

SAMENVATTING EN CONCLUSIES

Uit een overzicht van de literatuur met betrekking tot het effect van röntgenstralen op het regeneratievermogen van extremiteiten bij amphibia (hoofdstuk I) blijkt, dat het herstel van dit vermogen, indien het tengevolge van bestraling verloren is gegaan, een zeer omstreden punt is. TRAMPUSCH (1964a) stelde hieromtrent een hypothese op, volgens welke aan zenuwen bij dit herstel een grote bemiddelende rol zou toekomen ("nerves as morphogenetic mediators").

Deze hypothese steunde o.a. op de (toevallige) waarneming van HARREBOMÉE, dat bestraalde achterpoot-stompen, die zonder meer niet regenereerden, dit wél deden, als de (bestraalde) nervus ischiadicus uit de poot was gedeviceerd naar een onbestraald implantaat in de flank, waaruit zich een poot aan het ontwikkelen was. Dit verschijnsel werd verklaard door aan te nemen, dat uitgaande van het wondepitheel van het implantaat zich een herstel-bevorderende invloed via het zenuwstelsel zou uitbreiden naar de bestraalde pootstompen, die daardoor hun vermogen tot regeneratie weer zouden terugkrijgen.

Het begin van het eigen onderzoek sloot hierop aan. Het beoogde ten eerste na te gaan, of dit herstel werkelijk uitging van het wondepitheel en niet van enig ander bestanddeel van het implantaat en ten tweede te onderzoeken, welke betekenis aan de duur van het contact tussen de gedeviceerde zenuw en het implantaat moest worden toegekend.

De proeven werden uitgevoerd bij 4-5 maanden oude axolotl-larven met een lengte van 7.5-8.5 cm. Aanvankelijk werden voor elk experiment 24 proefdieren gebruikt; later werd doorgaans volstaan met series van telkens 12 dieren. Waar nodig, werd uiteraard steeds gezorgd voor even grote groepen van controle-dieren. De resultaten werden gewoonlijk 80 dagen na amputatie der achterpoten beoordeeld. Algemene gegevens over de proefdieren en de gebruikte onderzoeksmethoden zijn vermeld in hoofdstuk II. Gedetailleerder gegevens zijn opgenomen in de volgende hoofdstukken, in samenhang met de daarin beschreven speciële onderzoeken.

Om de betekenis van de verschillende bestanddelen van het implantaat te onderzoeken werden negen, onderling verschillende implantaten in contact gebracht met een naar de flank gedeviceerde nervus ischiadicus, in een nagenoeg gelijke proefopzet als door HARREBOMÉE was gebruikt (hoofdstuk III). Het bleek, dat onder deze omstandigheden de mate van regeneratie van de bestraalde achterpoot-stompen, die gevonden werd, steeds vrijwel dezelfde was. De aard van het implantaat deed er blijkbaar niet toe.

Dit resultaat bleef aanvankelijk onbegrepen. Bij de volgende reeks van proeven kon evenwel worden vastgesteld, dat ook aan de duur van het contact tussen de gedeviceerde zenuw en het implantaat geen enkele betekenis toekwam (hoofdstuk IV). Zelfs indien dit contact in het geheel niet tot stand werd gebracht, trad toch eenzelfde mate van regeneratie op. Deze uitkomst toonde dus met zekerheid aan, dat de waargenomen regeneratie van de bestraalde achterpoot-stompen, althans bij de eigen experimenten, niet kon worden toegeschreven aan een herstel van het regeneratievermogen, dat zijn bron zou vinden in het implantaat in de flank en zich via het zenuwstelsel zou uitbreiden naar de achterpoot-stompen.

Gezien dit resultaat moest nu worden onderzocht, waaraan de optredende regeneratie van de bestraalde achterpoot-stompen dan wél was te wijten (hoofdstuk V). Uit dit onderzoek kwam naar voren, dat hier twee feiten van belang waren. In de eerste plaats bleek de sinds 1958 gebruikte en tot dusver ook bij dit onderzoek toegepaste routine-methode van bestraling niet toereikend te zijn om het regeneratievermogen der bestraalde poten geheel te onderdrukken. Voorts werd duidelijk, dat het manipuleren met de nervus ischiadicus (zoals ook bij deviatie van deze zenuw plaats vond) als zodanig een stimulerend effect had op de regeneratie.

Bij het oorspronkelijke experiment van HARREBOMÉE waren dezelfde routine-bestraling en eveneens een deviatie van de nervus ischiadicus uitgevoerd, zodat de daar opgetreden regeneratie van de bestraalde achterpoot-stompen hoogstwaarschijnlijk ook moest worden toegeschreven aan een ontoereikende bestraling en het manipuleren met de zenuw. De misvatting omtrent het effect van de routine-bestraling op het regeneratievermogen kon worden teruggebracht op een in 1958 doorgevoerde verandering in de werkwijze, waardoor een tevoren wél toereikende dosis nu ontoereikend was geworden om regeneratie van de achterpoten geheel te onderdrukken.

In het vervolg van het onderzoek werd een gemodificeerde wijze van bestralen toegepast. Eerst werd nagegaan, welke gevolgen onder deze voorwaarden verschillende doses röntgenstralen voor het regeneratievermogen van de achterpoten hadden (hoofdstuk VI). Bestraling met 375 *r*, één week voor amputatie door het bovenbeen, liet de regeneratie van poten toe; deze poten waren echter gedysproportioneerd; er was een verkorting van hun proximale delen. Na bestraling met 500 *r* werden alleen nog abnormaal gevormde en rechtstreeks aan de bovenbeensstomp vastzittende voeten waargenomen. Bij doses van 625 en 750 *r* ontstonden maar enkele regeneraten, waaraan tenen waren te onderkennen; meestal ontstonden slechts (afgeplatte) blastemata of slierten epidermis. Met 875–1500 *r* bestraalde pootstompen vormden binnen de experimentele periode van 80 dagen ten hoogste epidermisslierten.

Het manipuleren met de nervus ischiadicus bleek ook bij pootstompen, die op de gemodificeerde wijze waren bestraald, de regeneratie te stimuleren (hoofdstuk VII). Het effect hiervan was bovendien afhankelijk van de toegepaste bestralingsdosis: na 1000 en 1250 *r* werden in plaats van epidermisslierten veelal als poot of tenenplaat te typeren regeneraten gevormd, terwijl na 1500 *r* een dergelijk effect uitbleef. Geheel dezelfde uitkomsten werden verkregen, wanneer de nervus ischiadicus was gedeveerd naar een poot-vormend implantaat in de flank, zoals bij het experiment van HARREBOMÉE. Hiermee werd het eerder uitgesproken vermoeden bevestigd, dat de regeneratie, waargenomen door laatstgenoemde, evenmin kon worden toegeschreven aan een van het implantaat in de flank uitgaande herstel-bevorderende invloed, die op de gedeveerde zenuw zou overgaan en zich via het zenuwstelsel zou uitbreiden naar de bestraalde achterpoot-stompen. De oorspronkelijke probleemstelling, die juist op deze herstel-bevorderende invloed betrekking had, kon daarom nu niet langer meer als relevant worden beschouwd.

VERGROESEN (1958) had verondersteld, dat röntgenstralen de voor de regeneratie van poten onmisbare trofische functie van de zenuwen verstoorden. Volgens deze onderzoeker waren linkszijdige, bestraalde pootstompen, waarvan de nervus ischiadicus door middel van een "kunstgreep" voor bestraling was gespaard, wel tot regeneratie in staat, terwijl dit bij, overigens gelijk behandelde contra-laterale pootstompen met een bestraalde nervus ischiadicus, niet het geval was.

Bij het eigen onderzoek (hoofdstuk VIII) bleek de gereleveerde "kunstgreep" zelf verantwoordelijk voor de regeneratie van de bestraalde pootstompen te zijn, ongeacht of daarbij de zenuw wel of niet aan bestraling was blootgesteld geweest. Een verklaring voor VERGROESEN's anders luidende resultaat kan zijn, dat het trauma van de ingreep aan de linker poot systematisch groter was dan dat aan de rechter. Hierdoor kan links de vorming van forsere regeneraten zijn opgeroepen, terwijl rechts wellicht de regeneraten bij het einde van de proef nog te klein waren om als zodanig te worden herkend. Geconcludeerd werd dan ook, dat röntgenstralen het regeneratie-bevorderende effect van de zenuw niet verstoorden. Hiermee kwam tevens vast te staan, dat het onnodig was een herstel van de trofische functie van bestraalde axonen vanuit onbestraalde perikarya aan te nemen (VERWOERD 1963); ook deze veronderstelling berustte in feite op de waarneming van regeneraten, die, achteraf gezien, moesten worden toegeschreven aan de ontoereikend gebleken bestraling.

Voorts werd nog gevonden, dat herhaalde traumatisatie van de stomp na de amputatie of ook een doorsnijding van de nervus ischiadicus in het heupgebied — als de romp niet was mee-bestraald — bestraalde pootstompen tot de vorming van aanzienlijke regeneraten aanzette.

Een beschouwing van alle nieuw verkregen gegevens te samen (hoofdstuk IX) leidde tenslotte tot de volgende algemene conclusies:

(1) De hypothese van TRAMPUSCH, volgens welke bij een herstel van het regeneratievermogen van bestraalde poten aan zenuwen een bemiddelende rol toekomt, was gebaseerd op de uitkomsten van experimenten van HARREBOMÉE, VERGROESEN en VERWOERD, waarvan de interpretatie zo bleek te moeten worden gewijzigd, dat zij als steun voor de genoemde hypothese vervallen.

(2) De eigen nieuwe uitkomsten wijzen er op, dat na toediening van steeds hogere doses röntgenstralen, een steeds geringer aantal cellen in de pootstomp deelneemt aan de regeneratie. Verondersteld wordt, dat röntgenstralen het vermogen van de cellen aantasten om zich door dedifferentiatie te veranderen in blastemacellen, waaruit een regeneraat kan worden opgebouwd. Boven een zekere dosis zal het aantal blastemacellen, dat uit de weefsels grenzend aan het amputatievlak kan voortkomen, zó gering zijn, dat niet meer dan epidermisslierten worden gevormd.

(3) Wanneer in een bestraalde extremitéit een weefsel van een

onbestraalde poot is geïmplanteerd, zal als het vlak van amputatie door het implantaat heenloopt, een regeneraat ontstaan. TRAMPUSCH meent, dat aan de opbouw daarvan bestraalde weefsels bijdragen en spreekt van een herstel van hun vermogen tot regeneratie. STINSON en anderen ontkennen deze bijdrage en daarmee ook het herstel. Dit verschil van mening is te doorzien, wanneer in aanmerking wordt genomen, dat de mogelijke bijdrage van de bestraalde weefsels afhankelijk is van de mate van bestraling, waardoor zij dus verschillend groot kan zijn.

(4) Het ontstaan van regeneraten uit bestraalde pootstompen, als vóór de amputatie de nervus ischiadicus werd vrijgeprepareerd van de voet tot in het onbestraalde heupgebied of deze zenuw aan de pootbasis werd doorgesneden, resp. als na de amputatie de wond herhaaldelijk werd getraumatiseerd, is wellicht op één van de volgende wijzen te begripen:

- (a) Het door de ingreep gelaedeerde grotere deel van de poot levert meer blastemacellen dan het kleinere, alleen door een amputatie getroffen deel.
- (b) De "bereidheid" van de weefsels om blastemacellen te vormen wordt door de tijdelijke denervatie vergroot.
- (c) De ingroeïende zenuwvezels hebben een groter regeneratiebevorderend effect, bijvoorbeeld door een grotere dichtheid of ten gevolge van een verhoogd metabolisme der neuronen.
- (d) Potentiële blastemacellen migreren vanuit het onbestraalde heupgebied naar de apex van de pootstomp via de (overlangse) wond of samen met de ingroeïende zenuwvezel mee.

(5) Er zijn tot dusver geen directe aanwijzingen voor gevonden, dat door röntgenstralen aangetaste cellen in een pootstomp zich werkelijk herstellen.

Tenslotte moet worden opgemerkt, dat nog vele nauwkeurige gegevens moeten worden verzameld over de gevolgen van röntgenbestraling voor het regeneratievermogen als zodanig, vooraleer men het onderzoek naar een eventueel herstel van dit vermogen met vrucht zal kunnen voortzetten.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

A survey of the literature pertinent to the influence of X-rays on the regeneration capacity of amphibian extremities (chapter I), shows that the recovery of this capacity, if lost as a result of irradiation, is a matter of dispute. In this regard TRAMPUSCH (1964a) postulated that nerves might play an important role in the mechanism producing this recovery ("nerves as morphogenetic mediators").

This hypothesis was based, *inter alia*, on the (accidental) observation of HARREBOMÉE that irradiated hindlimb stumps, which did not regenerate of themselves, did so if the irradiated sciatic nerve had been deviated from the limb to a non-irradiated implant in the side of the animal, from which a limb was developing. This phenomenon was explained by assuming that a recovery promoting influence, originating from the wound epithelium of the implant, would spread along the nervous system towards the irradiated limb stumps which, as a result, would regain their regeneration capacity.

This idea was the starting-point in the investigations presented here. Their first aims were to ascertain, whether the recovery promoting influence actually originated from the woundepithelium or perhaps from any other part of the implant, and to study the possible importance of the duration of the contact between the deviated nerve and the implant.

The experiments were performed on larval axolotls, measuring 7.5–8.5 cm in length. Initially, for each experiment 24 animals were used; later on 12 animals proved to be a sufficient number. If necessary, equal numbers of control animals were provided. As a rule, the results of the experiments were studied 80 days after the amputation of the limbs. General data concerning the experimental animals and the methods used, have been described in chapter II. Detailed information has been included in the next chapters, in relation to the description of the experiments.

In order to trace the significance of the various components of the implant, 9 different implants were brought into contact with the deviated sciatic nerve, in experiments closely resembling that performed by HARREBOMÉE (chapter III). It became clear that under these circumstances the irradiated hindlimb stumps nearly