

STATISTISCHE AFDELING

Rapport S.35

door
Ph.v.Elteren, J.Hemelrijk
en J. Sparenberg.

Verslag van de uitwerking van gegevens
over de regeneratiesnelheid van poliepen.

1. Inleiding.

Het materiaal, dat onderzocht werd, werd in Maart en April 1949 door Dr H.A.L. Trampusch c.s. verzameld; het bestond uit een aantal kolonies van Tubularia, een bepaald soort poliepen, afkomstig uit de Golf van Napels. De verschillende kolonies zijn in het verslag onderscheiden door middel van Romeinse cijfers. De dieren werden dagelijks vers uit zee aangevoerd en zo geselecteerd, dat voor de proeven onvertakte dieren met zo min mogelijk parasieten en van ongeveer gelijke dikte gebruikt werden. Van de dieren werd de kop afgesneden in het milieu waarin men de regeneratiesnelheid wilde onderzoeken. De afsnijplaats lag op 1, 3 en 5 mm van de hals (aan te duiden met 1, 3 of 5 achter het kolonienummer); aan het andere uiteinde, 8 mm van de afsnijplaats, werden de dieren afgesnoerd of afgeschroeid. De dieren werden daarna in bedoeld milieu, bij constante temperaturen (17° of 22°) op een aantal achtereenvolgende tijdstippen, meestal met 9 à 15 uur tussenuitruimte, waargenomen. In het regeneratieproces werden vier stadia onderscheiden, op ieder waarnemingstijdstip werd in de protocollen geregistreerd in welk regeneratiestadium de dieren toen verkeerden.

De voorkomende milieus waren:

- 1^o "Zuiver" zeewater; (aan te duiden met: contrôle) bij 17° en 22°
- 2^o Oplossingen in zeewater van
 - a) Pyocyanine in de concentraties: $5 \cdot 10^{-6}\%$, $7,5 \cdot 10^{-6}\%$, $10^{-5}\%$, $10^{-4}\%$ en $3 \cdot 10^{-4}\%$; alléén bij 17°
 - b) Lithiumchloride(LiCl) in de concentraties: 0,004N, 0,006N, 0,008N bij 17° én bij 22° .
 - c) Methyleenblauw in de concentraties: $2,5 \cdot 10^{-4}\%$; $3,75 \cdot 10^{-4}\%$ bij 17° en: $5 \cdot 10^{-4}\%$; $7,5 \cdot 10^{-4}\%$; $10^{-3}\%$ bij 17° en 22° .

Iedere kolonie werd in een aantal groepen gesplitst, waarvan er steeds enige voor "contrôle"-proeven en de rest voor oplossingsproeven werden gebruikt, zodat iedere op-

lossingsproef vergeleken kan worden met een controleproef, onder overigens gelijke omstandigheden, in dezelfde kolonie.

De opgave ^{voor} van het Mathematisch Centrum was om aan de hand van deze waarnemingsresultaten te onderzoeken, of de opgeloste stoffen in de verschillende concentraties invloed hadden op het regeneratieproces, en zo ja, welke invloed.

2. Onderzoek van enkele grote controlegroepen.

2.1 Bij de eerste voorlopige bewerking van het materiaal werd getracht een beeld te verkrijgen van de duur der verschillende regeneratie-stadia. Hiertoe werden gedefinieerd de tijden t_1 , t_2 , t_3 en t_4 , en wel t_1 als de tijd van de aanvang der proef tot het begin van het eerste regeneratiestadium, t_2 van de aanvang der proef tot het begin van het tweede stadium, t_3 van de aanvang tot het begin van het derde stadium en t_4 van de aanvang der proef tot het einde van het regeneratieproces.

Bij de bepaling van de t_1 werden de volgende regels in acht genomen:

- a) Als een poliep in een bepaald interval tussen twee waarnemingen van een lager stadium op het i^e stadium overging, werd voor t_1 het midden van dat interval gekozen
- b) Buiten beschouwing werden gelaten polipen, die in het geheel niet regeneerden, die het laatste stadium niet bereikten, of die tijdens de regeneratie resorptie vertoonden. Dieren, die na een normale volledige regeneratie resorptie vertoonden, werden echter wel meegeteld.

2.2 De tijden t_1 werden bepaald bij de polipen van:

Kolonie X, controle-series A, B, C, D, E, F	22°	1, 3 en 5 mm
" IX, de beide controle-series	17°	1 en 3mm
" VIII, controle-serie	17°	5mm

Kolonie X werd gekozen omdat hierbij de controle-proeven zijn gedaan met grote aantallen dieren, die vaak werden waargenomen. Van alle controle-proeven gedaan bij 17°, zijn die van kolonie VIII en IX nog het meest geschikt.

Vervolgens werden de gemiddelden en de spreidingen van de t_1 over elk dezer series bepaald. Bij kolonie X werden de series A en B, de series C en D en de series E en F samengenomen omdat deze uit dieren in volkomen gelijke omstandigheden bestonden. Het resultaat van deze berekeningen vindt men in bijlage I.

Om een beeld te krijgen van de verdelingen van t_1 en t_4

werd voor het maken van een grafiek bij de series van kolonie X de t-as verdeeld in intervallen van 4 of 6 uur. In de middens van deze intervallen werd dan het aantal van de dieren, waarvan t_1 resp. t_4 in dat interval lag, verticaal uitgezet. Men vindt de resultaten in de grafieken van bijlage II; het verloop blijkt onregelmatig te zijn met grote spreiding.

Het maken van grafische voorstellingen werd beperkt tot t_1 en t_4 omdat deze betrekking hebben op de belangrijkste stadia van het regeneratieproces, en redelijkerwijze verwacht kan worden, dat de verdelingen van t_2 en t_3 hetzelfde onregelmatige beeld vertonen.

Past men op het verschil van de gemiddelden de toets van Student toe (hoewel de eis van normaliteit ¹⁾ niet vervuld is), dan vindt men sterk significante verschillen (orde 0,001) tussen de gemiddelden van t_1 (en evenzo die van t_2) bij de groepen met verschillende afsnijlengten van kolonie X, en zelfs nog tussen de gemiddelden van t_1 (en evenzo die van t_2) bij IX 1 en 3mm. De significantie is zo sterk, dat men, ondanks de onregelmatigheid van de verdelingen, nog wel kan concluderen dat, naarmate de dieren verder van de hals worden afgesneden, de beide eerste stadia van de regeneratie vertraagd worden. De invloed op t_3 en t_4 is aanzienlijk minder duidelijk.

Op grond hiervan mocht verwacht worden dat de gemiddelde t_1 bij VIII 5 contrôle, groter was dan dit gemiddelde bij IX 1 en 3 contrôle. Aangezien dit echter niet het geval is, en zelfs het gemiddelde van t_1 bij IX 3 volgens de toets van Student significant groter is dan bij VIII 5, blijkt dat er grote verschillen bestaan tussen de regeneratiesnelheden van de poliepen van verschillende kolonies in hetzelfde milieu. Daardoor is het bij de belangrijkste door ons gebruikte toetsmethode (zie punt 5) niet mogelijk overeenkomstige series van verschillende kolonies samen te nemen.

2.3 Vervolgens werden de verhoudingen $\frac{t_1}{t_4}$, $\frac{t_2}{t_4}$ en $\frac{t_3}{t_4}$ bepaald bij de series X: A+B, C+D, E+F en bij de ⁴contrôleseries van kolonie VIII.

Deze verhoudingen werden bepaald omdat verwacht kan worden dat de verdelingen van de t_1 onderling analoge onregelmatigheden zullen vertonen (Als t_1 groot is, zullen in het algemeen ook t_2 , t_3 en t_4 groot zijn) waardoor de verdelingen van de verhoudingen $\frac{t_i}{t_4}$ regelmatig en minder gespreid zullen zijn

1) Met "normaliteit" van een variabele wordt bedoeld, dat de variabele verdeeld is volgens de zgn. "foutencurve van Gauss".

dan die van de t_1 zelf.

Van de verkregen verhoudingen werden gemiddelden en spreidingen bepaald. Eveneens werden grafische voorstellingen gemaakt van de verdelingen van $\frac{t_1}{t_4}$ op analoge wijze als bij de t_1 . Hier werden intervallen gekozen ter grootte van 0.1. De resultaten vindt men in de bijlagen I en III. (Grafieken alleen bij de series van X).

De spreidingen zijn hier relatief geringe^z, dan bij de t_1 zelf. Bovendien vertonen de grafiekjes in verscheidene gevallen ongeveer het karakter van een normale verdeling. Om deze normaliteit nader te onderzoeken werd een toets ¹⁾ toegepast, die neerkomt op een vergelijking van a , het gestandaardiseerde absolute eerste moment (dat een maat is voor de welving van de kromme) en g_1 , het gestandaardiseerde derde moment (dat een maat is voor de scheefheid) met de overeenkomstige grootheden van een normale verdeling.

Men vindt in de tabel van bijlage I, a , g_1 , en de voorspellingsintervallen met onbetrouwbaarheidsdrempel 0.1 van a , $I_{(0.1)}(a)$, en met onbetrouwbaarheidsdrempel 0.05 van g_1 , $I_{(0.05)}(g_1)$. (Toelichting zie bijlage I).

Het een en ander werd gedaan bij de $\frac{t_1}{t_4}$ en de $\frac{t_2}{t_4}$ van de series van Kolonie X. ($\frac{t_3}{t_4}$ niet, omdat de verdelingen hiervan duidelijk scheef zijn, hetgeen te verwachten was; t_3 ligt namelijk dicht bij t_4 , doch kan nooit groter worden dan t_4). Er blijkt nu dat a , bij alle onderzochte gevallen binnen, of op de grens van $I_{(0.1)}(a)$ valt en g_1 binnen $I_{(0.05)}(g_1)$. (In de gebruikte tabellen ontbraken de grenzen van $I_{(0.1)}(g_1)$). Mede in verband met het karakter van de grafieken van bijlage III, kan men uit deze berekeningen concluderen, dat de verdelingen van $\frac{t_1}{t_4}$ en $\frac{t_2}{t_4}$ niet veel van een normale verdeling afwijken.

Wij kunnen hier dus met meer recht dan bij de t_1 het geval was, de toets van Student toepassen op het verschil der gemiddelden. Deze toets geeft hier de volgende resultaten:

¹⁾ Zie R.C. Geary and E.S. Pearson, Tests of normality, Biometrika Office University College, London (1938).

	t ¹⁾	aantal vrijheids- graden	overschrij- dingskans ²⁾
$(\frac{t_1}{t_4})_1$ mm met $(\frac{t_1}{t_4})_3$ mm	5.4	82	$\ll 0.01$
$(\frac{t_1}{t_4})_3$ mm met $(\frac{t_1}{t_4})_5$ mm	4.6	93	$\ll 0.01$
$(\frac{t_2}{t_4})_1$ mm met $(\frac{t_2}{t_4})_3$ mm	3.1	82	$\ll 0.01$
$(\frac{t_2}{t_4})_3$ mm met $(\frac{t_2}{t_4})_5$ mm	4.2	100	$\ll 0.01$

Men ziet dat genoemde verschillen alle significant zijn en kan dus uit de gegevens concluderen, dat althans voor kolonie X, de verhoudingen $\frac{t_1}{t_4}$ en $\frac{t_2}{t_4}$ toenemen naarmate de dieren verder van de hals werden afgesneden. Dit betekent, dat de beide eerste stadia relatief gevoeliger zijn in dit opzicht, dan het 4^o stadium. Dit correspondeert met de conclusie uit 2.2, ~~pg. 3~~ pg. 3

3. Opmerkingen over het verdere onderzoek

Bij het onderzoek naar de invloed van de verschillende opgeloste stoffen op het regeneratieproces, werd verder alleén het eerste stadium beschouwd. Dit werd gedaan om de volgende redenen:

1^o In punt 2 is gebleken, dat, wat betreft de invloed van de afsnijplaats, dit stadium het gevoeligst is. Het is niet onredelijk om aan te nemen, dat dit ook het geval zal zijn met de invloed van het milieu.

2^o Van de aanvang der regeneratie af tot het eerste stadium

¹⁾ t is de grootte, waarop de toets van Student berust; t is afhankelijk van de gemiddelden en spreidingen van de beide tevergelijken waarnemingsseries. Zie b.v. Fisher, Statistical methods for researchworkers, Edinburgh (1948) pg. 119.

²⁾ Dit is de kans, dat het verschil tussen de gemiddelden van twee steekproeven uit eenzelfde normale verdeling gelijk is aan, of groter is dan het verschil der gemiddelden van de waarnemingsresultaten. Deze kans is in tabellen te vinden als t en het aantal vrijheidsgraden bekend zijn. Zie ^{b.v.} Fisher, Statistical methods for research-Edinburgh (1948) pg. 174.

is het grootste aantal waarnemingen beschikbaar. Door de grote intervallen tussen de waarnemingstijdstippen zijn bij de meeste dieren niet alle stadia afzonderlijk waargenomen. Bovendien zijn tijdens de waarnemingsperiode, de hogere stadia vaak niet bereikt.

3^o Bewerking van de andere stadia zou extra veel tijd vergen terwijl bij ruwe beschouwing blijkt, dat de invloed van de verschillende milieus op deze stadia hoewel zwakker, dezelfde lijn vertoont als de invloed op het eerste stadium.

4. Onderzoek met de tekentoets

4.1 Inleiding

Een overzicht van het gehele materiaal is verkregen met behulp van de tekentoets ¹⁾. Deze toets is minder scherp dan de in punt 5 gebruikte toets van Wilcoxon. Zij eist echter veel minder tijd en stelt ons in staat een overzicht over het gehele materiaal te verkrijgen, zodat de toets van Wilcoxon alleen op enkele kritieke punten gebruikt behoeft te worden. Hierdoor werd een grote tijdsbesparing bereikt.

De toets berust op paarsgewijze vergelijking van dieren uit een bepaalde oplossingsgroep, met dieren uit een contrôlegroep, waarmee zij verder in alle opzichten (kolonie, afsnijplaats, temperatuur) overeenstemden. Deze vergelijking vond zo plaats, dat aan ieder dier uit de contrôlegroep, slechts één dier uit de oplossingsgroep (het dier, dat in de protocollen hetzelfde nummer droeg) werd toegevoegd.

Bereikte een dier uit de oplossingsgroep het 1^o stadium in een waarnemingsinterval, dat geheel lag vóór het interval waarin zijn "partner" uit de contrôlegroep dit stadium bereikte, dan werd aan dit paar een plus-teken toegekend. Was juist het tegengestelde het geval, dan werd een min-teken toegekend. Vielen de beide intervallen precies over elkaar, dan werd het paar half plus en half minus geteld. Trad bij beide vergeleken dieren geen regeneratie op, binnen de waarnemingsperiode, dan werd het paar buiten ~~de~~ beschouwing gelaten. De tekent^{oets} blijft op de overgebleven paren toepasbaar. Dan bleef nog een groot aantal gevallen over, tengevolge van het feit, dat zeer

¹⁾ Zie W.J. Dixon and A.M. Mood, The statistical sightest, Journ.Am.Stat.Ass. 41 (1946) p. 557

vaak de waarnemingstijdstippen bij de controle-groep niet samenvielen met de waarnemingstijdstippen bij de oplossingsgroep. Hierdoor is het mogelijk dat twee te vergelijken dieren het eerste stadium bereiken in intervallen, die elkaar gedeeltelijk overdekken. In deze gevallen werd aangenomen dat de mogelijke overgangstijdstippen homogeen verdeeld waren over het gehele interval en op grond hiervan werd de kans uitgerekend dat het dier uit de oplossingsgroep vóór was op het dier uit de controle-groep. Is deze kans p , dan werd het bewuste paar voor de fractie p plus en voor de fractie $1-p$ minus geteld.

4.2 De resultaten van deze toets vindt men in de bijlagen IV en V. Men vindt in de kolom: "Aantal" het totale aantal vergeleken paren; dit hoeft niet gelijk te zijn aan de som van de beide onder "Uitslag" vermelde aantallen, omdat in bepaalde gevallen paren buiten beschouwing gelaten werden (zie 4.1)

In de kolom "uitslag" werd onder "+" vermeld het aantal paren, waarbij het dier uit de "oplossingsgroep" sneller regeneerde dan het dier uit de "controlegroep", onder "-" werd vermeld het aantal paren waarmee het tegene~~er~~gestelde het geval was. Sommige paren werden gedeeltelijk "+", gedeeltelijk "-" geteld, (zie 4.1), hierdoor traden in de uitkomsten breuken op; de totale uitkomst werd steeds tot op halve eenheden afgerond.

In de kolom "significantie (tekentoets)" werd opgegeven in welke richting het resultaat van de proef lag ("+" = opgeloste stof werkte bevorderend, "-" = opgeloste stof werkte remmend), met vermelding van de overschrijdingskans berekend volgens de tekentoets; (niet significant betekent: overschrijdingskans $\gg 0.05$).

De betekenis van de laatste kolom komt in punt 5 ter sprake.

4.3 Conclusie:

Men ziet dat Pyocyanine in de concentraties:
 $5 \cdot 10^{-6}\%$, $7.5 \cdot 10^{-6}\%$, $10^{-5}\%$ en $10^{-4}\%$ in geen enkel

geval een significante invloed heeft. Wel treedt bij de concentratie $3 \cdot 10^{-4}\%$ in één van de onderzochte gevallen een significante remming op. De andere resultaten wettigen ook het vermoeden, dat pyocyani~~ne~~^{de} in deze concentraties remmend werkt; dit is derhalve nader onderzocht met de toets van Wilcoxon ¹⁾ (zie punt 5)

Lithiumchloride vertoont bij 17° hetzelfde beeld: lagere concentraties (0.004 N en 0.006 N) geen significante effect. Bij 0.008 N in één geval significante remming. Andere resultaten liggen niet overal in dezelfde richting. Deze concentratie is ook nader onderzocht in 5.

Bij 22° schijnt LiCl in de hogere concentraties bevorderend te werken, hetgeen eveneens in 5 nader onderzocht is.

Methyleenblauw begint bij 17° , vanaf de concentratie $7.5 \cdot 10^{-4}\%$ bevorderend te werken. In de concentratie $10^{-3}\%$ is dat effect significant (eveneens nader onderzocht in 5)

Bij 22° is in de resultaten geen duidelijke lijn; nergens treedt significantie op, en de effecten van verschillende proeven in dezelfde omstandigheden zijn vaak tegengesteld. De hoogste concentraties zijn hier nader onderzocht met de toets van Wilcoxon ¹⁾

5. Onderzoek met de toets van Wilcoxon

5.1 Inleiding

Op punten, waar daartoe aanleiding bestond, werd het materiaal nader onderzocht met de reeds

¹⁾ Zie: F. Wilcoxon, Individual comparisons by ranking methods, Biometrics 1 (1945) p. 80-82 en H.B. Mann and D.R. Whitney, On a test of whether one of two variables is stochastically larger than the other, Ann.Math.Stat. 18 (1947) p. 50-60.

meer genoemde toets van Wilcoxon. Hierbij wordt ieder dier van de ene groep vergeleken met ieder dier uit de andere groep.

Een voldoende voorwaarde voor de toepasbaarheid van deze toets is: indien een bepaalde stof het regeneratieproces bij poliep A in een bepaalde richting beïnvloedt doet zij dit bij géén andere poliep B (uit dezelfde kolonie) in tegengestelde richting. Volgens de opdrachtgever was deze veronderstelling op biologische gronden inderdaad gerechtvaardigd.

In principe verloopt de toets als volgt:

Men heeft n waarnemingen (x_1, \dots, x_n) van de stochastische variabele \underline{x} en m waarnemingen (y_1, \dots, y_m) van \underline{y} . Er zijn zodoende mn vergelijkingen te treffen (iedere x_i met iedere y_k). Men toetst de hypothese dat \underline{x} stochastisch gelijk is aan \underline{y} , d.w.z. dat \underline{x} en \underline{y} dezelfde verdeling hebben. In dat geval zijn alle permutaties van $(x_1, \dots, x_n, y_1, \dots, y_m)$ even waarschijnlijk. Op grond hiervan kan men het gemiddelde en de spreiding berekenen van het aantal paren, waarbij $x_i > y_k$ is: deze blijken resp.:

$$\mu = \frac{mn}{2} \quad \text{en} \quad \sigma = \frac{1}{\sqrt{12}} \sqrt{mn(m+n+1)} \quad \text{te zijn.}$$

Men bepaalt uit het waarnemingsmateriaal het werkelijk aantal paren n_1 , waarbij $x_i > y_k$ is en berekent:

$$\underline{u} = \frac{n_1 - \mu}{\sigma} \dots$$

\underline{u} heeft op grond van bovengenoemde hypothesen een bepaalde verdeling, welke bij grote m en n voldoende nauwkeurig benaderd wordt door de normale verdeling met gemiddelde 0 en spreiding 1, met behulp waarvan men dan de overschrijdingskansen kan bepalen.

De onderlinge vergelijking van twee dieren geschiedde op dezelfde wijze als beschreven in 4.1. Indien in beide te vergelijken groepen, dieren voorkwamen welke in de waarnemingsperiode geen regeneratie vertoonden, werd een gelijk aantal hiervan uit beide groepen buiten beschouwing gelaten, en wel juist zoveel, dat in

minstens één van beide groepen uitsluitend dieren overbleven, die het eerste stadium bereikt hadden. Dit is gerechtvaardigd, als $m = n$ is (hetgeen hier het geval is); omdat dan de permutaties van de overblijvende elementen even waarschijnlijk zijn, indien oorspronkelijk alle permutaties even waarschijnlijk waren. In enkele gevallen, waar $m \neq n$ was, werden uit de grootste groep van tevoren door loting met behulp van een tabel van "random numbers" zoveel dieren weggelaten, dat $m = n$ werd.

5.2. De toets werd allereerst toegepast in die gevallen, waarin de resultaten van de tekentoets hiertoe aanleiding gaven (zie 4.3). Men vindt de resultaten onder: "Idem Toets van Wilcoxon" in Bijlage IV en V.

Wat betreft Pyocyanine, bevestigt het resultaat de uitkomsten van de "tekentoets". De remmende werking van de concentratie $3 \cdot 10^{-4}$ is bij twee van de drie series duidelijk significant, in het derde geval bijna significant.

Bij Lithiumchloride 0.008N 17°C , leiden de uitkomsten tot een merkwaardige anomalie. Bij de series VI 1 en VI 3 blijkt de stof significant remmend te werken, doch bij serie IX 3 nog duidelijker bevorderend. Dit is nog nader onderzocht in 5.3.

Bij 22°C wijst een combinatie van de uitkomsten voor LiCl 0.006N en LiCl 0.008N, op bevorderende werking van de opgeloste stof. Immers de kans dat bij twee onafhankelijke proeven de overschrijdingskans < 0.072 is, is ongeveer 0.005; en dat zij bij twee onafhankelijke proeven < 0.162 is, is 0.026. Dit bevestigt eveneens de aanwijzingen van de tekentoets.

Bij Methyleenblauw 17°C treedt er reeds significantie in bevorderende richting op bij de concentratie $5 \cdot 10^{-4}\%$; bij $10^{-3}\%$ is de significantie hier zeer duidelijk.

Bij 22°C zijn de resultaten onoverzichtelijk. In de concentratie $10^{-3}\%$ werkte het methyleenblauw hier

remmend bij drie series (in één geval bijna significant), bij de serie X3 werkte de stof echter significant bevorderend. Dit is niet nader onderzocht, aangezien niet verwacht kon worden, dat hier een duidelijke conclusie te trekken zou zijn.

5.3 Er is verder getracht, een verklaring te geven van het feit, dat serie IX3 in LiCl 0,008N (17°) significant sneller regenerereert, dan de overeenkomstige contrôleserie, terwijl bij serie VI1 en VI3 het tegengestelde het geval is en ook bij IX1 de contrôlegroep vòdr is, zij het in het laatste geval niet significant.

Als verklaring van bovengenoemde anomalie, kan men aannemen: 1°, dat de contrôlegroep van IX3 abnormaal langzaam is, of 2°, dat de groep behandeld met LiCl.0,008N buitengewoon snel is, of beide.

Om dit nader te onderzoeken, zijn een aantal vergelijkingen getroffen met de toets van Wilcoxon, waarvan men de resultaten vindt in het schema met toelichting van bijlage VI.

Men ziet bij serie VI1, VI3 en IX1 op de bovenste horizontale lijn, een aantal pijlen uitkomen, uitgaande van de lagere horizontale lijnen (verschillende LiCl-concentraties), welke alle naar boven zijn gericht.

Dit betekent dat bij deze series de contrôlegroep vòdr is op alle oplossingsgroepen en bij VI1 en VI3 significant vòdr op de hoogste concentratie-groep (getrokken pijlen). Bij serie IX3, zijn de overeenkomstige (rode) pijlen naar beneden gericht; hier zijn de oplossingsgroepen dus vòdr op de contrôlegroep, de hoogste concentratie zelfs significant voor. Dit pleit vòdr de eerste veronderstelling, dat de contrôlegroep van IX3 abnormaal langzaam zou zijn.

Beschouwt men echter de overeenkomstige pijlen bij Methyleenblauw 17°, dan constateert men dat hier de series IX 1 en IX 3 zich nagenoeg gelijk gedragen. (Figuur rechts onder). De pijlen lopen bij beide series naar beneden, en twee van de drie verschillen

zijn significant.

Om de juistheid van de tweede veronderstelling te onderzoeken, kan men nagaan welke pijlen uitgaan van of uitkomen op de horizontale lijn 0.008 N. Deze zijn bij serie VI 1, VI 3 en IX 1 alle naar boven gericht, (bij serie VI 1 en VI 3 zijn de pijlen naar 0,000 N, bij VI 3 bovendien de pijl naar 0.004 N getrokken, dus de overeenkomstige verschillen in regeneratiesnelheid significant).

Bij serie IX 3 lopen de (rode) pijlen weer alle in tegengestelde richting, met een "significante pijl" uitgaande van 0,000 N. Dit is een aanwijzing in de richting van de tweede onderstelling, dat de 0,008 N-groep bij IX 3 buitengewoon snel was.

5.4 Er is nog een andere aanwijzing in deze richting. Hiertoe dient men de horizontale pijlen te beschouwen in bijlage VI. Deze hebben alle betrekking op vergelijkingen tussen groepen met afsnijlengte 1 mm resp. 3 mm. in dezelfde kolonie onder overigens gelijke omstandigheden. Men ziet dat al deze pijlen op één na naar links lopen, nl.: bij VI controle en LiCl 0,008 N bij IX controle, en bij VII controle, Meth. Blauw $3\frac{3}{4} \cdot 10^{-4}\%$, en $5 \cdot 10^{-4}\%$; daarentegen verloopt de rode pijl bij IX LiCl 0,008 N in tegengestelde richting. De richting van de eerste zeven pijlen komt met de resultaten van het vooronderzoek overeen (zie voorlaatste alinea van 2.2), op grond waarvan te verwachten was, dat de regeneratie bij afsnijlengte 1 mm sneller zou verlopen dan bij afsnijlengte 3 mm.

Om na te gaan of de geconstateerde afwijking bij kolonie IX, LiCl 0.008 N (rode horizontale pijl) betekenis heeft, werd het volgende overwogen.

De waarden van $u = \frac{n_1 - \mu}{\sigma}$ (zie 5.1), overeenkomende met de tussen de verschillende series getrokken vergelijkingen in het schema van bijlage VI aangeduid met horizontale pijlen, kunnen beschouwd worden als steekproeven uit eenzelfde bij benadering normale verdeling ¹⁾

¹⁾ Een normale (0.1)-verdeling of (0.1) normale verdeling is een normale verdeling met gemiddelde 0 en spreiding 1.

(zie 5,1). De waarden zijn daarom uitgezet op waarschijnlijkheidspapier (zie bijlage VII).

Dit papier is zodanig ingericht, dat, als men van de m^{de} waarneming, van een naar opklimmende grootte gerangschikte steekproef (x_1, \dots, x_n) van n waarnemingen uit een normale verdeling, x_m , afzet volgens de horizontale schaal en $\frac{m}{n}$ volgens de verticale schaal, de aldus verkregen punten bij grote waarden van n bij benadering op een rechte komen te liggen (voor $n \rightarrow \infty$ naderen zij tot een rechte).

Op deze wijzen zijn bovengenoemde waarden van u uitgezet. Een normale verdeling is aangepast door het tweede en zesde waarnemingspunt te verbinden, hetgeen hier de meest verantwoorde methode is. Het blijkt nu, dat het punt, corresponderende met de vergelijking IX 1 - IX 3 bij $\text{LiCl } 0,008 \text{ N}$, verder van deze lijn af ligt dan alle andere gevonden punten.

Ter vergelijking werden in bijlage VIII, de overeenkomstige punten en lijnen getekend voor 3 steekproeven van 7 waarnemingen uit een normale $(0,1)$ -verdeling, ontleend aan "Random Normal Deviates" (Tracts for computers XXV, by Herman Wold, Cambridge Un. Press 1948). Men constateert, dat geen enkel punt zozeer afwijkt van de aangepaste normale verdeling, als het geval is bij genoemd punt IX 1 - IX 3 $0,008 \text{ N. LiCl}$ in bijlage VII. Dit wijst er eveneens op dat het met dit punt corresponderende waarnemingsresultaat, een uitzonderlijke positie inneemt.

6. Samenvatting der conclusies.

- 6.1. Uit het onderzoek van de grote contrôlegroepen: (zie punt 2).

De regeneratiesnelheid is afhankelijk van de plaats waar de poliepen worden afgesneden. Zij wordt kleiner, naarmate deze plaats ^{wordt} van de hals verwijderd is. Het eerste stadium wordt het sterkst beïnvloed, het tweede stadium minder. Het derde en vierde stadium worden niet duidelijk beïnvloed.

6.2. Conclusies uit 't onderzoek met de "teken-toets" en de "toets van Wilcoxon" (zie punt 4 en 5).

1^o. Procyanine: werkt bij 17^o en een concentratie van $3 \cdot 10^{-4}\%$ significant remmend. Bij lagere concentraties treedt geen duidelijk effect op.

2^o. Methyleenblauw werkt bij 17^o en concentraties vanaf $5 \cdot 10^{-4}\%$ significant bevorderend; bij lagere concentraties treedt eveneens geen effect op.

Bij 22^o vertoont Methyleenblauw in de concentratie $10^{-3}\%$ tegenstrijdige resultaten, waarover niets te zeggen valt. Wellicht zullen nieuwe proefnemingen hier duidelijker uitkomsten geven. Het is echter ook mogelijk dat in de buurt van 22^o een omkeerpunt ligt tussen bevorderen^{de} en remmende werking van Methyleenblauw in de concentratie $10^{-3}\%$. (Vgl. 3^o).

3^o. Lithiumchloride werkt bij 17^o en in de concentratie 0,008 N, vermoedelijk remmend, omdat er wel aanwijzingen zijn, dat bij de afwijkende serie IX 3, zowel de contrôlegroep abnormaal langzaam als de oplossingsgroep abnormaal snel was. Een definitieve uitspraak kan ook hier slechts gedaan worden na nieuwe proefnemingen (vgl. 7.2 over de middelen ter vermindering van moeilijkheden van deze aard). Leveren deze nieuwe waarnemingen eveneens tegenstrijdige resultaten, dan moet ook rekening gehouden worden met de mogelijkheid van een omkeerpunt bij 17^o. (Zie 2^o conclusie).

Bij 22^o werkt lithiumchloride in de concentraties 0,006 N en 0,008 N, significant bevorderend.

7. Aanwijzingen voor toekomstige experimenten.

7.1. De in het volgende gegeven aanwijzingen beogen het onderzoek zo doeltreffend mogelijk te maken. Enerzijds worden, ter vergroting van de kans op succes, een aantal aanwijzingen gegeven, die het onderzoek uitgebreider maken, anderzijds is getracht aanwijzingen te geven over beperking van de experimenten op minder essentiële punten. Enkele aanwijzingen zijn speciaal gericht op beperking van het rekenwerk bij de statistische verwerking van de waarnemingsresultaten.

7.2. 1^o. Het verdient aanbeveling, de proeven met een groter aantal (30-50) dieren te verrichten. Tevens is het van belang, naast iedere oplossingsgroep een controlegroep (uit dezelfde kolonie en in gelijke omstandigheden) te nemen. Daardoor zullen controlegroepen, die zich abnormaal gedragen, direct opvallen, waardoor uitgesloten wordt, dat een afwijkende controlegroep een hele reeks "valse" significanties veroorzaakt. Tevens zijn moeilijkheden van de aard aan het eind van de vorige paragraaf beschreven aard op deze wijze veelal te ondervangen.

Zouden alle controle-proeven van een serie significant uiteenlopen, dan wijst dit er op, dat er omstandigheden in het spel zijn, die aan de aandacht zijn ontsnapt. Men wordt er dan veelal voor behoed, significanties, die tengevolge van deze onbekende omstandigheden optreden, aan het verschil van de milieus toe te schrijven.

2^o. Ter compensatie van de uit de eerste aanwijzing voortvloeiende vermeerdering van werk en tijd bij de experimenten, valt het te overwegen, zich bij de eerste opzet te beperken tot de afsnijlengte van 1 mm en het waarnemen van het eerste regeneratie-stadium. Het is namelijk gebleken (zie conclusies 6.1), dat de regeneratie bij afsnijlengte 1 mm het snelst verloopt en uit globale beschouwing van het materiaal kan men opmaken, dat de invloed van het milieu op de hogere regeneratiestadia vermoedelijk van dezelfde aard (zij het minder sterk) is, als de invloed op het eerste stadium.

Men kan de werkzame concentraties van de verschillende stoffen dus het beste opsporen met behulp van het eerste regeneratiestadium, en naderhand desgewenst onderzoeken, welke de invloed op de andere stadia is.

3^o. Het is van groot belang, dat de waarnemingstijdstippen voor iedere dier van een kolonie, gerekend vanaf het inzetten van dat dier, dezelfde zijn. Tevens is het raadzaam te zorgen, dat, wederom gerekend vanaf het inzetten van het dier, de gehele veelvouden van het eerste waarnemingstijdstip, eveneens waarnemingstijdstippen zijn.

Het is zeer belangrijk ook tussen deze tijdstippen zo vaak waar te nemen, dar er in ieder waarnemingsinterval slechts weinig regeneraties te verwachten zijn. Dit betekent, dat in het tijdsinterval, waarin veel dieren het eerste stadium bereiken, intervallen van twee of zelfs één uur wenselijk zijn. Als men, zoals boven werd aanbevolen, de waarnemingen bij vele experimenten beperkt tot het eerste stadium, kan men alle dieren, die dit stadium bereikt hebben, verwijderen, zodat men ten slotte slechts een beperkt aantal "langzame"dieren overhoudt, die men nog slechts een beperkt aantal keren behoeft waar te nemen, terwijl men intussen een nieuwe proef kan beginnen. (Daarbij zijn echter twee punten van belang: 1^e dat men de dieren niet direct verwijdert, als men voor het eerst constateert, dat zij het eerst regeneratie stadium hebben bereikt, daar men zich, zoals het onderhavige onderzoek heeft geleerd, gemakkelijk kan vergissen en, 2^e, dat verwijdering na het bereiken van het eerste stadium het verschijnsel van resorptie aan de waarnemingen onttrekt. Om de onder 1^e genoemde mogelijkheid van vergissingen uit te sluiten, valt het aan te bevelen, de dieren pas te verwijderen nadat op twee opeenvolgende waarnemingstijdstippen het eerste regeneratiestadium is geconstateerd. Indien de eventuele resorptie van belang wordt geacht, is het vermoedelijk beter deze in aparte proeven te onderzoeken, nadat volgens de hier beschreven methode de werkzame concentraties zijn bepaald).

4^o. Het is dienstig, de dieren, zowel van contrôle- als oplossings-groep te nummeren en de waarnemingen in een schema als volgt te registeren.

Nummers der dieren die in dit interval het eerste stadium bereikt hebben.		
Interval (in uren na aanvang der proeven).	Contrôleproef	Oplossingsproef
b. v. 0 - 6	5, 27	3, 4, 6
6 - 12	8, 12, 36	1, 9, 12, 20
12 - 14	16, 31	28
14 - 16	15	16, 23, 39
16 - 18	3, 38	7, 28, 40

etc.

In verdere kolommen kan eventueel worden aangegeven welke dieren in dezelfde intervallen de hogere stadia bereikten.

5^o. Het verdient aanbeveling, de uitkomsten onmiddellijk statistisch te verwerken. Als namelijk bij een bepaalde proef, de verschillen tussen oplossings- en controleproef in het geheel niet significant blijken te zijn (overschrijdingskans bv.: 25%), is het zeer onwaarschijnlijk, dat een tweede proef, onder dezelfde omstandigheden wel significante uitkomsten zal opleveren. Dit betekent, dat men in vele gevallen met één proef kan volstaan, mits men steeds een voldoende groot aantal dieren gebruikt.

- 7.3. Het Mathematisch Centrum is gaarne bereid de toekomstige waarnemingsresultaten in bewerking te nemen. Het is zeer wel mogelijk, dat aan de hand van die bewerking aanwijzingen gegeven zullen kunnen worden voor een meer gedifferentieerd onderzoek.

Kolonie X Contrôle 22° C.				Kolonie IX Contr. 17° C.		Kol. VIII Contr. 17°	
	Serie E en F	Serie C en D	Serie A en B	1 mm.	3 mm.	5 mm.	
	1 mm.	3 mm.	5 mm.				
t_1	Aantal waarn.	33	51	44	8	13	17
	Gemiddelde	17,8	22,4	25,6	39	60	37
	Spreiding	5,1	5,8	6,1	20	31	10
t_2	Aantal waarn.	33	53	49	15	6	47
	Gemiddelde	23,0	25,6	28,0	47	76	51
	Spreiding	5,5	5,9	7,3	25	21	24
t_3	Aantal waarn.	35	51	30	2	4	9
	Gemiddelde	30,0	33,0	33,1			64
	Spreiding	8,1	5,8	6,7			37
t_4	Aantal waarn.	36	56	53	19	21	50
	Gemiddelde	38,1	37,5	36,9	74	86	72
	Spreiding	6,0	6,9	7,1	33	31	25
$\frac{t_1}{t_4}$	Aantal waarn.	33	51	44			17
	Gemiddelde	0,47	0,59	0,67			0,57
	Spreiding	0,11	0,09	0,08			0,09
	a.	0,85	0,82	0,81			
	$I(0,1)(a)$	0,76 - 0,85	0,76 - 0,84	0,76 - 0,84			
	ξ_1	- 0,25	+ 0,23	- 0,28			
$\frac{t_2}{t_4}$	$I(0,05)(\xi_1)$	-0,64; +0,64	-0,53; +0,53	-0,56; +0,56			
	Aantal waarn.	33	53	49			47
	Gemiddelde	0,60	0,68	0,76			0,70
	Spreiding	0,10	0,09	0,10			0,11
	a.	0,79	0,79	0,78			
	$I(0,1)(a)$	0,76 - 0,85	0,76 - 0,84	0,76 - 0,84			
$\frac{t_3}{t_4}$	ξ_1	+ 0,28	+ 0,18	- 0,10			
	$I(0,05)(\xi_1)$	-0,64; +0,64	-0,51; +0,51	- 0,54; +0,54			
	Aantal waarn.	35	51	30			9
	Gemiddelde	0,78	0,88	0,90			0,84
	Spreiding	0,14	0,06	0,06			0,04

Toelichting:

t_1 is de tijd van de aanvang van de proef tot het begin van het 1^{de} regeneratie-stadium

a = gestandaardiseerde absolute eerste moment

van de waarnemingsresultaten.

ξ_1 = gestandaardiseerde derde moment

$I(0,1)(a)$ is het interval ^{waar} a, bij een steekproef uit een normale verdeling, met een waarschijnlijkheid 0,1 buiten valt. (Voorspellingsinterval van a met onbetrouwbaarheidsdrempel 0,1).

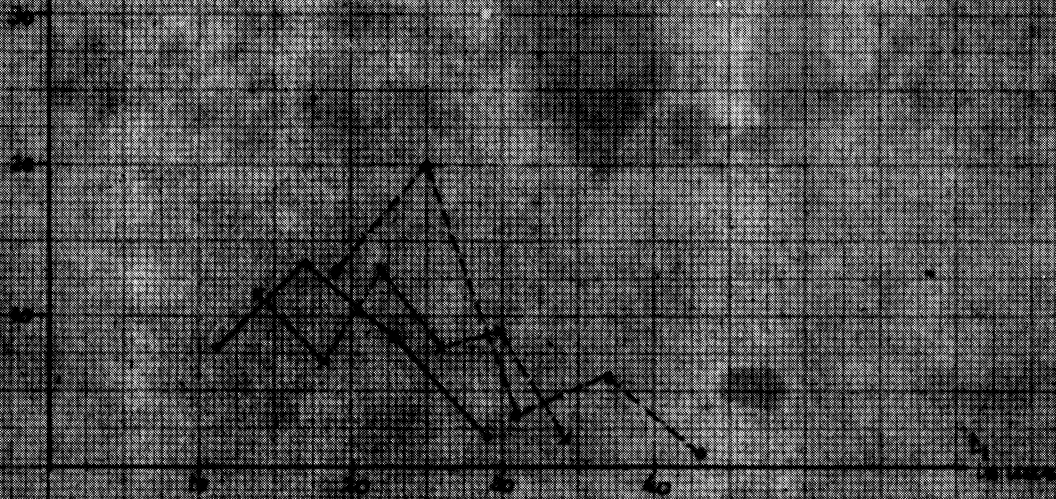
$I(0,05)(\xi_1)$ analoge definitie.

Bijlage II (zie 2.2)

Aantal dieren

—●— 1 mm (E en F)
 —x— 3 mm (C en D)
 —○— 5 mm (A en B)

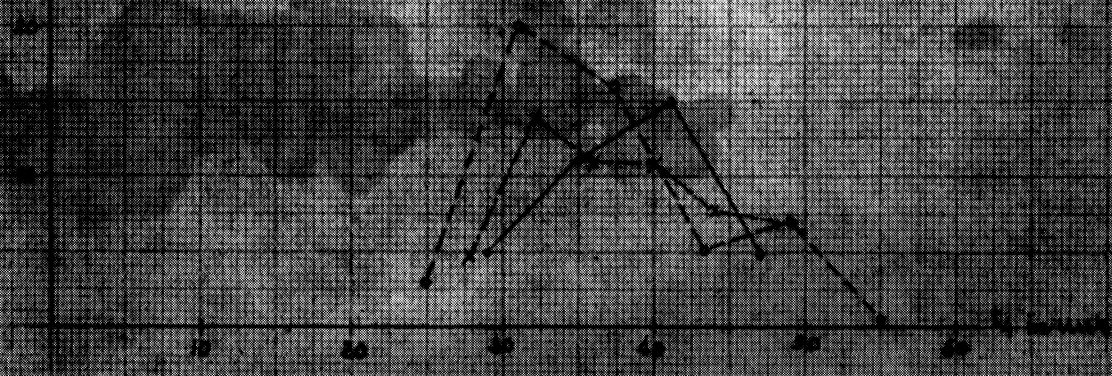
Verdeling van t_1 bij de controle series van Kolonie X



Aantal dieren

—●— 1 mm (E en F)
 —x— 3 mm (C en D)
 —○— 5 mm (A en B)

Verdeling van t_1 bij de controle series van Kolonie X

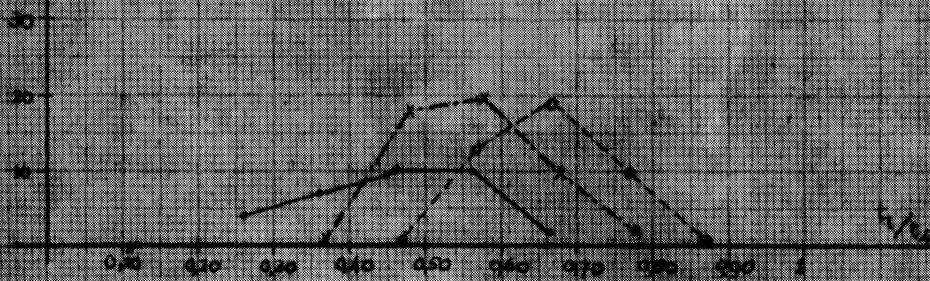


Bijlage III (zie 23)

Aantal dieren

1 mm
3 mm
5 mm

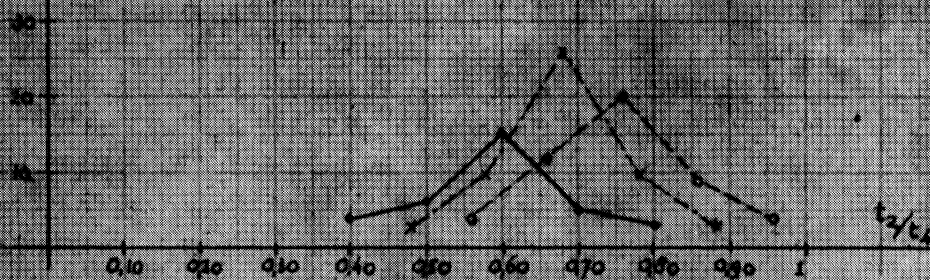
Verdeling van $\frac{1}{15}$ bij de controle series van Kolonie X



Aantal dieren

1 mm
3 mm
5 mm

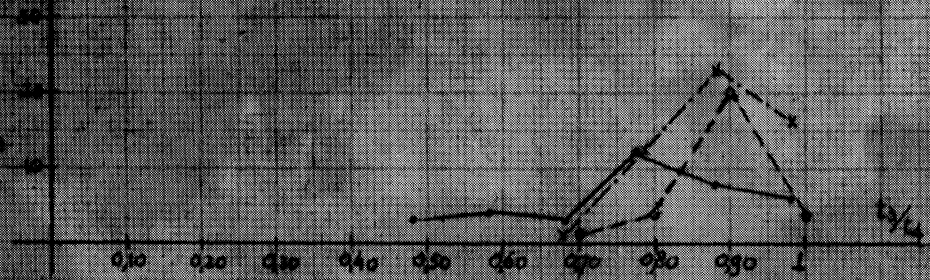
Verdeling van $\frac{1}{15}$ bij de controle series van Kolonie X



Aantal dieren

1 mm
3 mm
5 mm

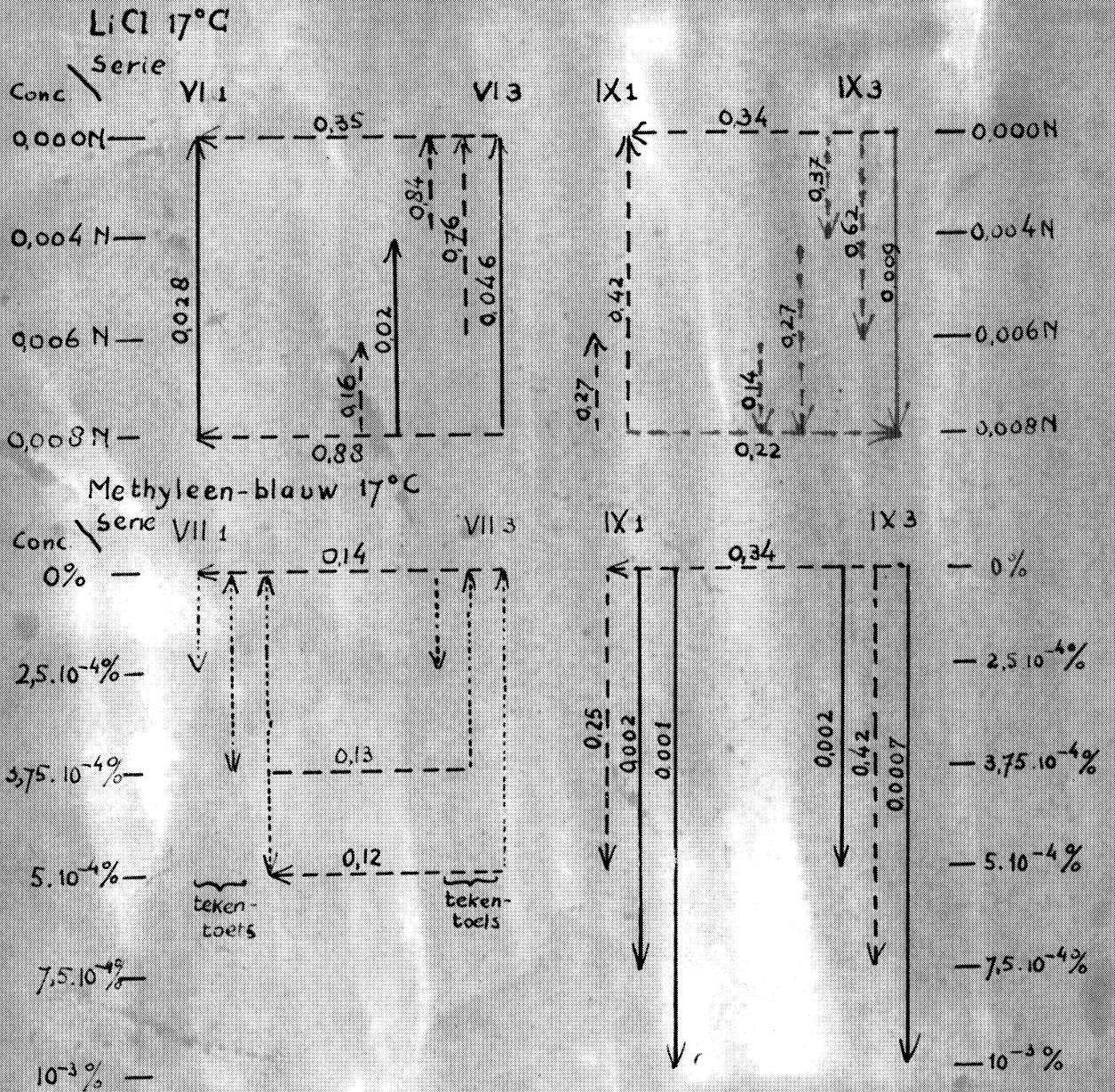
Verdeling van $\frac{1}{15}$ bij de controle series van Kolonie X



Bijlage IV
(zie 4.2; 5.2).

Stof	Concentratie	Serie	m.m.	Temp.	Aantal	Uitslag		Significantie (tekentoets)	Idem: toets v. Wilcoxon.
						+	-		
Pyoc.	$5 \cdot 10^{-6} \%$	VI	1	17°	20	8	10	- niet sign.	
"	"	"	3	"	"	<u>9</u> ¹	<u>6</u> ¹	+ " "	
"	"	"	1 en 3	"	40	17 ¹	16 ¹		
"	$7,5 \cdot 10^{-6} \%$	"	1	"	20	9	8	+ niet sign.	
"	"	"	3	"	"	<u>12</u>	<u>4</u>	+ tussen 0,05 en 0,10	+ 0,059
"	"	"	1 en 3	"	40	21	12		
"	$10^{-5} \%$	"	1	"	20	10	9	+ niet sign.	
"	"	"	3	"	"	<u>9</u> ¹	<u>7</u> ¹	+ " "	
"	"	"	1 en 3	"	40	19 ¹	16 ¹		
"	$10^{-4} \%$	IV	1	"	20	5 ¹	14 ¹	- 0,10 (ongeveer)	
"	"	V	3	"	"	11	8	+ niet sign.	
"	"	"	5	"	"	<u>10</u> ¹	<u>8</u> ¹	+ " "	
"	"	IV, V	1, 3, 5	"	60	27	31		
"	$3 \cdot 10^{-4} \%$	IV	1	"	20	5	15	- < 0,05	- 0,009
"	"	V	3	"	"	7	11	- niet sign.	- 0,072
"	"	"	5	"	"	<u>3</u> ¹	<u>10</u> ¹	- tussen 0,10 en 0,25	- 0,013
"	"	IV, V	1, 3, 5	"	60	15 ¹	36 ¹	- 0,01 (ongeveer)	
LiCl	0,004 N	VI	1	"	20	6 ¹	10 ¹	- niet sign.	
"	"	"	3	"	"	8	7	+ " "	- 0,84
"	"	IX	1	"	30	15	13	+ " "	
"	"	"	3	"	"	<u>16</u>	<u>10</u>	+ " "	+ 0,37
"	"	VI, IX	1 en 3	"	100	45 ¹	40 ¹		
"	0,006 N	VI	1	"	20	8	9	- niet sign.	
"	"	"	3	"	"	11	7	+ " "	- 0,76
"	"	IX	1	"	30	13 ¹	13 ¹	0 " "	
"	"	"	3	"	"	<u>14</u>	<u>15</u>	- " "	+ 0,62
"	"	VI, IX	1 en 3	"	100	46 ¹	44 ¹		
"	0,008 N	VI	1	"	20	4	13	- < 0,05	- 0,028
"	"	"	3	"	"	9	8	+ niet sign.	- 0,046
"	"	IX	1	"	30	10	18	- tussen 0,10 en 0,25	- 0,423
"	"	"	3	"	"	<u>19</u> ¹	<u>9</u> ¹	+ " " " "	+ 0,009
"	"	VI, IX	1 en 3	"	100	42 ¹	48 ¹		
"	0,004 N	XI	1	22°	30	17 ¹	12 ¹	+ niet sign.	
"	"	"	3	"	"	<u>14</u> ¹	<u>15</u> ¹	- " "	
"	"	"	1 en 3	"	60	32	28		
"	0,006 N	"	1	"	30	18 ¹	11 ¹	+ " "	+ 0,072
"	"	"	3	"	"	<u>19</u>	<u>10</u>	+ " "	+ 0,037
"	"	"	1 en 3	"	60	37 ¹	21 ¹	+ 0,05 (ongeveer)	
"	0,008 N	"	1	"	30	18 ¹	11 ¹	+ niet sign.	+ 0,059
"	"	"	3	"	"	<u>17</u>	<u>15</u>	+ niet sign.	+ 0,162
"	"	"	1 en 3	"	60	35 ¹	24 ¹	+ tussen 0,10 en 0,25	

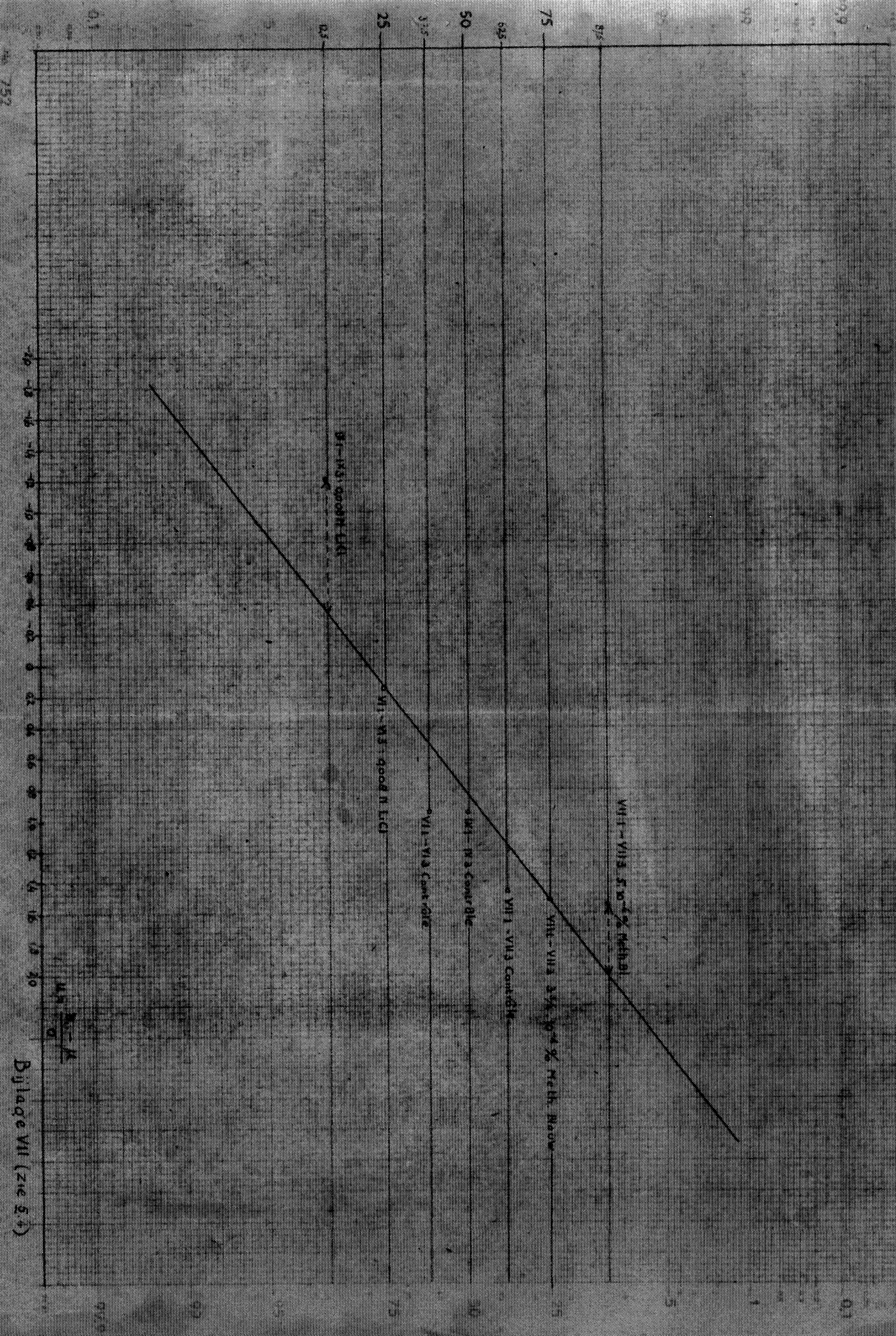
Stof	Concentratie	Serie	m.m.	Temp.	Aantal	Uitslag		Significantie (tekentoets)	Idem toets v. Wilcoxon
						+	-		
Methyleenblauw	$2,5 \cdot 10^{-4} \%$	VII	1	17°	20	11	7	+ niet sign.	
"	"	"	3	"	"	<u>10</u>	<u>8</u>	+ niet sign.	
"	"	"	1 en 3	"	40	21	15		
"	$3,75 \cdot 10^{-4} \%$	"	1	"	20	8½	8½	0 niet sign.	
"	"	"	3	"	11	<u>7</u>	<u>11</u>	- niet sign.	
"	"	"	1 en 3	"	40	15½	19½		
"	$5 \cdot 10^{-4} \%$	"	1	"	20	9	9	0 niet sign.	
"	"	"	3	"	"	7	11	- niet sign.	
"	"	IX	1	"	15	8	7	+ niet sign.	+ 0,25
"	"	"	3	"	30	<u>19½</u>	<u>10½</u>	+ tussen 0,1 en 0,25	+ 0,002
"	"	VII, IX	1 en 3	"	85	43½	37½		
"	$7,5 \cdot 10^{-4} \%$	IX	1	"	15	11	3	+ tussen 0,05 en 0,1	+ 0,002
"	"	"	3	"	30	<u>14</u>	<u>12</u>	+ niet sign.	+ 0,42
"	"	"	1 en 3	"	45	25	15		
"	$10^{-3} \%$	"	1	"	30	22	7	+ 0,01	+ 0,001
"	"	"	3	"	30	<u>20½</u>	<u>8½</u>	+ 0,05 (ongev.)	+ 0,0007
"	"	"	1 en 3	"	60	42½	15½	+ 0,01	
"	$5 \cdot 10^{-4} \%$	X	1	22°	30	12½	15½	- niet sign.	
"	"	"	3	"	"	16	14	+ niet sign.	
"	"	XI	1	"	"	12½	16½	- niet sign.	
"	"	"	3	"	"	<u>13½</u>	<u>16½</u>	- niet sign.	
"	"	X, XI	1 en 3	"	120	54½	62½		
"	$7,5 \cdot 10^{-4} \%$	X	1	"	30	12	18	- niet sign.	
"	"	"	3	"	"	15½	13½	+ niet sign.	
"	"	XI	1	"	"	13	17	- niet sign.	
"	"	"	3	"	"	<u>9½</u>	<u>20½</u>	- tussen 0,05 en 0,1	
"	"	X, XI	1 en 3	"	120	50	79		
"	$10^{-3} \%$	X	1	"	30	9½	20½	- tussen 0,05 en 0,1	- 0,059
"	"	"	3	"	"	20½	9½	+ " "	+ 0,005
"	"	XI	1	"	"	14½	15½	- niet sign.	- 0,37
"	"	"	3	"	"	<u>10½</u>	<u>19½</u>	- tussen 0,1 en 0,25	- 0,13
"	"	X, XI	1 en 3	"	120	55	65		



Toelichting: De pijlen lopen van de groepen die achter zijn, naar de groepen die voor zijn. Een getrokken pijl duidt op significant verschil tussen beide groepen (overschrijding ^{skans} $< 0,05$); een onderbroken pijl op niet-significant verschil. Gestippelde pijlen op verschillen, alleen onderzocht met de tekentoets (Pijlen met twee punten $\langle \dots \rangle$ betekenen, dat van twee met de tekentoets vergeleken groepen de helft van de dieren uit één groep voor was op de dieren uit de andere groep, en de andere helft achter).

In rood zijn verschillen aangeduid van de afwijkende groep IX 3, bij LiCl.

0,000N = contrôle groep.



Dyfrage VII (zie 5.5)

$\frac{1.49 \times 10^{-4}}{0}$

VII - VIII 100% meth. B1

VIII - VIII 25% 100% meth. B1

VII - VIII Control

VII - VIII Control

VII - VIII Control

VII - VIII good N. ECI

VII - VIII good N. ECI

752

