergr. 166×.
- Abb. 2. Zwei unbesamte Tubeneier (TE 383 u. 384) in einem Samenextrakt (Exp. 2). Die Follikelzellmasse ist vollständig dispersiert; durch Auflösung des Zytoplasmas besteht die Corona radiata aus reinen Kernen; Erhellung der Coronazellen und Deformierung der Eizelle zeigen die starke proteolytische Wirkung des Samenextraktes (vgl. mit Abb. 1). Vergr. 166×.
- Abb. 3. Ein unbesamtes Tubenei (TE 385) in demselben Samenextrakt wie bei Abb. 2 (Exp. 2). Die Coronazellen sind nach Einwirkung des Samenextraktes mit Haarschlinge abgebürstet, um die Zytolyse der Eizelle hervorzubringen. Vergr. 166×.
- Abb. 4. Vollkommene Disperison der Follikelzellmasse durch das 6 Tage lang im Eisschrank aufbewahrte Samenextrakt (Exp. 3, TE 391). Auf die disperierten bezw. an den Boden eines Objektträgers niedergeschlagenen Follikelzellen eingestellt. Vergr. 50×.
- Abb. 5. Dispersion der Follikelzellmasse durch das mit Kaolin behandelte Samenextrakt (Exp. 5, TE 457); die gröbere Dispersität der Follikelzellen ist deutlich erkennbar (vgl. mit Abb. 4). Vergr. 50×.

Tafel 20 (Abb. 6-10)

Schnittbilder der unbefruchten Kanincheneier nach Behandlung mit dem Samenextrakt. Fixierung: BOUINS Gemisch. Färbung: HEIDENHAINS Eisenhämatoxylinlösung. Paraffinschnitt: 5µ dick.

- Abb. 6. Ein Ei nach 3 stündigem Einwirkung des 6 Tage lang bei 5°C aufbewahrten Samenextraktes (Exp. 3, TE 395). Die Coronazellen haben schon zum größten Teil ihr Zytoplasma verloren. Die Eihülle ist sehr dünn. Im perivitellinen Raum liegen die Zytoplasmakügelchen von verschiedener Größe in dichtem Andrang; mitten oben auch Fragmente des ersten Richtungskörpers sind zu finden. Die Chromosomen der Eizelle befinden sich im späten Anaphasestadium der zweiten Reifungsteilung, und zwar im Zentrum des Eizytoplasmas, was bei der normalen Reifungsteilung nicht vorkommt. Vergr. 325×.

Yamane: Kausal-analytische Studien über die Befruchtung des Kanincheneies. II

Yamane: Kausal-analytische Studien über die Befruchtung des Kanincheneies. II

- Abb. 7. Ein Ei nach 8 stündigem Einwirkung des frischen Samenextraktes (Exp. 4, b, TE 460). Durch Auflösung des Zytoplasmas stellt die Corona radiata einen reinen Kernkranz dar. Einzelne Chromosomen legen sich ganz zerstreut im Zentrum des Eizytoplasmas; sie färben sich sehr schwach. Vergr. 550 $\times$.
- Abb. 8. Ein Ei nach 8 stündigem Einwirkung des durch Kochen inaktivierten Samenextraktes (Exp. 4, b, TE 459). Die Follikelzellmasse, die noch in beträchtlichem Maße vorhanden sind, zeigen eine ausgesprochene Autolyse, indem sie teils tief gefärbt teils vakuolisiert sind. Die Eihülle ist sehr dick. Links im perivitellinen Raum sieht man den ersten Richtungskörper, der auch autolysiert ist. Trotzdem ist der auflösende Einfluß des Samenextraktes nirgends zu finden. Vergr. 325 $\times$.
- Abb. 9. Dasselbe Ei (TE 457) wie in Abb. 5, welches nach 2 stündigem Einwirkung des mit Kaolin behandelten Samenextraktes fixiert wurde (Exp. 5). Die Corona radiata besteht aus reinen Kernen; die Eihülle ist spurlos verschwunden. Dagegen sind der erste Richtungskörper und die zweite Polarspindel intakt geblieben. Vergr. 325 $\times$.
- Abb. 10. Derselbe Schnitt bei stärkerer Vergrößerung. Die vollständige Auflösung der Eihülle und die beginnende Anaphase der zweiten Reifungsteilung sind deutlich nachweisbar. Vergr. 1,100 $\times$.
-