

HET HERSTEL
VAN HET REGENERATIEVERMOGEN
VAN BESTRAALDE EXTREMITETEN
BIJ AXOLOTL-LARVEN

C. D. A. VERWOERD

HET HERSTEL
VAN HET REGENERATIEVERMOGEN
VAN BESTRAALDE EXTREMITATEITEN
BIJ AXOLOTL-LARVEN

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,
HOGLERAAR IN DE FACULTEIT DER RECHTSGELEERDHEID,
IN HET OPENBAAR TE VERDEDIGEN
IN DE AULA VAN DE UNIVERSITEIT
(TIJDELIJK IN DE LUTHERSE KERK,
INGANG SINGEL 411, HOEK SPUI)
OP DONDERDAG 20 JUNI 1968, DES MIDDAGS TE 5 UUR

DOOR

CAREL DIRK AUGUST VERWOERD

GEBOREN TE UITHOORN

1968

HOLLAND-BREUMELHOF N.V., AMSTERDAM

Promotor: PROF. DR. J. VAN LIMBORGH

Aan Jetty en Diederik

Het in dit proefschrift beschreven onderzoek werd verricht in het
Anatomisch-Embryologisch Laboratorium van de
Universiteit van Amsterdam (Directeur: Prof. Dr. J. van Limborgh).

WOORD VOORAF

Het verschijnen van dit proefschrift biedt mij een welkome gelegenheid U, Hoogleraren, Oud-Hoogleraren, Lectoren en andere docenten van de Geneeskundige Faculteit van de Universiteit van Amsterdam te danken voor het genoten onderwijs.

Hooggeleerde VAN LIMBORGH, Hooggeachte promotor, ik acht het een voorrecht onder Uw leiding, en daarin geconfronteerd met Uw scherp inzicht, accuratesse en onveranderlijk opbouwende gezindheid, deze studie te hebben kunnen voltooien. Steeds meer ben ik er mij van bewust zeer veel te danken te hebben aan Uw kritische begeleiding en de zuiverende invloed van Uw op- en aanmerkingen.

Zeergeleerde TRAMPUSCH, de wijde perspectieven, waarmee U indertijd de ontwikkelingsfysiologie afschilderde hebben bij mij een blijvende belangstelling gewekt voor de causale achtergronden van de morphogenese. Ik ben dankbaar, dat U mij hebt willen inleiden in de problematiek van de regeneratie. Voor Uw belangstelling voor dit onderzoek en de opmerkingen, die U bij het manuscript hebt gemaakt, ben ik U erkentelijk.

Het is mij een groot genoegen, Zeergeleerde VAN DEN BORDEN en DRUKKER, dat U nu als mijn paranymfen optreedt; ik zie er een bevestiging in van onze jarenlange vriendschap en goede samenwerking, die ook het tot stand komen van dit proefschrift hebben bevorderd.

Geleerde HARREBOMÉE, Uw aanwijzingen betreffende de techniek van het opereren bij embryonen en amphibie-larven heb ik steeds zeer gewaardeerd. Geleerde VAN OOSTROM, Uw hulp bij het klaar-maken van dit manuscript heb ik bijzonder op prijs gesteld.

Ook verscheidene anderen ben ik voor velerlei hulp grote dank verschuldigd: De heer C. M. DE RUYTER voor de assistentie bij bestralingen en operaties; de heren P. MYZEN en T. DE RUYTER en

Mej. A. DE JONG voor de zorg besteed aan de proefdieren; Mej. L. SCHRÖDER voor het vele nauwgezette typewerk; Mevr. G. C. v. D. LAAN en Mevr. H. THE voor het maken van diagrammen, schemata en figuren; Mej. TH. B. VAN DOORN voor het vele "boekenwerk" dat zij voor mij verzet heeft.

In mijn Moeder wil ik mijn beide ouders gaarne danken, voor de gelegenheid, die zij mij gaven om te studeren en hun voortdurende belangstelling daarbij. De wijsheid, werklust en gemeenschapszin van mijn Vader staan mij nog als voorbeeld voor ogen.

Mijn Vrouw wil ik tenslotte danken voor haar onuitputtelijk optimisme, haar daadwerkelijke steun en het geduld, waarmee zij mijn, haast regel geworden, verblijf op het laboratorium, heeft opgevangen.

... wide was the wound.
But suddenly with flesh fill'd up and healed.
Milton, *Paradise Lost*, VIII, 467.

INHOUD

Algemene inleiding	1
HOOFDSTUK I Literatuuroverzicht, gevolgd door een korte samenvatting en de probleemstelling . .	7
HOOFDSTUK II Proefdieren en methoden.	27
HOOFDSTUK III Experimenten over het milieu van het einde van de gedevieerde zenuw	39
HOOFDSTUK IV Experimenten over de duur van het contact van de gedevieerde zenuw met het wond- epitheel	46
HOOFDSTUK V Een verklaring voor de waargenomen re- generatie van bestraalde pootstompen . .	53
HOOFDSTUK VI Het effect van verschillende doses röntgen- stralen op het regeneratievermogen van de achterpoten	71
HOOFDSTUK VII Toetsing van enkele eerder geformuleerde conclusies.	83
HOOFDSTUK VIII De invloed van röntgenstralen op de tro- fische functie van de zenuw	95
HOOFDSTUK IX Algemene discussie	108
Samenvatting en conclusies	120
Summary and conclusions	125
Geraadpleegde literatuur	130

ALGEMENE INLEIDING

Het vermogen tot regeneratie is bij amphibia indrukwekkend; onder meer is regeneratie beschreven van poten, staart, onder- en bovenkaak, kieuwen, ruggemerg, retina, iris en lens. Bij zoogdieren is het vermogen tot regeneratie veel beperkter; wonden in huid, spieren en skelet kunnen helen en ook in verscheidene andere organen is nog vervanging van beschadigde of weggenomen delen mogelijk. Minder spectaculair is de fysiologische regeneratie; hiermee wordt bedoeld de voortdurende vervanging van te gronde gegane cellen door jongere cellen, zoals bijvoorbeeld het geval is bij het epitheel van huid en slijmvliezen en bij de erythrocyten.

Een overzicht van verschillende vormen van regeneratie bij zeer uiteenlopende organismen geeft NEEDHAM (1952). Het verslag van een in 1964 gehouden conferentie over "Regeneration in Animals and Related Problems" laat zien, welke aspecten van het regeneratie-proces gedurende de laatste tijd de meeste aandacht van de onderzoekers genoten hebben (KIORTSIS en TRAMPUSCH 1965).

De regeneratie van geamputeerde delen van de poten van salamanders en kikker-larven (donderkopjes) is sinds lang (onder andere reeds bij SPALANZANI 1768) reden tot verwondering en onderwerp van onderzoek geweest. Salamanders (*Urodelen*) en kikkers (*Anuren*), beide behorend tot de amphibia, maken in hun ontwikkeling een larvaal stadium door, voordat zij via een metamorfose de volwassen staat bereiken. Tijdens de metamorfose ondergaat het dier structurele en fysiologische veranderingen, die het in staat stellen zich en op het land en in het water op te houden. Zowel bij larvale als bij volwassen salamanders kunnen de staart en de poten regenereren.

Bij de metamorfose van kikker-larven gaat de staart in regressie. Bovendien zijn volwassen *Anuren* in tegenstelling tot hetgeen men vindt bij larvale, niet meer tot regeneratie van een poot in staat. De axolotl (*Ambystoma mexicanum*), een in Mexico inheemse salamandersoort, onderscheidt zich van de overige urodelen doordat hij onder natuurlijke omstandigheden niet of slechts uiterst zelden een volledige metamorfose doormaakt.

De dieren houden hun larvale staat levenslang en worden als zodanig geslachtsrijp. Omdat ingrijpende veranderingen verbonden aan de metamorfose het verloop van een experiment niet zullen beïnvloeden, zijn axolotl-larven bijzonder geschikt als proefdieren voor experimenteel-morfologische onderzoekingen.

De achterpoten van amphibia tonen in hun bouw veel overeenkomst met de benen van de mens. In het stylopodium of bovenbeen bevindt zich een femur, in het onderbeen of zeugopodium een tibia en een fibula; het voetskelet bestaat uit tarsalia, metatarsalia en phalanges; er zijn 5 tenen.

Na amputatie van een deel van een dergelijke poot bij een axolotl, groeit de overgebleven pootstomp uit tot een lichaamsdeel is gevormd, dat in vorm en functie de "evenknie" is van het verloren gegane. Onmiddellijk na de amputatie retraheren de door-gesneden spieren en de huid. Vanuit de epidermis aan de wondranden breidt zich binnen 36 uur een dermisvrij wondepitheel uit over het oppervlak van de amputatiewond en het daar uitstekende skeletdeel. Overblijfselen van door het trauma gekwetste cellen worden door macrofagen opgeruimd of door het wondepitheel naar buiten "uitgezweten". Alle sub-epidermaal in de pootstomp gelegen weefsels, eerst de zenuwscheden, daarna de spieren, het been of kraakbeen, de vaatwanden en de dermis, reageren op de veranderingen in hun milieu met dedifferentiatie; een proces, waarbij de cellen hun voor de diverse weefsels typische kenmerken verliezen (BALINSKY 1965). Het eerst wordt de dedifferentiatie vlak onder het wondepitheel waargenomen; daarna breidt dit proces zich tot $\frac{1}{2}$ à 1 mm onder het oorspronkelijke amputatievlak uit (CHALKLEY 1954, ANTON 1961, HAY en FISCHMAN 1961, HAY 1962, TRAMPUSCH en HARREBOMÉE 1965a). De dedifferentierende cellen komen — bijvoorbeeld door het oplossen van tussenstof — vrij uit hun oorspronkelijke weefselverband en verplaatsen zich distaalwaarts, om zich onder een verdikt deel van het wondepitheel, de apicale kap, te verzamelen tot een zogenaamd blastema (THORNTON 1954, 1960, 1965). Mogelijk leveren ook primitieve, weinig gedifferentieerde cellen, die te midden van de gedifferentieerde cellen in de weefsels gelegen zijn, hieraan een bijdrage (WEISS 1939, SCHOTTÉ 1939).

Het blastema maakt onder de microscoop de indruk een groep van vrij uniforme cellen te zijn, die elk een grote en ronde kern hebben, omgeven door een zeer dunne laag cytoplasma. Macroscopisch ziet het blastema eruit als een door het wondepitheel bedekt,

afgerond-kegelvormig uitgroei van de pootstomp. Door intensieve proliferatie van de cellen neemt het blastema sterk in omvang toe; het plat zich af en tegelijkertijd zijn bij microscopisch onderzoek de eerste tekenen van redifferentiatie van skelet-elementen te vinden. Als uitwendig aan het afgeplatte blastema de aanleg van tenen zichtbaar wordt, wordt gesproken van een tenenplaat. Door verdere groei en differentiatie ontstaat tenslotte een volledige poot (vergeleijk SINGER 1952, BALINSKY 1965). Het gehele regeneratie-proces neemt enkele weken tot enkele maanden in beslag; de tijdsduur is afhankelijk van de grootte van het deel van de poot dat door regeneratie moet worden vervangen en van de leeftijd van het dier.

Wanneer niet alleen de (voor-)poot is verwijderd, maar tegelijk ook een deel van de schoudergordel, regenereren deze lichaamsdelen volledig. Als echter behalve de poot de gehele schoudergordel — inclusief de erbij behorende spieren — is geamputeerd, sluit de wond zich wel, maar blijft regeneratie uit. Schoudergordel en arm vormen dus kennelijk in dit opzicht een eenheid, een "territoire de régénération" (GUYÉNOT en PONSÉ 1930). Wanneer maar een deel van deze eenheid aanwezig blijft, zal ook bij herhaalde amputatie weer volledige regeneratie optreden.

Als het wondvlak onmiddellijk na amputatie wordt gesloten met een huidlap (dus inclusief dermis) — en zo de vorming van wondepitheel wordt voorkomen — treedt geen regeneratie op. Voor het op gang komen van dit proces wordt dan ook grote betekenis toegekend aan het (dermis-vrije) wondepitheel. Dit zou ófwel de dedifferentiatie van de onderliggende weefsels, en daardoor de productie van blastemacellen bevorderen (POLEZHAEV en FAWORINA 1935, ROSE 1948), ófwel de accumulatie van gedifferentieerde cellen tot een blastema (STEEN en THORNTON 1963) bewerkstelligen.

Tevens zijn de zenuwen, die de pootstomp innervieren, onmisbaar voor de regeneratie van de poot van een salamander (SCHOTTÉ 1926, LOCATELLI 1929, BUTLER en SCHOTTÉ 1941, SINGER 1952). Uit denervatie-experimenten is gebleken, dat het verloop van de dedifferentiatie en, in een latere fase, ook de groei van het regeneraat door de zenuw wordt beïnvloed. Waar precies deze invloed van de zenuw aangrijpt, is nog onduidelijk. Dit is te meer raadselachtig, omdat poten, waarbij de ingroei van zenuwvezels tijdens en na de embryonale ontwikkeling onmogelijk was gemaakt, toch tot regeneratie in staat zijn (YNTEMA 1959, THORNTON en STEEN 1962).

De regeneratie bij amphibia staat verder nog onder invloed van

hormonen. Na extirpatie van de hypofyse of de schildklier blijft regeneratie achterwege (HALL en SCHOTTÉ 1951, RICHARDSON 1945).

Bestraling met röntgenstralen leidt tot een vermindering of zelfs tot een totaal verlies van het vermogen tot regeneratie. Bij verscheidene soorten van amphibia is dit aangetoond voor poten (BUTLER 1931), staart (SCHEREMETJEWA en BRUNST 1933), kaken (GUÉNOT en VALETTE 1925) en lens (POLITZER 1952). Ook bij de axolotl zijn poten na voorafgaande behandeling met röntgenstralen niet meer in staat tot regeneratie (LITSCHKO 1930, TRAMPUSCH 1951). Algemeen werd aangenomen, dat dit verlies van regeneratievermogen definitief is. Sinds 1951 zijn echter door TRAMPUSCH en zijn medewerkers in de Afdeling voor Experimentele Morphologie van het Anatomisch-Embryologisch Laboratorium te Amsterdam gegevens verzameld, die wezen op een herstel van dit regeneratievermogen, dat niet zou berusten op een repopulatie van het bestraalde gebied door onbestraalde cellen. Een recente samenvoeging van de uitkomsten van vele in dit verband uitgevoerde experimenten leidde tot de opstelling van een hypothese, volgens welke er een bepaald mechanisme zou bestaan, dat het effect van röntgenstralen op het regeneratievermogen van de poot en het herstel daarvan zou kunnen verklaren (TRAMPUSCH 1964a). In dit mechanisme is een samenspel tussen het kort na amputatie gevormde wondepitheel en de in de wond aanwezige zenuwen verondersteld, dat onmisbaar is voor de regeneratie. Bestraling zou nu tot gevolg hebben, dat wondepitheel en zenuwen beide niet in staat zijn hun vereiste rol in dit samenspel te vervullen, zodat de regeneratie is geblokkeerd. Is één van beide "normaal", dan herstelt zich door of bij het onderlinge contact de ander, zodat de onmisbare interactie weer tot stand komt en de regeneratie voortgang kan vinden.

Het oorspronkelijke doel van het in dit proefschrift beschreven onderzoek was een nadere analyse van een onderdeel van het bovengenoemde mechanisme. Hoofdstuk I bevat een overzicht van de literatuurgegevens betreffende het effect van röntgenstralen op het regeneratievermogen van poten van amphibia en over een mogelijk herstel daarvan, en eindigt met een probleemstelling. Nadat in hoofdstuk II een algemene toelichting is gegeven op de gebruikte proefdieren en toegepaste werkwijzen, wordt in de hoofdstukken III en IV verslag uitgebracht van de experimenten, uitgevoerd ter verkrijging van een oplossing van het gestelde probleem.

De uitkomsten van deze experimenten waren zeer verrassend. Zij maakten het noodzakelijk, dat bij het onderzoek een andere weg werd ingeslagen dan aanvankelijk werd gedacht. Nadere aandacht moest worden gewijd aan experimenten soortgelijk aan die, op de resultaten waarvan de hypothese betreffende het eerder gereleveerde (herstel-)mechanisme was gegrondvest. De desbetreffende onderzoeken worden beschreven in de hoofdstukken V, VI, VII en VIII. Tegelijk werden nog enige andere, aansluitende onderzoeken verricht, om te trachten het inzicht in de betekenis van de inmiddels verkregen nieuwe gegevens te verdiepen. In hoofdstuk IX wordt tenslotte nagegaan in hoeverre de resultaten van de eigen onderzoeken bijdragen tot een inzicht in het verschijnsel van het herstel van het regeneratievermogen van bestraalde axolotl-poten.

HOOFDSTUK I

LITERATUUROVERZICHT, GEVOLGD DOOR EEN KORTE SAMENVATTING EN DE PROBLEEMSTELLING

INLEIDING

In 1904 werd voor het eerst een invloed van ioniserende stralen op het regeneratievermogen van gewervelde en ongewervelde dieren beschreven. Het was SCHAPER, die toen waarnam, dat jonge salamander-larven niet meer in staat waren tot regeneratie van een geamputeerd deel van poot of staart, nadat zij éénmaal gedurende enkele uren aan de straling van radiumbromide waren blootgesteld. BARDEEN en BAETJER berichtten in hetzelfde jaar, dat röntgenstralen bij trilwormen regeneratie verhinderen. Een dergelijke waarneming kon nadien nog bij verscheidene andere ongewervelde dieren worden gedaan (zie voor een overzicht hiervan CURTIS 1936).

Nader onderzoek naar de invloed van röntgenstralen op het regeneratievermogen van amphibia werd pas ter hand genomen in het begin van de dertiger jaren, onafhankelijk van elkaar door Russische en Amerikaanse onderzoekers. De eersten (LITSCHKO, BRUNST en SCHEREMETJEWA) gebruikten voornamelijk volwassen salamanders (*Triturus*-soorten) en één- of meerjarige axolotls, waarbij de regeneratie van een poot of de staart enkele maanden vergt. De laatsten (BUTLER en medewerkers) waren geïnspireerd door de resultaten bij ongewervelde dieren en kozen als proefdier zeer jonge salamander-larven (*Ambystoma*-soorten): bij deze larven duurt de regeneratie van poot of staart slechts enkele weken.

ONDERZOEK BIJ AXOLOTLIS EN VOLWASSEN EXEMPLAREN VAN *Triturus*-SOORTEN

LITSCHKO (1930) vond, dat éénmalige toediening van röntgenstralen, enkele uren voor amputatie van een extremititeit, bij 1 jaar oude axolotls in lagere doses de regeneratie vertraagde en in hogere doses deze verhinderde. De hoeveelheid straling waaraan de poot zelf was bloot gesteld bleek voor dit effect bepalend. Zo was een onbestraalde poot van een overigens geheel en met een lethale dosis

bestraald proefdier in de periode tot het ogenblik, waarop het dier aan de gevolgen van de bestraling bezweek, nog in staat tot regeneratie.

BRUNST en SCHEREMETJEW (1933) vonden, bij bestraling met röntgenstralen van de achterpoten van volwassen exemplaren van *Triturus cristatus*, dat doses van 10.000 en 4000 r regeneratie in 95 %, resp. 50 % van de gevallen deed uitblijven. Zulk een verlies van regeneratievermogen werd door BRUNST (1950) als definitief beschouwd. Herhaalde amputaties van bestraalde, niet-regenererende pootstompen tot 4 jaar na de bestraling toe, bleven zonder gevolg. Wanneer bij een dosis van 7000 r het kniegebied tegen bestraling beschermd was en de poot met tussenpozen van ruim 3 maanden achtereenvolgens door de voet, de knie en het proximale deel van het bovenbeen werd geamputeerd, volgde alleen in het tweede geval regeneratie. De condities van de weefsels in de stomp, grenzend aan het amputatievlak, waren kennelijk bepalend voor het tot stand komen van een regeneraat (SCHEREMETJEW en BRUNST 1938).

Bij histologisch onderzoek bleek het opgewekte onvermogen tot regeneratie niet met zichtbare afwijkingen in de morfologie van de weefsels gepaard te gaan; wel ontbraken er mitoses. Ook na langere tijd waren in de bestraalde weefsels, met uitzondering van de epidermis, geen celdelingen te vinden. BRUNST (1950) concludeerde daaruit, dat röntgenstralen een blijvende onzichtbare beschadiging van de cellen teweegbrengen, die zich manifesteert in een onvermogen tot celdeling, zodat regeneratie niet meer mogelijk is.

ONDERZOEK BIJ JONGE LARVEN VAN *Ambystoma punctatum*

Verscheidene publicaties werden door BUTLER (1931, 1933) en zijn medewerker PUCKETT (1934, 1936) gewijd aan het hierna te beschrijven experiment. Zij gebruikten daarbij als proefobject de voorpoten van larven van *Ambystoma punctatum* van verschillende leeftijd. Bij de jongste larven was de voorpoot nog in aanleg en niet meer dan een nauwelijks zichtbare verhevenheid; bij de oudere larven (ten hoogste 25 mm lang) waren reeds poten gevormd met 2, 3 of het volledige aantal van 4(!) vingers. In elk experiment werd de rechter voorpoot geamputeerd of de aanleg ervan grotendeels verwijderd, terwijl de linker voorpoot ongemoeid bleef. Gedurende de volgende 3½ week werden de dieren dagelijks in hun geheel ("total body") bestraald met doses tussen de 60 en 150 r.

De geamputeerde rechter voorpoot toonde geen regeneratie; er ontstond een afgeronde stomp, die geleidelijk in omvang afnam (regressie). Evenwel bleek ook de verdere ontwikkeling van de niet geamputeerde linker voorpoot door de bestraling ingrijpend te worden beïnvloed. De eenmaal aangelegde delen groeiden ongestoord verder, maar de differentiatie van nieuwe elementen bleef achterwege. Zo ontstonden, afhankelijk van het stadium, waarin de pootaanleg bij het begin van de reeks bestralingen verkeerde, extremiteiten met 1, 2 of 3 vingers. Dergelijke onvolledige extremiteiten die overigens wel doorgroeiden, bleken bij later uitgevoerde amputatie niet in staat tot regeneratie (PUCKETT 1936).

Hetzelfde effect op het regeneratievermogen, resp. de morfogenese van de voorpoot was te bereiken door een éénmalige totale bestraling met 450 tot 900 r (PUCKETT 1936). Evenals LITSCHKO (1930) vond ook BUTLER (1935), dat het regeneratievermogen slechts geremd werd door de straling, waaraan de poot zelf was blootgesteld; eventuele schade aan andere lichaamsdelen was hiervoor niet van directe betekenis. Bij larven van *Eurycea bislineata*, die relatief langere extremiteiten hebben dan de eerder gebruikte larven van *Ambystoma punctatum*, gelukte het uitsluitend de elleboogstreek te bestralen (BUTLER en O'BRIEN 1942). Wanneer nu met tussenpozen van enige weken amputaties werden verricht distaal van, door en proximaal van de bestraalde zone, werd successievelijk wel, geen en weer wel regeneratie waargenomen. Evenals bij de volwassen *Triturus* (SCHEREMETJEW en BRUNST 1938) bleek dus het regeneratievermogen ook bij deze larvale amphibia afhankelijk van het al of niet bestraald zijn van de weefsels, die aan het amputatievlak grenzen.

Histologisch onderzoek bracht geen morfologische verschillen aan het licht tussen onbestraalde en bestraalde pootstompen gedurende de eerste 6 dagen na amputatie (BUTLER 1933). De wondsluiting, de initiele dedifferentiatie van het skelet en de ophoping van blastemacellen onder de over de wond gemigreerde epidermis, verliepen op vrijwel dezelfde wijze. Bij onbestraalde pootstompen neemt vervolgens het blastema in omvang toe door toevoeging van gededifferentieerde cellen en door frekwente deling van de blastemacellen. Op de 11e dag na amputatie door de bovenarm wordt centraal in het blastema een concentratie van spoelvormige cellen zichtbaar, die met hun lengte-as in het verlengde van de humerusstomp liggen en korte tijd later een kraakbenige tussenstof

beginnen af te zetten. Zij vormen de vroegste aanleg van het skelet van het toekomstige regeneraat. Tegelijk met dit eerste blijk van differentiatie in het blastema komt de dedifferentiatie van skelet en spieren in de stomp tot stilstand. Aan deze gelijktijdigheid hecht BUTLER (1935) bijzondere betekenis: "This coincidence suggests that in normal regeneration the initiation of differentiation may, in some manner, serve as a check on the process of dedifferentiation". Het blastema van bestraalde pootstompen toont daarentegen ook na de 6e dag vrijwel geen celdelingen; het wordt geleidelijk zelfs armer aan cellen. Differentiatie in dit "pseudo-blastema" blijft uit; de dedifferentiatie gaat voort. Volgens BUTLER wijst ook dit op de juistheid van zijn zoëven geciteerde zienswijze. Na de humerus wordt ook de scapula grotendeels "opgelost", zodat ter plaatse van de voorste extremitet slechts een kleine verhevenheid overblijft, bestaande uit morfologisch indifferente cellen, bekleed met epidermis.

In bestraalde niet-geamputeerde pootknoppen of poten blijken vele mesenchym-cellen te gronde te gaan, terwijl de in leven blijvende cellen zoals PUCKETT (1936) zegt, "are rendered powerless to differentiate".

De waarnemingen aan bestraalde, geamputeerde poten en aan niet-geamputeerde, bestraalde pootknoppen tezamen, gaven BUTLER (1933) aanleiding tot de veronderstelling, dat bij het effect van röntgenstralen op het regeneratievermogen en de embryonale morfogenese 2 factoren samenspelen t.w. (1) het verlies van het vermogen tot celdeling — dit is in overeenstemming met de eerder genoemde opvatting van BRUNST — en (2) het verlies van het vermogen tot differentiatie. De zeer sterke dedifferentiatie in de bestraalde, geamputeerde poten, leidend tot hun uiteindelijke complete regressie, zou hieraan secundair zijn (BUTLER en PUCKETT 1940).

De invloed van röntgenstralen op het vermogen tot differentiatie werd, zoals hierna te bespreken, door HORN met nieuwe waarnemingen geadstrueerd en bovendien in andere termen geformuleerd.

AANTASTING VAN HET MORFOGENETISCH VELD

HORN (1942), een leerling van BUTLER, bestudeerde het effect van verschillende doses neutronenstralen op het regeneratievermogen van poten bij larvale *Ambystoma punctatum*. Evenals voor röntgenstralen was vastgesteld bleef ook hier na toediening van een hogere

dosis (62 n) regeneratie uit, terwijl een lage dosis (10 n) slechts resulteerde in een vertraging. Bij een ertussenin liggende dosis (42 n) vond deze auteur, dat de normaliter in het blastema optredende differentiatie, leidend tot de eerste aanleg van het skelet in het regeneraat, op een merkwaardige wijze was gestoord. De axiale concentratie en de orientatie van de blastemacellen bleven namelijk achterwege, terwijl de anders hierna optredende productie van een kraakbenige tussenstof wel werd waargenomen, maar nu verspreid. Dit leidde tot de vorming van onregelmatige kraakbeenpartijen.

De door blastemacellen in een onbestraalde pootstomp getoonde tendenties tot rangschikking volgens een bepaald ruimtelijk patroon en tot productie van een kraakbenige tussenstof, tezamen verantwoordelijk voor de aanleg van het skelet, interpreteert HORN als uitingen van een morfogenetisch veld in de zin van WEISS (1939).

Onder "fields" verstaat WEISS "organizing factors, which cause the originally indefinite course of the individual parts of a germ to become definite and specific . . . in compliance with a typical pattern". Volgens deze opvatting ontstaat bijvoorbeeld de poot in de embryonale periode onder invloed van een "poot-veld". Ook in de volwassen salamander blijft het "poot-veld" in deze zin nog bestaan in het poot-territorium (GUYÉNOT en PONSE 1930); juist dit zou het mogelijk maken, dat hier post-embryonaal nog poten opnieuw worden gevormd: regeneratie. Het uitblijven van orientatie en concentratie der blastemacellen volgens HORN te beschouwen als "the first observable evidence that the limb field has been affected". Hogere dosis zouden het morfogenetisch veld nog sterker aantasten, zodat dan ook de productie van tussenstof onmogelijk zou worden en tenslotte regeneratie geheel achterwege zou blijven.

"Preventing differentiation of cells", door BUTLER (1933) genoemd als een kernmerk van de invloed van röntgenstraling op het regeneratievermogen en de morfogenese, werd dus in de terminologie van WEISS (1939) vertaald als aantasting, resp. vernietiging van het morfogenetisch veld.

BESTRAALDE EXTREMITETEN MET ONBESTRAALDE IMPLANTATEN

Verscheidene auteurs (o.a. UMANSKI 1937) hebben zich afgevraagd, of aan bepaalde weefsels in de na amputatie overblijvende pootstomp een overwegend belang kon worden toegeschreven voor de vorming

van het regeneraat. De genoemde auteur meende op grond van het werk van BRUNST en SCHEREMETJEWA (1933), dat de weefsels van een bestraalde stomp veelal niet meer in staat waren om blastemacellen te leveren. Door nu de verschillende incapabele weefsels van een bestraalde pootstomp afzonderlijk te vervangen door soortgelijk, maar onbestraald weefsel, poogde UMANSKI (1937) het belang van elk dezer weefsels voor de regeneratie te onderzoeken. Hierbij bleek, dat indien in bestraalde (5000 of 10.000 r) pootstompen van 1 jaar oude axolotls het skelet, de huid of de spieren vervangen werden, telkens regeneraten — hetzij goed gevormde poten, hetzij pootachtige delen met overvloedige tenen — tot ontwikkeling kwamen. UMANSKI concludeerde hieruit, dat de beproefde weefsels ieder afzonderlijk het gehele regeneraat, met alle daarin voorkomende weefsels, konden vormen en dat dus bij het ontstaan van blastemacellen een zo verregaande dedifferentiatie moest worden voorondersteld, dat metaplasie van bijvoorbeeld kraakbeen tot spiercel mogelijk werd. Op deze mening zou de auteur later (1946) terugkomen, toen bij histologisch onderzoek bleek, dat de regeneraten, gevormd uit bestraalde pootstompen, die bedekt waren met een onbestraalde huid, nauwelijks enig spierweefsel bevatten. Dit wees er immers op, dat blastemacellen, die zijn voortgekomen uit de dermis van de geïmplanteerde onbestraalde huid, de potentie om tot spiercel te differentieren vrijwel missen. Verder werd door UMANSKI (1937) nog aangetoond, dat implantatie van huid en spier, afkomstig van een onbestraalde staart, resulteerde in de vorming van min of meer vinvormige regeneraten, en dat de huid van de kop geen regeneratie kon opwekken. Dit laatste zou volgens de auteur daaraan zijn te wijten, dat “in der Kopfhaut die Extremitäten-Potenzen fehlen”.

THORNTON (1942) — werkzaam in het laboratorium van BUTLER — maakte, teneinde speciaal de dedifferentiatie van spierweefsel histologisch nader te bestuderen, gebruik van een techniek, die enige overeenkomst toonde met die van UMANSKI. THORNTON implanteerde bij volwassen exemplaren van *Triturus viridescens* spierweefsel, afkomstig uit een onbestraalde extremitet, in een bestraalde extremitet op de plaats van de tevoren verwijderde humerus. In 14 van de 70 gevallen bleken, na amputatie van de bestraalde poten door het niveau van het implantaat, regeneraten gevormd te worden; dit waren poten met zowel skelet- als spierweefsel.

UMANSKI en THORNTON waren beiden van mening, dat de door

hen waargenomen regeneraten, eventueel met uitzondering van de epidermis, geheel waren voortgekomen uit het onbestraalde implantaat.

TRAMPUSCH zette dit type van onderzoek in de vijftiger jaren voort, maar hij kwam — op grond van zijn resultaten — inzake de herkomst van de regeneraten tot een geheel andere zienswijze.

Volgens TRAMPUSCH (1957, 1959a) is bij ongeveer 4 maanden oude axolotls (lengte ± 70 mm) bestraling van de lumbo-sacrale streek en de achterste extremiteten met een dosis röntgenstralen van 1000 r voldoende, om regeneratie van de laatste te verhinderen. Bij histologisch onderzoek bleken bij dergelijke bestraalde pootstompen de onmiddellijk na amputatie optredende retractie van huid en spieren, de sluiting van de wond door migratie van het epitheel vanaf de wondranden en de opruiming van de bij de amputatie beschadigde cellen geheel op dezelfde wijze te verlopen als bij onbestraalde pootstompen. Een opvallend verschil was echter, dat de migratie van epidermiscellen vanaf de wondrand bij een bestraalde stomp niet ophield, zodat het de oorspronkelijke wond bedekkende epitheel een dikte van vele cellagen bereikte en zelfs in slierten werd afgestoten. De bestraalde stomp toonde daarna geen verdere groei en in de meeste gevallen evenmin regressie. De onder de epidermis gelegen weefsels van zulk een stationaire stomp hadden een rustig aspect al waren er geringe tekenen van afbraak van het skelet. Het subdermale bindweefsel leek rijker aan cellen en vezels dan in een onbestraalde niet-regenererende poot het geval is; het aantal celdelingen was zeker geringer, afwijkende kern-delingsfiguren werden niet frekwenter dan normaal waargenomen (TRAMPUSCH 1957).

Vervanging van huid, skelet of spier van een bestraalde poot door gelijksoortige elementen uit een onbestraalde extremitet, had bij daarna uitgevoerde amputatie door het implantaat regeneratie tot gevolg; er ontstonden poten of pootachtige vormsels (TRAMPUSCH 1951, 1959a). In tegenstelling tot de bevindingen van UMANSKI werd nu geen afwijkende histologische opbouw van de regeneraten, voortgekomen uit bestraalde pootstompen met onbestraalde poot-huid als implantaat, vastgesteld. Het feit, dat juist in deze gevallen de fraaiste regeneraten ontstonden, gaf TRAMPUSCH (1951) zelfs aanleiding bij de morfogenese van het regeneraat aan de huid een bijzondere taak toe te kennen.

Dat de regeneraten geheel zouden zijn ontstaan uit cellen, af-

komstig van het onbestraalde implantaat (UMANSKI, THORNTON), achtte TRAMPUSCH (1957, 1958*b*, 1959*a*) onwaarschijnlijk vanwege de verregaande metaplasie, die dan zou moeten worden voorondersteld: "... that bone or muscle could be derived from skin epithelium would suppose such a remodelling of the structure that this is hardly conceivable". Daarom stelde hij zich voor, dat de incapabele weefsels van de bestraalde stomp door het onbestraalde implantaat zouden worden "gereactiveerd"; dat dus het tengevolge van de bestraling verloren gegane regeneratievermogen zou worden hersteld. Histologisch onderzoek gaf ook een aanwijzing in deze richting: de overeenkomst tussen de regeneratie van een onbestraalde pootstomp en die van een bestraalde stomp met een onbestraald implantaat (skelet) was zo groot, dat de volgende conclusie werd getrokken: "Apparently the bonegraft has completely offset the effect of irradiation, thereby restoring the power of regeneration" (TRAMPUSCH 1959*a*).

Een direct voorbeeld van herstel van een bestraald weefsel door contact met een onbestraald implantaat werd gezien in het volgende. De afwijkingen (sterke verdikking, afstoting in slierten) van het wondepitheel, gevormd door bestraalde epidermis, bleken afwezig te zijn, waar dit epitheel gelegen was boven het onbestraalde implantaat, een humerus, die als reactie op de amputatie reeds dedifferentiatie toonde. Het afwijkende wondepitheel zou hier, door het contact met het dedifferentierende implantaat (bot of spier) worden gereactiveerd (TRAMPUSCH 1959*a*). Daardoor zou het wondepitheel tevens weer het vermogen hebben zijn bijzondere functie in het proces der regeneratie te vervullen; en dat goed functioneren van het wondepitheel zou volgens TRAMPUSCH van doorslaggevende betekenis zijn voor de regeneratie van een bestraalde pootstomp.

Met betrekking tot het effect van röntgenstralen op het regeneratievermogen van axolotlpoot en het herstel daarvan, kwam TRAMPUSCH (1957, 1959*a*) op grond van bovenstaande proeven dus tot de volgende drie veronderstellingen:

(1) Het uitblijven van regeneratie van een bestraalde pootstomp is primair het gevolg van een effect van de röntgenstralen op de huid, waardoor deze geen volwaardig wondepitheel kan vormen, in die zin, dat het niet in staat is, om, zoals een wondepitheel van een onbestraalde poot, direct of indirect het tot stand komen van een blastema te bevorderen.

(2) Indien het wondepitheel volwaardig is, zoals het geval is

wanneer het voorkomt uit geïmplanteerde onbestraalde huid, dan zal de overigens bestraalde stomp een regeneraat vormen.

(3) Een onvolwaardig wondepitheel kan worden gereactiveerd door contact met een onbestraald implantaat (bot, spier), met als gevolg dat regeneratie weer kan optreden. De regeneratie komt dan ook volgens deze zienswijze tot stand door een keten van reacties. Is één schakel, bijvoorbeeld het wondepitheel verbroken (onvolwaardig) dan is het gehele proces geblokkeerd. Zodra de schakel is hersteld, komt de regeneratie weer op gang.

Welke eigenschap van het onbestraalde implantaat voor het herstel van het regeneratievermogen van de bestraalde poten verantwoordelijk moet worden geacht, is een vraag, die door TRAMPUSCH (1958*a*, 1958*b*, 1958*c*, 1959*b*, 1963) in verscheidene publicaties wordt behandeld. Allereerst mocht gesteld worden, dat deze eigenschap bij bestraalde weefsels afwezig is. Hierop wijst het onvermogen tot regeneratie van bestraalde pootstompen en ook het feit, dat implantatie van bestraalde weefsel (femur) de regeneratie niet op gang kan brengen (TRAMPUSCH 1957). Volgens TRAMPUSCH zou een tweede kenmerk van deze eigenschap zijn, dat deze slechts is aan te tonen in de weefsels van poten en staart en met name niet in de mandibula of de huid van de romp, hoewel beide laatste op hun natuurlijke plaats heel goed tot regeneratie in staat zijn (HADORN en CHEN 1953, GUYÉNOT en VALLETTE 1925). Als implantaat in een bestraalde pootstomp bevorderden zij de regeneratie daarvan niet (TRAMPUSCH 1958*b*). De huid en de wervelkolom van een onbestraalde staart daarentegen, zouden wel de weefsels van de bestraalde stomp kunnen reactiveren, gezien de omvangrijke staart- of vinachtige regeneraten, die door pootstompen met dergelijke implantaten werden gevormd. Een derde kenmerk werd door TRAMPUSCH afgeleid uit het volgende. In een bestraalde pootstomp kan de epidermis de wond sluiten en moeten, gezien de her en der waar te nemen kerndelingsfiguren, ook de mesodermale weefsels tot mitose in staat zijn. Wat eigenlijk lijkt te ontbreken, is het voor de regeneratie vereiste, stimulerende samenspel tussen de diverse weefsels, aanwezig in de amputatie-wond. De bestraalde stomp kan dus niet regenereren, omdat "some coordinating factor is wanting"; een onbestraald implantaat, afkomstig uit bepaalde lichaamsdelen, kan het vermogen tot regeneratie herstellen door deze "coordinating factor" in te brengen. TRAMPUSCH meent tenslotte, dat deze "coordinating factor" niets anders is als het morfogenetisch veld

in de zin van WEISS en duidt deze factor voortaan dan ook als zodanig aan.

Het primaire effect van bestraling zou dus niet een verhindering van celdeling zijn, maar een aantasting, resp. vernietiging van het morfogenetisch veld (TRAMPUSCH 1958a). Tot zover komt deze conclusie overeen met hetgeen eerder en op andere gronden door HORN (1942) was verondersteld. TRAMPUSCH gaat echter nog verder; volgens hem is het morfogenetisch veld van een bestraalde en daardoor "veld-arme" stomp ook weer te herstellen, en wel door implantatie van "veld-rijk" materiaal. Is dit laatste van een poot afkomstig, dan volgt de ontwikkeling van een poot; een van de staart afkomstig implantaat "reinitiates regeneration, but enforces on the limb a strange development, arranging the material according to the pattern of the new field" (TRAMPUSCH 1958b). Aan het veld worden hier dus twee invloeden toegeschreven: wat eerder genoemd werd de reactivatie van de weefsels in de bestraalde stomp (d.i. het herstel van het vermogen tot regeneratie) en de bepaling van de aard van het te vormen regeneraat.

De hierboven geschetste zienswijze van TRAMPUSCH over het effect van röntgenstralen op het regeneratievermogen van de poot bij de axolotl en zijn reversibiliteit is niet zonder tegenspraak gebleven.

STINSON (1963, 1964a, 1964b, 1964c), uit de school van BUTLER, kwam tot de overtuiging, dat onder invloed van een onbestraald implantaat geen herstel van het regeneratievermogen van bestraalde pootweefsels kon plaats vinden. Zijn mening was gebaseerd op de volgende experimenten. Bij volwassen exemplaren van *Triturus viridescens* werd de rechter voorpoot bestraald en even proximaal van de elleboog geamputeerd. Daarna werd via de amputatiewond de humerus geheel of gedeeltelijk verwijderd en op zijn plaats de basis van een onbestraald implantaat ingeschoven. Dit laatste bestond uit een gehele of een in de lengte gehalveerde onderarm en hand, die in de voorafgaande 2 maanden door regeneratie ontstaan waren aan de linker voorpoot. Na amputatie door het distale deel van de bestraalde rechter bovenarm, met daarin een stuk van de onbestraalde linker onderarm, werden regeneraten gevormd. Deze sloten niet alleen aan bij het amputatievlak door de onderarm maar waren ook linkszijdig van karakter, getuige de wijze van differentiatie van de vingers.

Deze resultaten wezen er volgens STINSON op, dat het regeneraat ontstond door een massale bijdrage van het implantaat. Evenwel zijn zij ook in overeenstemming met hetgeen op grond van TRAMPUSCH's zienswijze mocht worden verwacht: het morfogenetisch veld van het onbestraalde implantaat kan immers in de bestraalde stomp hebben gedomineerd.

Was het implantaat niet van hetzelfde maar van een ander dier van dezelfde soort afkomstig, dan werd in een overigens als boven uitgevoerd experiment slechts gedurende de eerste 5 weken na amputatie de vorming van een regeneraat waargenomen; daarna staaakte dit regeneraat dan plotseling zijn groei en ging in regressie, zodat in de 12e week alleen een gladde stomp over was.

STINSON wijt de stilstand en de daaropvolgende regressie aan afweerreacties van de gastheer tegen het homoplastische implantaat, zoals bij volwassen urodelen wel meer is beschreven. Hij acht hiermee de herkomst van de blastemacellen uitsluitend uit het implantaat zo goed als bewezen. Wel geeft de auteur zelf toe, dat het niet uitgesloten is, dat cellen uit de bestraalde stomp tegelijk met het morfogenetisch veld de immunologische identiteit van het implantaat overnemen; ook is het mogelijk, dat van de stomp afkomstige cellen bij de regressie van het regeneraat mee ten onder gaan met de van het implantaat afstammende cellen. Desondanks verwerpt hij de zijns inziens speculatieve zienswijze van TRAMPUSCH over het herstel van het regeneratievermogen geheel.

SKOWRON en ROGUSKI (1958) en LAGAN (1961) menen, dat de kleine atypische regeneraten, die gevormd worden uit bestraalde pootstompen, waarin celsuspensies, gemaakt van bind- of spierweefsel uit een onbestraalde staart, poot of kop, zijn ingespoten, ook geheel uit het "implantaat" stammen. Zij vonden bij histologisch onderzoek geen enkele aanwijzing voor een bijdrage van de bestraalde weefsels en ontkennen daarom, dat het regeneratievermogen van deze weefsels is hersteld.

LAZARD (1959, 1965) maakte bezwaren tegen de opvatting, dat het morfogenetisch veld door bestraling zou worden aangetast (TRAMPUSCH 1958a, 1958b, 1958c, 1959b, 1963; HORN 1942). Zij toetste de "pouvoir inducteur" van een bestraalde axolotl-poot door daarin weinig gedetermineerde cellen van embryonen (gastrulae) in te brengen. Bij amputatie op het niveau van het implantaat vormden zich in verscheidene gevallen teratomen en bij 10 % van

de proefdieren werd — volgens de auteur — uit de ingebrachte cellen een poot geregenereerd. Het voorkomen van deze geregenereerde poten zou bewijzen, dat de "pouvoir inducteur" door de röntgenstralen niet is aangetast. KIORTSIS (1965) betwijfelde, of de herkomst van de cellen van de door LAZARD waargenomen regeneraten tot de geïmplanteerde nieuwe bron beperkt is gebleven, en suggereerde, dat het stralingseffect in de bestraalde pootweefsels geneutraliseerd is door de embryonale cellen, zodat de potentie tot regeneratie — tevoren gedoofd — zich weer kan manifesteren.

Hoewel het naar de letter gerekend in dit kader — bestraalde poten met onbestraalde implantaten — niet thuis hoort, zij tenslotte nog een experiment van Goss (1957) genoemd. Deze onderzoeker beperkte de bestraling (2000 r) nauwkeurig tot een overlangse helft van een onderbeen bij volwassen exemplaren van *Triturus viridescens*. Daarna uitgevoerde amputatie door het onderbeen resulteerde in een regeneratieproces, dat alleen uitging van de onbestraalde helft. De regeneraten bestonden dienovereenkomstig alleen uit de bijpassende helft van de voet en hadden gemiddeld de helft van het normale aantal tenen. Evenals in een bestraalde stomp met een onbestraald implantaat waren ook hier in het amputatievlak zowel bestraalde als onbestraalde weefsels aanwezig; er werd echter geen enkele aanwijzing gevonden voor een herstel van de bestraalde weefsels. Goss (1961) geeft later nog als zijn mening, dat het effect van röntgenstralen op het regeneratievermogen is terug te brengen tot een onherstelbare blokkering van de celdeling.

HET REGENERATIEVERMOGEN VAN BESTRAALDE EXTREMITATEN IN RELATIE TOT DE INNERVATIE

Een nieuw element in de discussie over het herstel van het regeneratievermogen bracht TRAMPUSCH's medewerker VERGROESEN (1958). Het was uit eerder het werk van LOCATELLI (1929), SCHOTTÉ (1926) en SCHOTTÉ en BUTLER (1941) en later ook uit dat van SINGER (zie voor overzichten SINGER 1952, 1964, 1965) duidelijk geworden, dat zenuwen voor de regeneratie van verscheidene lichaamsdelen — waaronder de poten — van amphibia onontbeerlijk zijn. VERGROESEN opperde nu het vermoeden, dat röntgenstralen deze zenuw-invloed zouden kunnen uitschakelen en aldus de regeneratie verhinderen. Om deze veronderstelling te toetsen verzag VERGROESEN bestraalde extremiteten van omstreeks 5 maanden

oude axolotls van een onbestraalde zenuw, waarbij hij als volgt te werk ging. De nervi ischiadici uit beide achterpoten werden zodanig vrijgeprepareerd, dat hun verbindingen met het ruggemerg en de spinale ganglia gespaard bleven, en vervolgens geschoven onder de huid van de romp, aansluitend aan de pootbasis. De rechter nervus ischiadicus werd onmiddellijk weer in zijn oorspronkelijke positie teruggelegd (controle op het trauma), nog vóór een nauwkeurig tot de achterpoten beperkte bestraling (1500 r) werd uitgevoerd. Na deze bestraling werd ook aan de linker zijde de nervus ischiadicus, die in zijn afwijkende positie tegen de stralen beschermd was geweest, weer in de poot teruggeplaatst. Vier dagen later werden beide achterpoten door het kniegewricht geamputeerd. De bestraalde pootstompen, voorzien van een onbestraalde zenuw (links), bleken nu tot regeneratie in staat, de bestraalde stompen met een bestraalde, maar overigens gelijk behandelde zenuw (rechts) niet.

De mogelijkheid, dat niet de axonen in de onbestraalde zenuw maar de schede van SCHWANN of bindweefselcellen verantwoordelijk waren voor deze regeneratie, werd verworpen, het bleek immers, dat implantatie van een los stuk zenuw, afkomstig uit een onbestraalde poot en geïmplanteerd in een bestraalde, het regeneratievermogen van deze laatste niet deed terugkeren.

VERGROESEN (1958) concludeerde uit deze experimenten, dat ten eerste onbestraalde axonen de regeneratie van een overigens bestraalde pootstomp aanzetten, resp. mogelijk maken, ten tweede deze invloed van de axonen door bestraling teniet wordt gedaan, en ten derde het effect van röntgenstralen op het regeneratievermogen van de poot primair berust op een beschadiging of functieverandering van de axonen. TRAMPUSCH (1959a, 1964a) schreef de door VERGROESEN waargenomen regeneratie van bestraalde pootstompen, voorzien van een onbestraalde zenuw, toe aan een reactivatie van het door bestraalde huid gevormde, dus onvolwaardige, wondepitheel door het contact met de onbestraalde axonen.

Dat uitsluitend onbestraalde zenuwcellichamen in ruggemerg of ganglia het vermogen hadden om het effect van bestraling op de axonen in de periferie (de poot) op te heffen, werd — evenals het verloren gaan van dit vermogen door bestraling van ruggemerg en ganglia — afgeleid uit de volgende experimentele uitkomsten (VERWOERD 1963). Bij axolotls, waarvan de achterste extremiteten

en ook het lumbo-sacrale deel van de romp waren bestraald (1000 r), toonden de achterpoten na een eerste amputatie en na tot tweemaal toe met tussenpozen van $1\frac{1}{2}$ maand herhaalde amputaties (ter verwijdering van inmiddels gevormd littekenweefsel) geen regeneratie. Was echter de lumbo-sacrale streek, waarin ruggemerg en ganglia, tegen straling beschermd geweest dan bleken na de laatste reamputatie wel regeneraten te worden gevormd.

Tot dusver is van een herstel van het regeneratievermogen van een bestraalde poot sprake geweest, als of onbestraalde huid, spier of bot, afkomstig uit poot of staart ("veld-rijk"), of onbestraalde, dan wel vanuit onbestraalde zenuwcellichamen herstelde axonen in de amputatiewond aanwezig waren. Er moet nu nog een derde situatie worden genoemd, waarin regeneratie ondanks bestraling mogelijk bleek.

Bij een bestudering van de dedifferentiatie van de diverse weefsels voorkomend in de pootstomp deed HARREBOMÉE (zie TRAMPUSCH, HARREBOMÉE en VERWOERD 1963 en TRAMPUSCH 1964a) ondermeer de volgende proef. Na voorafgaande bestraling van het lumbo-sacrale gebied en de achterpoten bij omstreeks 80 mm lange axolotls, devieerde zij de nervus ischiadicus uit de linker achterpoot onderhuids naar de flank en bracht deze vervolgens daar in contact met een homoplastisch implantaat. Dit laatste bestond uit een lapje onbestraalde poothuid met centraal erin een rond gat (een zg. venster); dit was zóver naar craniaal — tot in onbestraald gebied — aangebracht, dat het einde van de gedevieerde zenuw tot het midden van het venster reikte. Enkele dagen later werd onder het wond-epitheel, dat het venster inmiddels had gesloten, een onbestraalde proximale epiphysis femoris geschoven. De beide achterpoten werden geamputeerd. Dit experiment was in het bijzonder bedoeld om gegevens over dedifferentiatie van het skelet te verkrijgen.

In de flank was de gedevieerde (en bestraalde) zenuw geconfronteerd met omstandigheden, gelijkend op die in een onbestraalde pootstomp, kort na amputatie: een dermisvrij wondepitheel met daaronder een beschadigd skeletdeel. Zoals verwacht was, ontstond hier inderdaad een ectopische poot. Aan de geamputeerde bestraalde pootstompen werd aanvankelijk niets opvallends waargenomen: de wond sloot zich, waarna met tussenpozen, zoals na bestraling gebruikelijk, epitheelstiertjes werden afgestoten. Na enige weken verschenen echter geheel onverwachts aan beide pootstompen blastemata, die uitgroeiden tot kleine, maar normaal gevormde

extremiteiten. Bovendien merkte HARREBOMÉE (persoonlijke mededeling) op, dat er geen correlatie bestond tussen de mate van ontwikkeling van een ectopische poot uit het implantaat en de mate van regeneratie van de pootstompen. Ook bleek, dat gevensterde huid van de staart afkomstig van vlak achter de cloaca, waaruit nooit ook maar enig ectopisch vormsel voortkomt, in contact gebracht met de gedevieerde zenuw, eenzelfde positieve invloed had op het regeneratievermogen van de bestraalde pootstompen. Omdat de dosis röntgenstralen (1000 r), waarmee de poten tevoren behandeld waren, toch voldoende moest worden geacht om regeneratie te onderdrukken (TRAMPUSCH 1959a), moest ook hier een werkelijk herstel van het regeneratievermogen van de bestraalde achterpoten worden aangenomen. Voor dit herstel werd het contact van de gedevieerde zenuw met het onbestraalde implantaat in de flank verantwoordelijk gesteld (TRAMPUSCH, HARREBOMÉE en VERWOERD 1963).

Dit experiment leverde — zonder dat dit overigens primair beoogd was — een duidelijke aanwijzing op, dat een herstel van het regeneratievermogen van bestraalde pootstompen inderdaad mogelijk was, omdat in dit geval geen cellen uit een onbestraald implantaat het regeneraat hadden kunnen opbouwen, zoals dit bijvoorbeeld door STINSON (1964c) verondersteld was.

Naar aanleiding van de bevindingen bij deze proef heeft TRAMPUSCH (1964a) een hypothese opgesteld, die het herstel van het tevoren door bestraling onderdrukte regeneratievermogen begrijpelijk kan maken. In deze hypothese heeft TRAMPUSCH alle door hem en zijn medewerkers tot dan toe verkregen resultaten verwerkt, en bovendien nog andere, hierna te releveren waarnemingen, die wezen op een bijzondere betekenis van de relatie tussen zenuw en wondepitheel.

MECHANISME VAN HET HERSTEL VAN DOOR BESTRALING VERLOREN GEGAAN REGENERATIEVERMOGEN

Bij histologische bestudering van onbestraalde pootstompen, slechts enkele uren na amputatie gefixeerd, hadden TRAMPUSCH en HARREBOMÉE (1965a) ontdekt, dat zenuwvezels, uitspruitend uit de afgesneden einden van de grootste zenuwen, massaal in het dermisvrije wondepitheel penetreerden. Deze opvallende verbinding tussen zenuw en wondepitheel kon gezien worden als een morfologische bevestiging van de reeds door ROSE (1948, 1964) als van door-

slaggevend belang voor het optreden van regeneratie beschouwde relatie tussen zenuw en wondepitheel. Meer gewicht kreeg deze waarneming nog, toen bleek, dat een dergelijke verbinding in de pootstompen, die ten gevolge van bestraling niet konden regenereren, niet was aan te tonen (TRAMPUSCH 1965, TRAMPUSCH en HARREBOMÉE 1965b). Ook zou het niet tot stand komen van zulk een verbinding er de oorzaak van kunnen zijn dat men, wanneer de amputatiewond onmiddellijk met een huidlap wordt gesloten, geen regeneratie waarneemt (GODLEWSKI 1929). TRAMPUSCH (1964a, 1965, 1966) beschouwt daarom de interrelatie tussen huid (bedoeld wordt wondepitheel) en zenuw als de gangmaker van de regeneratie van onbestraalde pootstompen of van bestraalde pootstompen, waarvan het regeneratievermogen was hersteld.

Eerder was al geconcludeerd, dat:

- (a) regeneratie van een bestraalde pootstomp kan uitblijven ten gevolge van door röntgenstralen veroorzaakte veranderingen in de huid (TRAMPUSCH 1957, 1959a) of van de axonen (VERGROESEN 1958),
- (b) een bestraalde stomp tot regeneratie in staat is, wanneer uit onbestraalde geïmplanteerde huid een volwaardig wondpitheel is gevormd (TRAMPUSCH 1959a) of wanneer de zenuw onbestraald is gebleven en de axonen het wondepitheel kunnen reactiveren (VERGROESEN 1958, TRAMPUSCH 1959a) en
- (c) onbestraalde zenuwcellichamen de werking van hun in de periferie bestraalde axonen tot herstel kunnen brengen, zodat bij een nadien uitgevoerde amputatie weer regeneratie zal optreden (VERWOERD 1963).

TRAMPUSCH (1964a) meent nu, dat niet alleen onbestraalde axonen na amputatie een onvolwaardig wondepitheel kunnen reactiveren en daardoor een gangmakende huid-zenuw relatie tot stand brengen, maar dat ook bestraalde axonen en hun bestraalde zenuwcellichamen zich door contact met een volwaardig (onbestraald) wondepitheel kunnen herstellen, met hetzelfde gevolg voor de huid-zenuw relatie en de regeneratie. Deze laatste veronderstelling is gebaseerd op de eerder genoemde onverwachte regeneratie van bestraalde achterpoten, wanneer een daaruit naar de flank gedeveerde zenuw in contact is gebracht met condities, zoals die ook in een onbestraalde pootstomp kort na amputatie bestaan (HARREBOMÉE, zie TRAMPUSCH 1964a). Dit resultaat wordt namelijk

door TRAMPUSCH (1964a) als volgt geïnterpreteerd. De gedeveerde zenuw komt in contact met het volwaardig wondepitheel (gevormd in het venster van het onbestraalde huidlapje) en herstelt zich daardoor. Het herstel van de bestraalde axonen van de gedeveerde zenuw breidt zich centripetaal uit tot de bestraalde perikarya. Van hieruit herstellen zich dan ook de axonen in de bestraalde pootstompen, waardoor het wondepitheel daar ook wordt geactiveerd, een gangmakende wondepitheel-zenuw relatie tot stand komt en met enige vertraging regeneratie intreedt.

Is het huid-implantaat op de bestraalde poot zelf aangebracht, dan zou in wezen hetzelfde mechanisme een rol spelen en daarmee uiteindelijk verantwoordelijk zijn voor het op gang komen van de regeneratie. De merkwaardige bemiddelende functie, die de zenuw in dit mechanisme vervult, gaf TRAMPUSCH (1964a) aanleiding de "nerves as morphogenetic mediators" te zien.

Bij het voorgaande zij aangetekend, dat het met behulp van de gegeven voorstelling niet goed te begrijpen is, waarom het contact tussen een nervus ischiadicus en een onbestraald implantaat in de poot slechts leidt tot een herstel van het regeneratievermogen van alleen de betreffende bestraalde poot, terwijl het contact tussen dezelfde zenuw, maar dan gedeveerd naar de flank, en een daar aangebracht onbestraald implantaat, tot een herstel van het regeneratievermogen in beide achterpoten leidt. Ook moet nog worden opgemerkt, dat er geen experimenteel bewijs voor is geleverd, dat bij de proef van HARREBOMÉE de gedeveerde zenuw, zich juist door het contact met het wondepitheel herstelt, en dat dit niet bijvoorbeeld een gevolg is van het contact van deze zenuw met de geïmplanteerde tot dedifferentiatie overgaande epiphysis femoris.

KORTE SAMENVATTING VAN DE VOORNAAMSTE LITERATUUR-GEGEVENS

(1) Alle auteurs zijn het erover eens, dat door behandeling met röntgenstralen het regeneratievermogen van poten van salamanders is te onderdrukken.

(2) Voor het onvermogen van een bestraalde poot om te regenereren zijn door diverse auteurs in de loop van de tijd verschillende oorzaken aangegeven:

- (a) een onvermogen tot celdeling (BRUNST 1950, Goss 1961),
- (b) een onvermogen tot celdeling en tot celdifferentiatie (BUTLER 1933),

- (c) een aantasting van het morfogenetisch veld (HORN 1942, TRAMPUSCH 1958*a*, 1959*b*),
 - (d) een niet normaal functioneren van het wondepitheel (TRAMPUSCH 1957, 1959*a*),
 - (e) een niet normaal functioneren van de axonen (VERGROESEN 1958), en
 - (f) een niet tot stand komen en/of niet normaal functioneren van de relatie tussen zenuw en wondepitheel (TRAMPUSCH 1964*a*).
- (3) Het door bestraling opgewekte onvermogen tot regeneratie is volgens de meeste auteurs (BRUNST 1950, UMANSKI 1937, THORNTON 1942, SKOWRON en ROGUSKI 1958, STINSON 1964*c*, GOSS 1961) niet reversibel. TRAMPUSCH en medewerkers menen daarentegen wel een herstel van dit vermogen te hebben waargenomen.
- (4) TRAMPUSCH's meest recente zienswijze (1964*a*) omtrent de reversibiliteit van het onderdrukkende effect van bestraling op het regeneratievermogen van de extremiteiten is als volgt te kenschetsen. Het proces van de regeneratie komt tot stand door een keten van reacties.

Een onmisbare schakel wordt hierin gevormd door het samenspel tussen wondepitheel en zenuw. Na bestraling zijn deze beide niet meer capabel hun rol daarbij te spelen. Deze incapabiliteit is echter reversibel. Ten eerste kan de zenuw (axonen en zenuwcellichamen) zich herstellen door contact met een volwaardig (onbestraald of hersteld) wondepitheel. Ten tweede kunnen alleen perifeer bestraalde axonen zich ook herstellen onder invloed van hun onbestraalde zenuwcellichamen. Ten derde kan een onvolwaardig wondepitheel, gevormd door bestraalde huid, herstel ondergaan door contact met volwaardige (onbestraalde of herstelde bestraalde) axonen. Ten vierde kan zulk een onvolwaardig wondepitheel zich ook herstellen door contact met onbestraald bot of onbestraalde spier, mits deze uit poot of staart afkomstig zijn. In alle vier zojuist gereleveerde gevallen wordt het voor de regeneratie onontbeerlijke samenspel tussen wondepitheel en zenuw weer mogelijk en daardoor kan het eerst geblokkeerde regeneratieproces op gang komen.

PROBLEEMSTELLING

Uit het voorgaande is gebleken, dat de reversibiliteit van het negatieve effect van röntgenstralen op het regeneratievermogen van poten van salamanders een zeer omstrede punt is.

Aangezien het werk van de betrokken onderzoekers grote verschillen toont, zowel wat de gebruikte proefdieren (soort, larvaal of volwassen stadium, leeftijd) en de bestraling (onder meer de dosis) betreft, als ook wat de uitgevoerde implantaties van onbestraald weefsel in bestraalde pootstompen aangaat, is het moeilijk de door hen aangevoerde argumenten pro en contra op één balans tegen elkaar af te wegen.

De mogelijkheid, dat het effect van röntgenstralen op het regeneratievermogen reversibel is, is echter zo belangwekkend, dat verder experimenteel onderzoek met betrekking tot het daarvoor veronderstelde mechanisme (TRAMPUSCH 1964*a*) ten volle verantwoord was.

Een goed uitgangspunt daarvoor bood een proefopstelling soortgelijk aan die, welke door HARREBOMÉE gebruikt was om de dedifferentiatie van een in de flank geïsoleerd stuk bot, bedekt door wondepitheel, te bestuderen. Na de lumbo-sacrale streek en beide achterpoten te hebben bestraald (1000 *r*) devieerde zij — zoals vermeld — de nervus ischiadicus uit de linker achterpoot naar de flank en bracht zij daar zijn einde in contact met een onbestraald implantaat; dit bestond uit een huidlap met centraal erin een rond gat, een venster, dat gesloten werd door wondepitheel, waaronder 3 dagen later een epiphysis femoris werd geschoven. Zoals eerder beschreven, bleken bij dit experiment de beide geamputeerde, bestraalde achterpoten vertraagd tot regeneratie in staat. Essentieel in TRAMPUSCH's interpretatie van dit resultaat is, dat de waargenomen regeneratie werd gezien, als het gevolg van een herstel van het tevoren door de bestraling onderdrukte vermogen tot regeneratie, en dat dit herstel via de gedevieerde linker nervus ischiadicus, het ruggemerg of de spinale ganglia en de in beide achterpoten aanwezige zenuwen, — “nerves as morphogenetic mediators” — zou worden ontleend aan het wondepitheel in het onbestraalde implantaat. Besloten werd het onderzoek te beginnen bij de bron van dit herstel, de relatie tussen de gedevieerde nervus ischiadicus en het implantaat.

Ten aanzien van deze relatie doen zich vóór alles twee vragen voor.

In de eerste plaats kan men zich afvragen, aan welke voorwaarden het implantaat — of beter het milieu rond het einde van de gedevieerde zenuw — moet voldoen, opdat de bestraalde zenuw zich kan herstellen. Volgens de conceptie van TRAMPUSCH zou zulk een herstel uitsluitend te wijten zijn aan contact met wondepitheel,

voortgekomen uit onbestraalde huid. Contact met een onvolwaardig wondepitheel, door bestraalde huid gevormd (zoals in een bestraalde poot na amputatie), zou niet tot herstel leiden en evenmin contact met onbestraalde of bestraalde huid, waarvan de dermis intact was, (bedekken van de wond met huid, onmiddellijk na amputatie, verhindert immers regeneratie). Teneinde de juistheid van deze veronderstelling te toetsen werden in 4 parallel-series op verschillende manieren behandelde huid-implantaten in de flank in contact gebracht met de gedeveerde, bestraalde zenuw (hoofdstuk III), t.w. (1) onbestraalde en ongevensterde huid, (2) onbestraalde en gevensterde huid, (3) bestraalde en ongevensterde huid, en (4) bestraalde en gevensterde huid. Verder bevond zich bij het vermelde experiment van HARREBOMÉE behalve het wondepitheel ook een onbestraalde epiphysis femoris nabij het einde van de gedeveerde zenuw. Het is zeker niet uitgesloten, dat bestraalde axonen zich ook door contact met skelet- of spierweefsel, dat op een laedering reageert, zouden kunnen herstellen. Teneinde deze mogelijkheid te onderzoeken werd in 5 parallel-series het einde van de gedeveerde zenuw in contact gebracht met op verschillende wijzen behandelde epiphyses femoris (hoofdstuk III), t.w. (1) minimaal gelaedeerd en onbestraald, (2) sterk gelaedeerd en onbestraald, (3) minimaal gelaedeerd en bestraald, (4) sterk gelaedeerd en bestraald en tenslotte (5) sterk gelaedeerd, bestraald en bovendien gekookt. Dit laatste diende om de invloed te kunnen vergelijken van een dood implantaat met die van een levende epiphysis.

In de tweede plaats kan men zich afvragen, hoe lang er contact met het implantaat (het wondepitheel) noodzakelijk is, vóórdat een herstel van de gedeveerde zenuw is waar te nemen, resp. of er een verband bestaat tussen de duur van het contact en de mate van herstel. De experimenten dit aangaande zijn beschreven in hoofdstuk IV.

De probleemstelling heeft dus betrekking op twee aspecten van de relatie tussen implantaat en gedeveerde zenuw: (1) de kwaliteit van het implantaat, die uiteindelijk verantwoordelijk is voor het herstel van het regeneratievermogen van de bestraalde achterpoten, en (2) de duur van het contract tussen implantaat en gedeveerde zenuw, die nodig is voor dit herstel.

HOOFDSTUK II

PROEFDIEREN EN METHODEN

Achtereenvolgens komen in dit hoofdstuk aan de orde de proefdieren en hun milieu, en de algemene technische handelingen, die bij de latere beschrijving van de experimenten niet uitvoerig of niet expliciet meer vermeld zijn. In de volgende hoofdstukken (III tot en met VIII), die telkens het verslag inhouden van een reeks experimenten, zal steeds na de inleiding met omschrijving van het probleem, de specifieke opzet en uitvoering van de proeven kort worden weergegeven met gebruikmaking van de hieronder toegelichte termen.

PROEFDIEREN

Als proefdieren dienden gepigmenteerde, in het laboratorium opgekweekte axolotl-larven (*Ambystoma mexicanum* *). Bij het begin van de experimenten waren zij 4-5 maanden oud en hadden toen een totale lengte van 75-85 mm. De afstand tussen de voorzijde van de kop en de basis van de linker achterpoot (kop-pootlengte), dus de lengte exclusief de nogal variabele staartlengte, bedroeg 38-42 mm. Bij enkele experimenten (hoofdstuk VIII), is in verband met een bijzondere wijze van bestraling de voorkeur gegeven aan iets grotere proefdieren: totale lengte 85-95 mm, kop-pootlengte 42-46 mm.

Vanaf het moment, dat de achterpoten gevormd waren, zijn de dieren afzonderlijk in afgedekte potten ondergebracht, teneinde het opeten van elkaar's extremiteiten te voorkomen. Deze potten, alle even groot, waren tot een gelijk niveau gevuld met leidingwater, dat door een koolfilter van voor axolotls schadelijk bestanddelen was gezuiverd. Ook de ventilatie-openingen, die in de deksels waren uitgespaard hadden een gelijke diameter, opdat geen verschillen in temperatuur zouden optreden door ongelijke mate van

*) Dr. J. Faber en Dr. E. C. Boterenbrood van het HUBRECHT-laboratorium te Utrecht (Directeur: Prof. Dr. P. D. Nieuwkoop), die mij ook enkele legsels axolotl-eieren ter beschikking stelden, dank ik gaarne daarvoor.

verdamping. De proefdieren bevonden zich voortdurend in een ruimte met een temperatuur van ongeveer 20° C. Deze voorzieningen waren noodzakelijk om de uitkomsten van niet gelijktijdig uitgevoerde experimenten met elkaar te kunnen vergelijken; immers de snelheid van het regeneratieproces is bij poikilotherme dieren afhankelijk van de temperatuur. De temperatuurkamer was, behalve in het weekend, verlicht van 9.00 tot 18.30 uur. Als voedsel werden driemaal per week *Tubifex* en/of *Daphnia* gegeven.

De tijdstippen van de experimentele ingrepen stonden niet in een constante relatie tot licht- en voedselloze dagen; een beïnvloeding van de resultaten hierdoor werd niet waargenomen. Op de dag voorafgaand aan een ingreep of een observatie werd nooit gevoerd, om braken tijdens de narcose te voorkomen.

NARCOSE

Een 10 minuten durend verblijf van de proefdieren in een 1 : 1000 oplossing van MS 222 (SANDOZ-BASEL) in gefilterd water geeft een afdoende staat van verslapping en reactieloosheid gedurende ten minste een half uur. Het "vastkleven" van een aangebracht implantaat werd bevorderd door immobiliteit tijdens een vijf uren durende na-narcose. Hierbij waren de dieren neergelegd in gesloten petrischalen op schuin aflopende paraffine-blokjes, zodanig dat de kop, de kieuwen en het voorste deel van de romp in een 1 : 5000 oplossing van MS 222 waren ondergedompeld, en het achterste deel van de romp met het implantaat en de staart in de vochtige lucht boven de vloeistof uitstaken. Dieren, die bij na elkaar uitgevoerde operaties meermalen als donor van een implantaat dienden, verbleven in de tussenliggende perioden eveneens in een MS 222 oplossing van dezelfde sterkte.

BESTRALING

Bij de experimenten, beschreven in de hoofdstukken III, IV en V, zijn de röntgenstralen toegediend op een in het laboratorium sinds verscheidene jaren gebruikelijke wijze. Het gebruikte röntgentoestel is een Duplex-apparaat (ENRAF) met Machlett (type CYSL-C⁺) röntgenbuizen.

Midden tussen de twee, op een onderlinge afstand van 30 cm (kathode-kathode) opgestelde buizen (de vensters naar elkaar toe gericht) bevindt zich een houder, waarvan boven- en onderzijde bestaan uit 2 mm dikke loodplaten, met uitsparingen, die de

stralenbundels begrenzen (Schema 1). Beide uitsparingen, met een breedte van 13 mm en een lengte van 50 mm, nemen een gelijke positie in ten opzichte van de denkbeeldige as, die het midden van de vensters van beide buizen verbindt. In deze houder past een uit 1 mm dik perspex gemaakt bakje, op bodem en deksel waarvan het deel, dat correspondeert met de genoemde uitsparingen, is aangegeven.

Twee genarcotiseerde dieren werden op hun zij en face-en-face in dit bakje neergelegd, zodanig dat de tegelijkertijd door beide röntgenbuizen te bestralen lichaamsdelen in de door de uitsparingen begrensde stralenbundel kwamen te liggen (Schema 2a). Een vochtig watje over de kop en de kieuwen en een gaasje als onderlegger waren bedoeld om eventuele verschuiving of uitdroging tegen te gaan. Nadat het bakje in de houder was geschoven werd de ligging van de proefdieren nogmaals gecontroleerd.

Beide röntgenbuizen werden gebruikt bij 50 Kv, 4 mA en zonder extra filters (behalve het deksel en de bodem van het perspex bakje); zij leverden tezamen ongeveer 145 r per minuut, gemeten in lucht met een op aanwijzing van Prof. Dr. L. H. VAN DER TWEEL gebouwde dosimeter. De duur van de bestraling werd bepaald door de gewenste dosis röntgenstralen.

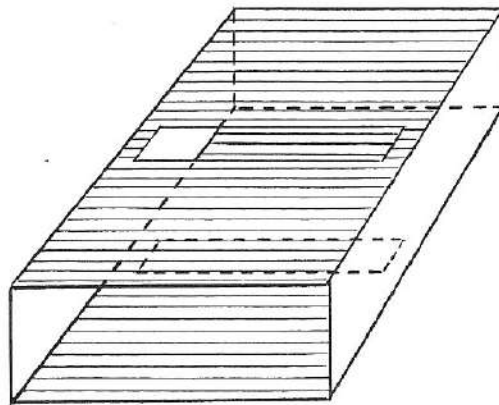
Bij de op hun zij liggende proefdieren werden behalve de ventraal- waarts gestrekte achterpoten, die zich in het midden van de 13 mm brede stralenbundels bevonden, ook de aansluitende, lumbo-sacrale segmenten van de romp bestraald (Schema 2a).

Dieren, die gebruikt werden als donor van een bestraald implantaat, werden één week tevoren bestraald. Zouden de epiphyses femoris getransplanteerd worden, dan werd de bestraling uitgevoerd op geheel dezelfde wijze als hierboven werd beschreven. Bij donoren, die huid moesten leveren, werd ófwel een 13 mm brede zone caudaal aansluitend aan de cloaca bestraald (experimenten HSX en HTX), ófwel het rompgebied tussen voorste en achterste extremiteiten aan een bredere stralenbundel blootgesteld (bestraalde huid ter bedekking van een geïmplanteerde epiphysis). De keuze van deze huidlappen is toegelicht in de inleiding van hoofdstuk III.

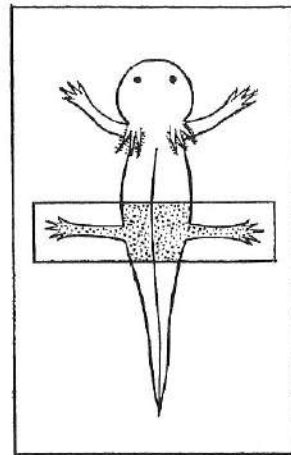
De bestraling van de achterpoten en het lumbo-sacrale deel van de romp bij de experimenten, vermeld in de hoofdstukken VI en VII, verschilt van de eerder beschrevene in verscheidene opzichten: gemodificeerde bestralingswijze (Schema 2b). Elk proefdier werd hier afzonderlijk bestraald en werd daartoe op de bodem van

het bakje in buikligging neergelegd. De achterpoten lagen tijdens de bestraling in een vlak midden tussen de beide röntgenbuizen; zij waren daarbij zijwaarts gestrekt in de lange as van de dwars op het dier staande, 13 mm brede afgegrensde stralenbundels. Elk van deze leverde de helft van de in totaal gewenste dosis.

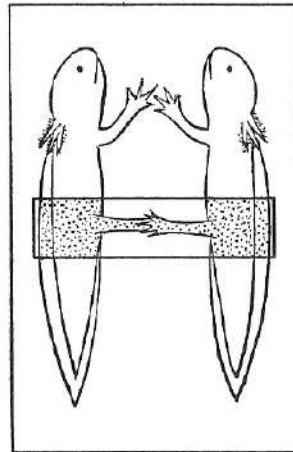
Bij de proefdieren beschreven in hoofdstuk VIII werd bovendien



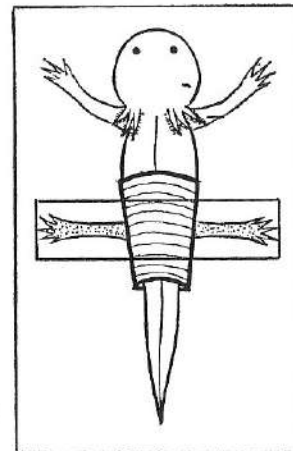
schema 1



b



a



c

schema 2

de bestraling beperkt tot de extremiteiten: dit gebeurde door het tussenliggende lumbo-sacrale rompgebied te beschermen met een "Ioden broek" (Schema 2c). Dit is een aan de transversale doorsnede van de proefdieren aangepaste 2 cm lange koker van gebogen lood ter dikte van ± 2 mm. De diameter van deze koker heeft een gering verloop. Vanaf het wijdere vooreinde lopen in beide zijanten lange, smalle sleuven. Een proefdier kan nu achterwaarts in de wijde opening van de "broek" geschoven worden, totdat in een nauwer gedeelte een passende stand is bereikt.

OPERATIES

Alle operaties werden verricht onder een ZEISS binoculaire operatiemicroscop I bij een vergroting van 16 of 24 maal. Naar behoefte bijgeslepen horlogemakers-pincetten en schaartjes voor zachtere en vastere delen waren de voornaamste werktuigen. Daar de transplantatie en deviatie aan de linker zijde werd verricht, lagen de proefdieren bij de operaties steeds op hun rechter zijde, op een vochtig glaasje. Ter voorkoming van uitdroging werden bovendien de kieuwen met vochtige watten bedekt en de dieren geregeld met water besprenkeld.

Bij vele experimenten werd de linker nervus ischiadicus onderhuids naar de flank gedevieerd en daar in contact gebracht met verschillende implantaten (nagegaan werd dan het effect hiervan op de regeneratie van de bestraalde achterpoten). De belangrijkste handelingen bij deze operatie worden hier besproken.

Maken van een huidvrij carré in de flank als "bed" voor een implantaat

De achterste extremiteiten van de proefdieren (Schema 3a) worden ventraalwaarts gestrekt, zodat het huidvrij te maken gebied

Schema 1. Houder, waarvan de boven- en onderzijde bestaan uit een 2 mm dikke loodplaat, voorzien van twee precies boven elkaar gelegen uitsparingen; hierdoor worden de stralenbundels van de erboven en eronder opgestelde röntgenbuizen begrensd.

Schema 2. Ligging van de proefdieren in het perspex bakje, dat vóór de bestraling in de houder wordt geschoven; tevens is de positie van de uitsparingen in boven- en onderzijde van de houder aangegeven. (a) Ligging, zoals gebruikt bij de experimenten, beschreven in de hoofdstukken III, IV en V; (b) ligging, zoals gebruikt bij de proeven, vermeld in de hoofdstukken VI en VII; (c) ligging, zoals toegepast bij de experimenten, beschreven in hoofdstuk VIII, met "Ioden broek".

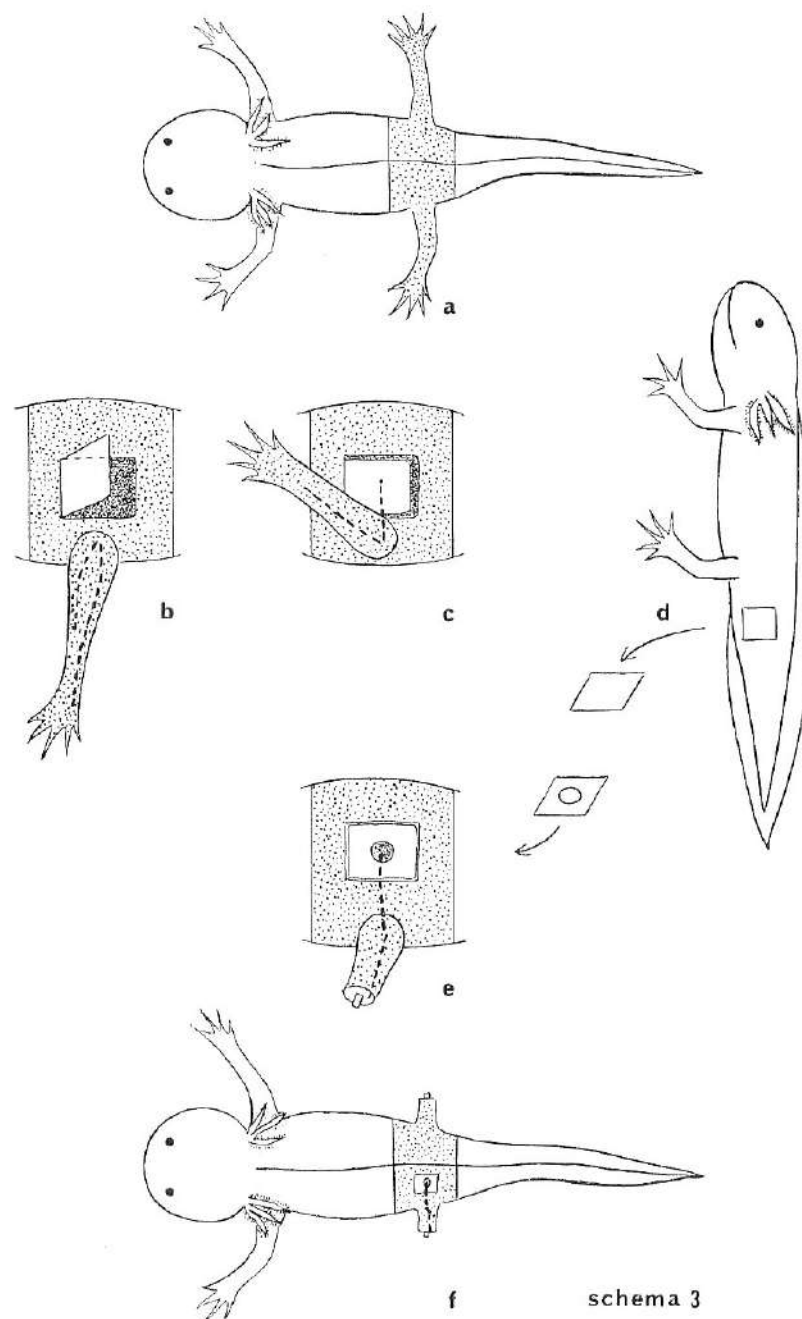
toegankelijk is. Dit is in de flank gelegen, midden boven de pootbasis en ± 2 mm hiervan verwijderd. Nadat de caudale, dorsale en ventrale randen met de schaar zijn ingeknipt, wordt het omgrenste huidgebied (ruim 6 mm in het vierkant) van caudaal af stomp van de onderlaag gescheiden (Schema 3b). Omdat de onderlaag vrijwel ongemoeid blijft, treedt nauwelijks enige bloeding op. Het nog aan de craniale zijde vastzittende huiddeel wordt dan voorlopig teruggeslagen over het wondbed om dit tegen uitdroging te beschermen.

Deviatie van de zenuw

Nadat de linker achterpoot dorso-craniaalwaarts over de romp is opgeklapt, wordt de huid vanaf de plantaire voet tot aan de basis van de poot gekliefd. De voornaamste, vlak bij elkaar liggende zenuwen worden via de gemaakte incisie stomp à vue gebracht en tezamen met hun grootste zijtakken vrijgeprepareerd tot aan de plexus lumbalis. Een sonde wordt vanuit het proximale einde van de incisie in de poot onderhuids opgeschoven naar het in de flank voorbereide bed. Via deze gebaande weg wordt een lange dunne pincet in tegenoverliggende richting (dus vanuit het bed naar de poot) ingebracht. Hiermee wordt de grootste van de beide zenuwen in de poot, de nervus ischiadicus, gepresenteerd door een andere pincet, overgenomen en onderhuids naar het bed doorgetrokken (Schema 3c). De in de poot achterblijvende zenuw, de nervus peroneus, wordt overdekt met spieren en de wondranden worden geapplianceerd. Het proefdier wordt nu op een nat gaasje in een gesloten petrischaal vochtig gehouden tijdens het volgende onderdeel van de operatie: het vrijmaken van het implantaat bij het donordier.

Vrijprepareren van het transplantaat bij het donordier

Bestraalde huid ter bedekking van een geïmplanteerde epiphysis wordt bij de donor genomen uit het dorsale deel van de flank, midden



schema 3

Schema 3. Bij een bestraald proefdier wordt de linker nervus ischiadicus gedeveerd naar de flank en daar in contact gebracht met een implantaat (hier als voorbeeld getraumatiseerde onbestraalde huid); nagegaan wordt het effect hiervan op het regeneratievermogen van de bestraalde achterpoten. (a) en (f) proefdier vóór en na de operatie; (d) dier, dat donor van het implantaat is; (b), (c) en (e) fasen in de operatie: (b) het maken van een huidvrij carré als bed voor het implantaat, de vrijgeprepareerde huidlap wordt tijdelijk teruggeslagen, (c) de nervus ischiadicus is naar het bed gedeveerd, (e) het implantaat is aangebracht, de genoemde huidlap is "op maat" afgesneden en de amputatie is verricht.

tussen de voorste en achterste extremiteiten. Voor toetsing van de herstelfactor worden huidlappen gebruikt, afkomstig uit de zijkant van de basis van de staart, ongeveer 1 mm achter de cloaca (Schema 3d). Een motivering van dit verschil wordt gegeven in de inleiding van hoofdstuk III.

De te transplanteren huidlappen (epidermis en dermis), ongeveer 7 bij 7 mm, worden met de schaar uitgeknipt, stomp van de onderlaag vrijgemaakt en omgeklapt neergelegd op een stukje sigarettenpapier, dat met een fysiologische zoutoplossing bevochtigd is. Dit dient als drager en voorkomt opkrullen van het transplantaat. Het skelet-transplantaat wordt verkregen door van een ruim uitgerepareerde poot het femur vrij te leggen en dit te bevrijden van spieren en bindweefsel, om dan door lichte tractie de diaphysis te scheiden van de proximale, kraakbenige epiphysis. Deze laatste, bestaand uit caput en collum femoris en het gebied van de trochanteren, is het transplantaat.

Traumatisatie van het implantaat

Bij enkele proeven is traumatisatie van het implantaat nodig. Zo wordt in de huidlapjes, ter verkrijging van wondepitheel, centraal een gat (venster) geponst met een ronde trepaan met een doorsnede van $2\frac{1}{2}$ mm. Als de epiphysis moet worden getraumatiseerd, wordt deze met een zeer scherp mesje overlangs in twee zo symmetrisch mogelijke helften gekliefd.

Aanbrengen van het implantaat

Het huidtransplantaat, uitgestrekt op zijn drager, wordt neergelegd op het gemaakte wondbed, waarvan de los overgeslagen huid weer is weggeklapt. Het stukje sigarettenpapier is dan gemakkelijk los te maken. Ligt het huidtransplantaat eenmaal goed op zijn plaats, dan kan men de craniaal nog vastzittende, juist tevoren opgeklapte romphuid op maat afknippen, zodat de randen van het bed en het implantaat goed aan elkaar passen (Schema 3e).

Bij transplantatie van een epiphysis wordt deze midden in het wondbed geplaatst, voor drie kwart van zijn lengte in contact met het einde van de gedeviceerde zenuw. Is de epiphysis gekliefd, dan wordt het einde van de zenuw tussen de beide helften ingelegd. De huidlap, losgemaakt bij de voorbereiding van het bed, is tengevolge van retractie niet toereikend om de neergelegde epiphysis en het huidvrije gebied geheel te bedekken. Om een mogelijk

contact van de gedeviceerde zenuw met een in een niet bedekte strook gevormd wondepitheel te voorkomen, wordt deze lap verwijderd en het gehele "bed", waarin de epiphysis, afgesloten met een nauwkeurig passend stuk bestraalde huid uit de flank van de donor.

Fixatie van het implantaat

Om loslaten van het implantaat tijdens de na-narcose tegen te gaan, worden het implantaat en zijn omgeving kruiselings overdekt met als pleisters dienende strookjes sigarettenpapier. Zodra het dier zich vijf uren later, na ontwaken uit de narcose in het water gaat bewegen, laten deze strookjes los; dit heeft geen nadelige gevolgen meer, omdat het implantaat inmiddels afdoende is vastgehecht.

Amputatie van de achterpoten

Bij alle experimenten worden de beide achterpoten geamputeerd; het resultaat van een experiment wordt immers afgelezen aan het al of niet regenereren van deze bestraalde pootstompen. Het proefdier wordt daarbij op zijn buik gelegd en beide zijwaarts gestrekte achterpoten worden op het gewenste niveau doorgeknipt. Het na retractie van de weke delen uit de wond uitstekende skelet wordt niet bijgeknipt (Schema 3e en 3f).

Het devieren van de nervus ischiadicus, het aanbrengen van een implantaat, en de amputatie van de beide achterpoten vergden in totaal 20-25 minuten.

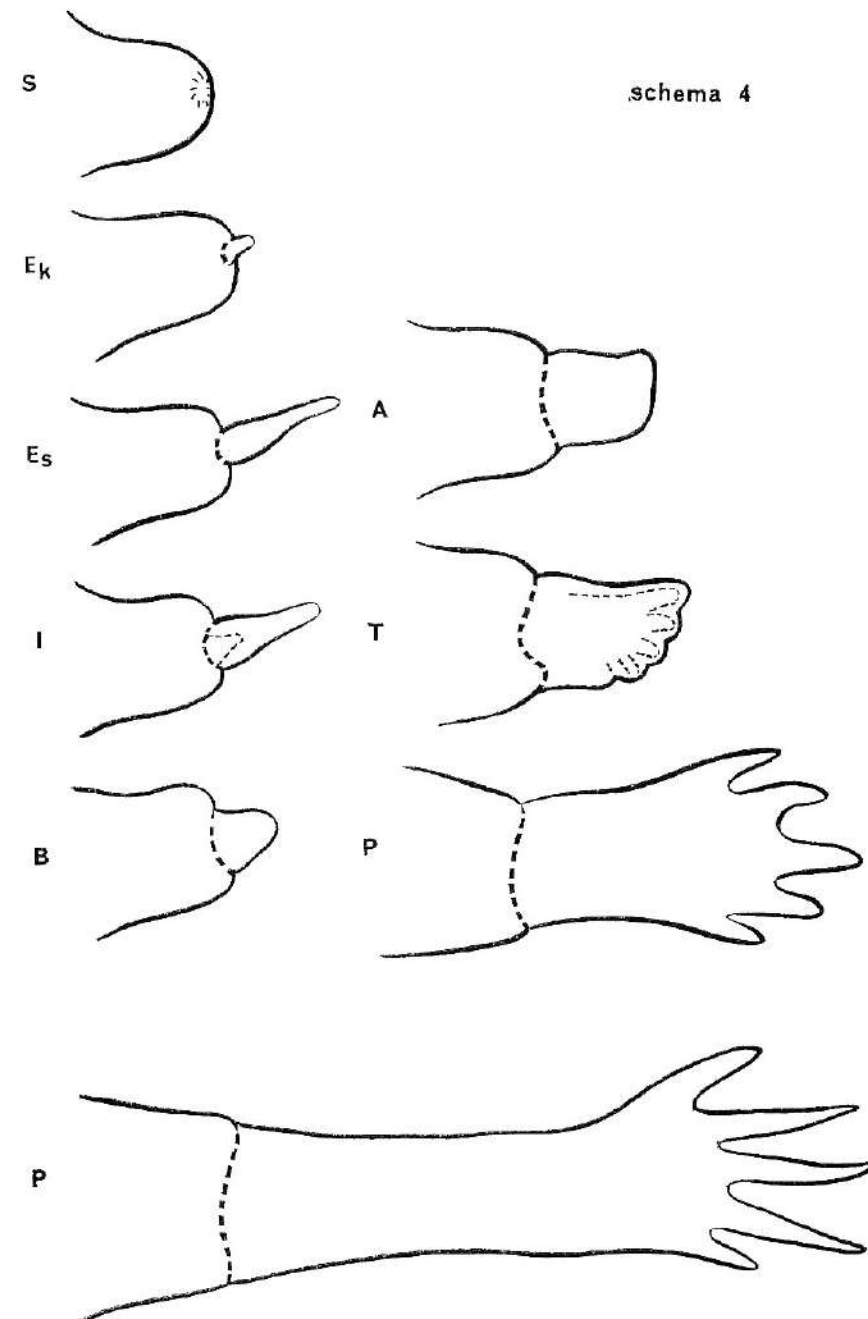
De hierboven beschreven ingrepen werden door de proefdieren goed verdragen; sterfte van een proefdier vormde een hoge uitzondering.

OBSERVATIE

Op de 80e dag na amputatie werden de proeven beëindigd. Op dat ogenblik werden de regeneraten, gevormd uit de beide bestraalde pootstompen, evenals de conditie van een eventueel implantaat, beoordeeld. De keuze van dit tijdstip berustte op de eerder opgedane ervaring, dat, als regeneratie bij bestraalde pootstompen optreedt, deze zich steeds ruim vóór die tijd reeds duidelijk gemanifesteerd heeft. Uit onbestraalde pootstompen gevormde regeneraten hebben dan reeds enige tijd een grootte bereikt, ongeveer overeenkomend met die van niet geamputeerde poten.

Met betrekking tot de pootstompen werd gelet op de grootte en de kwaliteit van eventueel gevormde regeneraten. Als maat voor de bereikte grootte diende de maximale lengte, gerekend vanaf het amputatievlak en uitgedrukt in mm. De kwaliteit werd gekenmerkt met behulp van één van de volgende termen (Schema 4), die gebruikt worden voor een achttal arbitrair onderscheiden situaties. *Gladde stomp* (S): De amputatiewond is vrijwel glad gesloten. Apicaal bevindt zich meestal een klein gebied, waar een afwijkend pigmentpatroon – zoals bij histologisch onderzoek is gebleken – op een ontbreken van de dermis wijst; de hieroverheen liggende epidermis heeft een gekorrelde aspect en is soms verdikt. Is deze verdikking zo sterk, dat een tongvormig, tot 1 mm lang uitwasje is te onderscheiden, dan is dit aangegeven als een *Epidermisknop* (Ek). Nog langere (1–4 mm) epidermale vormsels met een korrelig aspect zijn *Epidermissliert* (Es) genoemd. Is er een uitbreiding van sub-epidermaal gelegen bindweefsel in de basis van de epidermissliert, dan is gesproken van een *Epidermissliert met Bindweefsel* (I). Bij een als *Blastema* (B) aangeduid regeneraat is de epidermis gladder en heeft niet het eerder genoemde korrelige aspect; het geheel heeft door een grotere hoeveelheid sub-epidermaal materiaal een kegelvorm. Grotere blastemata met een duidelijke dorso-ventrale afplatting, als *Afgeplat blastema* (A) aangeduid. In een *Tenenplaat* (T) wijzen verdichtingen en/of vaatlissen op de aanleg van tenen. Heeft een regeneraat – naast proximale elementen – ook vrije tenen, dan is het *Poot* (P) genoemd. De regeneraten van deze laatste categorie zijn niet verder onderverdeeld naar de ontwikkeling van hun distale of proximale delen, daar een afdoende beoordeling daarvan in de meeste gevallen door uitwendige inspectie niet mogelijk is.

Na de beoordeling werden de pootstompen ruim van het bekken afgeprepareerd en op een achtergrond van grafiekpapier gefotografeerd. De fotografische afbeeldingen (drie maal de natuurlijke grootte) werden zo gemonteerd, dat de afgebeelde linker en rechter poten in afzonderlijke rijen naar aflopende grootte waren gerang-



Schema 4. Normen van de beoordeling van de pootstompen met eventuele regeneraten: S=Gladde Stomp; Ek=Epidermisknop; Es=Epidermissliert; I=Epidermissliert met bindweefsel; B=Blastema; A=Afgeplat blastema; T=Tenenplaat; P=Poot.

schikt. Deze beeld-overzichten dienden, evenals de diagrammen, die van de lengte en de kwaliteit der regeneraten werden gemaakt, ter vergelijking van de bij de verschillende experimenten verkregen resultaten.

Om een indruk te krijgen van de groei van de dieren in het algemeen tijdens de duur van het experiment, werden zowel aan het begin als aan het einde van de proeven van elk proefdier de totale lengte en de kop-pootlengte gemeten.

Bij de eerste 12 experimenten, vermeld in de hoofdstukken III en IV, werden 24 dieren per proef gebruikt; bij de latere experimenten is dit aantal teruggebracht tot 12 (voor een toelichting hierop, zie de inleiding van hoofdstuk V).

HOOFDSTUK III

EXPERIMENTEN OVER HET MILIEU VAN HET EINDE VAN DE GEDEVIEERDE ZENUW

INLEIDING

Een onbestraald in de flank aangebracht implantaat kan, in contact met de uit één achterpoot daarheen gedevieerde nervus ischiadicus, de oorzaak zijn van een herstel van het regeneratievermogen van beide bestraalde achterpoten (TRAMPUSCH 1964a). De eerste vraag, die in dit verband rees, was (hoofdstuk I, probleemstelling), welke eigenschappen dit implantaat moet hebben, om een dergelijk herstel te bewerkstelligen. Om hierop een antwoord te krijgen werden 9 verschillende types van implantaten met het einde van de gedevieerde zenuw in contact gebracht. Deze types verschilden in drie opzichten: zij bestonden uit huid (H) of skelet (B), waren getraumatiseerd (T) of niet getraumatiseerd (S) en waren bestraald (X) of niet bestraald (Y).

Het implantaat werd in de flank binnen het bestraalde lumbo-sacrale deel van de romp aangebracht om te voorkomen, dat reacties van onbestraalde weefsels van de gastheer op de implantatie een rol zouden kunnen spelen. De verschillende getoetste huidlappen waren bij een donor-dier genomen van de zijkanen van de staart, vlak achter de cloaca; met deze keus werd vorming van een ectopische poot uit het implantaat in de flank — zoals in het experiment van HARREBOMÉE — als variabele, geëlimineerd. Huidlappen, die slechts moesten dienen ter bedekking van een te toetsen epiphysis, werden bij een donor-dier uit het bestraalde gebied tussen achter- en voorpoten weggenomen. Bij een histologische steekproef was gevonden, dat de dermis daar veel dikker is en zodoende een betere barrière zou kunnen vormen tussen de epiphysis en de epidermis. De gebruikte dosis röntgenstralen van 1000 r was eerder gebleken voldoende te zijn om regeneratie van de poten bij proefdieren van de gebruikte leeftijd te verhinderen (TRAMPUSCH 1959).

KORTE BESCHRIJVING VAN DE EXPERIMENTEN

- (a) Bestraling met 1000 r van het lumbo-sacrale gebied en de beide achterpoten.

(b) 7 dagen na de bestraling:

1. Maken van een huidvrij carré in de flank binnen de bestraalde zone.
2. Deviatie van de nervus ischiadicus onderhuids naar het carré.
3. Aanbrengen van het homoplastische implantaat in het carré; zie Tabel 1.
4. Amputatie van beide achterpoten halverwege het bovenbeen.

(c) 80 dagen na amputatie: einde van het experiment.

Per experiment zijn 24 proefdieren gebruikt met een totale lengte van 75-85 mm en een kop-pootlengte van 38-42 mm bij het begin van de proef.

TABEL 1

Experiment	Aard van het implantaat	Kenmerken van het implantaat	
		getraumatiseerd	bestraald
HSY	huid	—	—
HTY	huid	+	—
HSX	huid	—	+
HTX	huid	+	+
BSY	epiphysis femoris	—	—
BTY	epiphysis femoris	+	—
BSX	epiphysis femoris	—	+
BTX	epiphysis femoris	+	+
BTKX	epiphysis femoris	+*	+*

Overzicht van de aard en de kenmerken van de getoetste implantaten (H=huid; B=epiphysis femoris proximalis; S=ongetraumatiseerd; T=getraumatiseerd; Y=onbestraald; X=bestraald; K=gekookt).

* bovendien gekookt.

WAARNEMINGEN

De proefdieren bereikten tijdens de duur van het experiment een totale lengte van 110-120 mm en een kop-pootlengte van 54-60 mm. Zij verkeerden in goede conditie; slechts 4 van de ruim 200 geopereerde dieren zijn voortijdig gestorven, 2 in de serie HSY en 1 in de beide series HTY en BSX.

Uit de resultaten krijgt men de stellige indruk, dat er tussen de uitkomsten van de 9 experimenten geen aanzienlijke verschillen

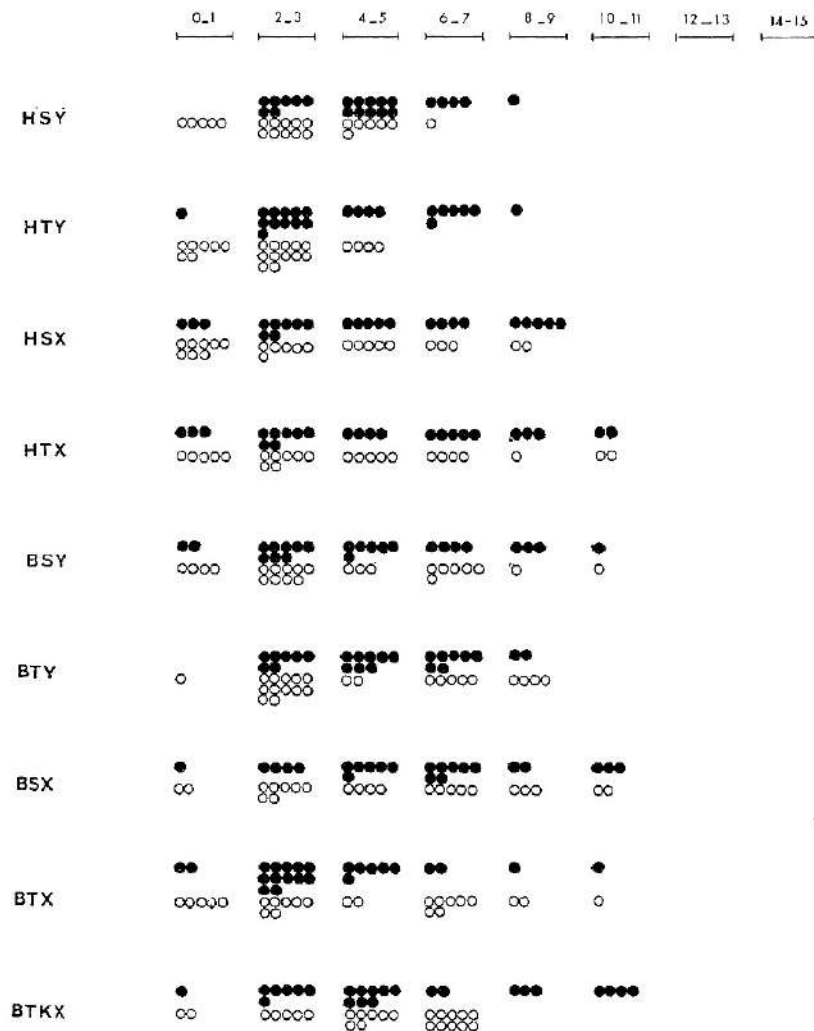
bestaan wat betreft de mate, waarin de bestraalde pootstompen in staat waren tot regeneratie. Dit blijkt duidelijk uit de gegevens in Tabel 2 en uit de Diagrammen 1 en 2, waarin de lengte en de kwaliteit van de regeneraten zijn aangegeven. In Tabel 2 zijn als

TABEL 2

Serie	Experiment (links)	Totaal aantal proefdieren	Resultaat					
			Links			Rechts		
			—	±	+	—	±	+
	Gedevieerde zenuw in contact met:							
HSY	ongetraumatiseerde, onbestraalde huid	22	0	6	16	6	5	11
HTY	getraumatiseerde, onbestraalde huid	23	0	4	19	4	8	11
HSX	ongetraumatiseerde, bestraalde huid	24	2	4	18	8	3	13
HTX	getraumatiseerde, bestraalde huid	24	2	4	18	5	3	16
BSY	ongetraumatiseerd, onbestraald skelet	24	2	3	19	3	2	19
BTY	getraumatiseerd, onbestraald skelet	24	0	1	23	1	8	15
BSX	ongetraumatiseerd, bestraald skelet	23	1	3	19	1	4	18
BTX	getraumatiseerd, bestraald skelet	24	2	3	19	6	2	16
BTKX	getraumatiseerd, bestraald, gekookt skelet	24	0	1	23	0	4	20

De mate van regeneratie van bestraalde pootstompen aan linker en rechter zijde, uitgedrukt in —, ±, en +, beoordeeld op de 80e dag na amputatie (— = gladde stomp, epidermisknop of -sliert; ± = epidermissliert met bindweefsel, blastema; + = afgeplat blastema, tenenplaat, poot). De rechter achterpoot is steeds alleen met 1000 r bestraald.

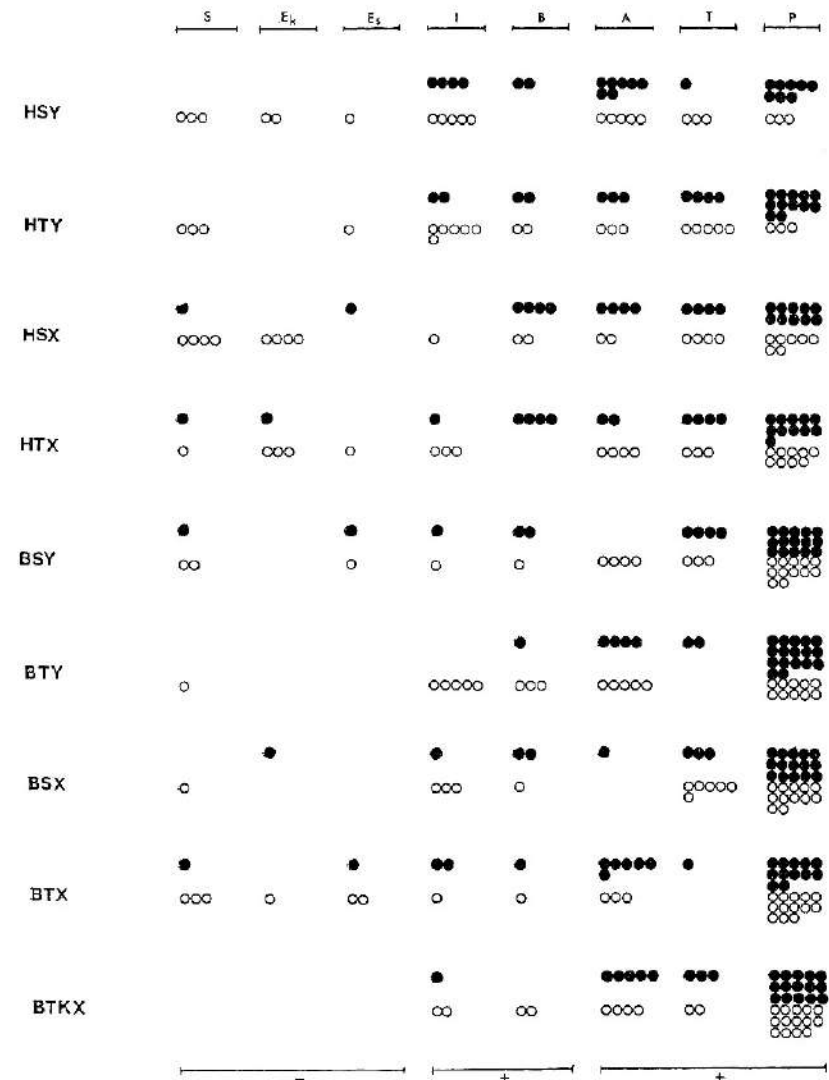
DIAGRAM 1



De lengte van de regeneraten op de 80e dag na amputatie.

● en ○ staan telkens voor 1 regeneraat resp. aan de linker en aan de rechter zijde. Verticaal zijn de verschillende experimenten vermeld. Horizontaal is de lengte aangegeven in mm. Het aantal proefdieren per experiment is als regel 24; bij de experimenten HTY en BSX is het echter 23 en bij het experiment HSY 22.

DIAGRAM 2



Specificatie van de regeneraten op de 80e dag na de amputatie.

● en ○ staan telkens voor 1 regeneraat resp. aan de linker en aan de rechter zijde. Verticaal zijn de verschillende experimenten vermeld. Horizontaal is de kwaliteit van de regeneraten aangegeven (S=Gladde stomp; Ek=Epidermisknop; Es=Epidermissliert; I=Epidermissliert met bindweefsel; B=Blastema; A=Afgeplat Blastema; T=Tenenplaat; P=Poot). Het aantal proefdieren per experiment is als regel 24; bij de experimenten HTY en BSX is het echter 23 en bij het experiment HSY 22.

+ samengenomen de regeneraten, die als poot, tenenplaat of afgeplat blastema beoordeeld zijn, als $\pm$ de (niet afgeplatte) blastemata en de epidermisslierten met bindweefsel en als - de overige (epidermisslierten of -knoppen en gladde stompen).

Bij de diverse proefdieren, deel uitmakend van eenzelfde experimentele serie, bleek de mate, waarin de bestraalde pootstompen tot regeneratie in staat waren geweest, zeer uiteen te lopen: sommige pootstompen waren glad gebleven of hadden slechts 1-2 mm lange epidermisslierten gevormd, terwijl andere $\pm$ 10 mm lange regeneraten hadden voortgebracht met voet, onder- en bovenbeen.

De regeneraten aan de linker- en rechter zijde van een proefdier waren zelden even groot; het grootste regeneraat kwam even vaak voor aan de linker- als aan de rechter zijde. Werden alle rechtszijdige regeneraten binnen één experiment vergeleken met alle linkszijdige, dan maakten de laatste meestal een iets forsere indruk; aan de rechterkant kwamen ook de meeste kleine, laag geklasseerde regeneraten voor.

Met betrekking tot het implantaat kan worden vermeld, dat, indien alleen een huidlap was aangebracht, deze geen knobbels of andere verhevenheden toonde. Bij de omstreeks 100 dieren, waarbij onder een huidlap een niet gekookte epiphysis als implantaat was aangebracht, waren in vele gevallen onder de bedekkende huidlap, knobbels zicht- en voelbaar; 6 maal was aan de ventrale grens van de bedekkende huidlap, dus vlak bij de basis van de poot, een pootachtige structuur ontstaan.

Ongeveer de helft van alle geïmplanteerde huidlappen toonden in hun geheel of voor een deel depigmentatie: een grijswitte grondkleur kwam in de plaats van de normale donkere groene, en fijne stip-peltjes zwart pigment namen de plaats in van de anders grotere vlekken. De gedepigmenteerde delen, waarin vaak een capillaire plexus doorschemerde, staken aan de rand van de implantaat scherp af tegen de gepigmenteerde huid van de gastheer.

Bij verscheidene proefdieren was aan het einde van de proefperiode de bestraalde zone duidelijk te herkennen aan een grovere verdeling van het zwarte pigment.

DISCUSSIE

De verschillen in het milieu van het einde van de gedeveerde, zenuw, zoals die in de diverse experimenten waren geschapen, hebben zich niet weerspiegeld in een verschillende mate van

regeneratie van de bestraalde pootstompen. Hieruit moet worden geconcludeerd, dat de waargenomen regeneratie ófwel berust op een eigenschap, die alle in contact met de gedeveerde zenuw gebracht implantaten gemeen hebben, ófwel moet worden toegeschreven aan een andere omstandigheid, die zich bij alle experimenten gelijkelijk voordeed.

In ieder geval hebben de resultaten der experimenten geen steun geleverd aan de veronderstelling, dat contact van de gedeveerde nervus ischiadicus met wondepitheel, gevormd uit onbestraalde huid, in het bijzonder verantwoordelijk zou zijn voor de regeneratie van bestraalde poten (TRAMPUSCH 1964a).

In die gevallen, waarbij in de flank een pootachtige structuur is gevormd, was waarschijnlijk de epiphysis verschoven van onder het midden van het bedekkende huidlapje naar de rand. Het wondepitheel gevormd in de spleet tussen implantaat en wondbedrand, de ter plaatse aanwezige gedeveerde zenuw en de onbestraalde epiphysis zijn hier vermoedelijk tezamen verantwoordelijk te stellen voor het ontstaan van de ectopische poot (vergelijk TRAMPUSCH en HARREBOMÉE 1962). Het is overigens opvallend, dat uit de midden onder de geïmplanteerde huidlap gelegen epiphyses wel knobbels, maar nooit typisch pootachtige delen geformeerd worden. Klaarblijkelijk ontbreekt hiervoor een geeigende stimulus.

De waargenomen depigmentatie van de huid-implantaten lijkt veel op die, welke beschreven is voor homoplastische huid-implantaten bij kikkers en daar wordt toegeschreven aan afweerreacties van de gastheer. Wellicht is dat ook hier de verklaring.

Deze eerste reeks van experimenten had betrekking op de kwaliteit van het implantaat. In het volgende hoofdstuk zal worden nagegaan, hoe lang contact tussen de gedeveerde zenuw en het implantaat moet duren om regeneratie van de bestraalde pootstompen mogelijk te maken. Bovendien zal, gezien de tot nu toe verkregen resultaten, in het bijzonder ook aandacht moeten worden besteed aan de vraag, in hoeverre dit contact inderdaad van belang is óf dat hier misschien andere omstandigheden een rol spelen.

HOOFDSTUK IV

EXPERIMENTEN OVER DE DUUR VAN HET CONTACT
VAN DE GEDEVIEERDE ZENUW
MET HET WONDEPITHEEL

INLEIDING

Het contact tussen een uit een achterpoot gedevieerde nervus ischiadicus met een wondepitheel, gevormd door onbestraalde en in de flank geïmplanteerde huid, zou resulteren in een herstel van de regeneratie-bevorderende functie van deze bestraalde zenuw, met als gevolg, dat indirect een herstel van het regeneratievermogen van bestraalde achterpootstompen tot stand kan komen (TRAMPUSCH 1964a). De volgende reeks van experimenten is bedoeld om na te gaan:

- 1e hoe lang dit contact minimaal moet duren om het genoemde herstel te bewerkstelligen (zie hoofdstuk I, probleemstelling),
- 2e gezien de uitkomsten van de vorige reeks experimenten of dit contact wel werkelijk van belang is.

Als implantaat werd gevensterde, onbestraalde huid gebruikt. In het experiment HTYA (H=huid, T=getraumatiseerd, Y=onbestraald) werd het contact tussen zenuw en implantaat na 12 dagen verbroken, in het experiment HTYB na 5 dagen en tenslotte werd het in experiment HTYX in het geheel géén contact tot stand gebracht.

KORTE BESCHRIJVING VAN DE EXPERIMENTEN

- (a) Bestraling van het lumbo-sacrale gebied en de achterpoten met 1000 r.
- (b) 7 dagen na de bestraling:
 1. Maken van een huidvrij carré in de flank binnen de bestraalde zone.
 2. Deviatie van de linker nervus ischiadicus onderhuids naar het carré.
 3. Uitsluitend bij het experiment HTYC: onmiddellijk terugleggen van de gedevieerde zenuw in zijn oorspronkelijke positie.

4. Aanbrengen van een homoplastisch implantaat, bestaande uit gevensterde, onbestraalde huid ter plaatse van het carré (ook in experiment HTYC).
5. Amputatie van beide achterpoten halverwege het bovenbeen.
- (c) 12 (HTYA) of 5 (HTYB) dagen na bestraling: terugleggen van de gedevieerde zenuw in de poot. Via een kleine incisie aan de ventrale zijde van het implantaat, dus nabij de pootbasis, werd de zenuw opgezocht, onder het implantaat vervolgd en tenslotte losgetrokken van het wondepitheel, waarmee hij vergroeid was. Vervolgens werd met een pincet, die onderhuids vanuit de poot tot de eerder genoemde snede was opgeschoven, de daarna los liggende zenuw opgepakt en in de pootstomp getrokken.
- (d) 80 dagen na amputatie: einde van het experiment.

Bij wijze van uitzondering werden de proefdieren 13 tot en met 24 bij experiment HTYC tot de 200e dag na amputatie in leven gelaten, om te kunnen vaststellen, of er later misschien meer als + te klasseren regeneraten zouden zijn ontstaan dan op de 80e dag het geval was.

Voor elk experiment werden 24 proefdieren gebruikt, die bij het begin van de proef een totale lengte van 80-90 mm hadden en een kop-pootlengte van 40-45 mm.

WAARNEMINGEN

De proefdieren verkeerden in uitstekende conditie en groeiden goed. Op de 80e dag bedroegen de totale en de kop-pootlengte resp. 110-120 mm en 55-60 mm; tussen de 80e en 200e dag na amputatie namen deze maten bij 12 dieren van het experiment HTYC nog toe tot 120-130 mm en 60-62 mm. Er was geen sterfte.

Wat betreft de ontwikkeling van de regeneraten aan de beide achterpoten in de 3 experimenten, blijkt, bij vergelijking op de 80e dag na amputatie, slechts tot de grootst mogelijke overeenkomst besloten te kunnen worden. Tabel 3 en de Diagrammen 3 en 4, waarin de lengte en de kwaliteit van de regeneraten zijn aangegeven, illustreren dit duidelijk.

Bovendien komen deze uitkomsten in hoge mate overeen met die van de in het vorige hoofdstuk beschreven reeks van experimenten (vergelijk de Diagrammen 1 en 2 met de Diagrammen 3 en 4). Weer

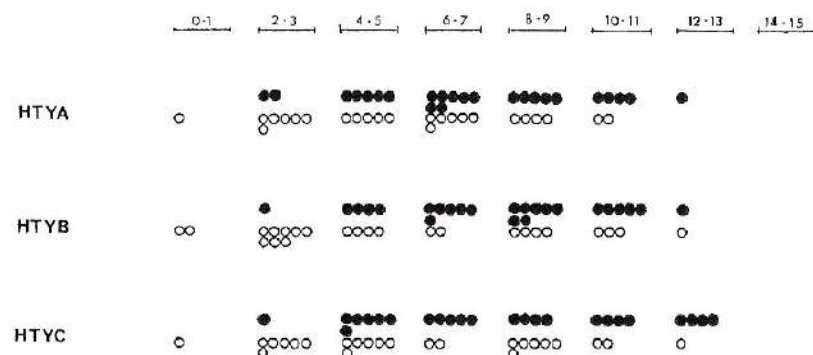
zijn er bij de proefdieren, behorend tot eenzelfde experimentele serie, grote onderlinge verschillen in de mate, waarin regeneratie heeft plaats gevonden. Ook zijn bij eenzelfde proefdier de regeneraten aan beide pootstompen vrijwel nooit even groot. Het beste regene-

TABEL 3

Serie	Experiment (links)	Totaal aantal proefdieren	Resultaat					
			Links			Rechts		
			-	±	+	-	±	+
HTYA	contact tussen ge-devieerde zenuw en implantaat, 12 dgn.	24	0	0	24	0	6	18
HTYB	contact tussen ge-devieerde zenuw en implantaat, 5 dgn.	24	0	1	23	1	5	18
HTYC	contact tussen ge-devieerde zenuw en implantaat, 0 dgn.	24	0	0	24	1	4	19

De mate van regeneratie van bestraalde pootstompen aan linker en rechter zijde, uitgedrukt in -, ± en +, beoordeeld op de 80^e dag na amputatie (- = gladde stomp, epidermisknop of -sliert; ± = epidermissliert met bindweefsel, blastema; + = afgeplat blastema, tenenplaat, poot). De rechter achterpoot is steeds alleen bestraald met 1000 r.

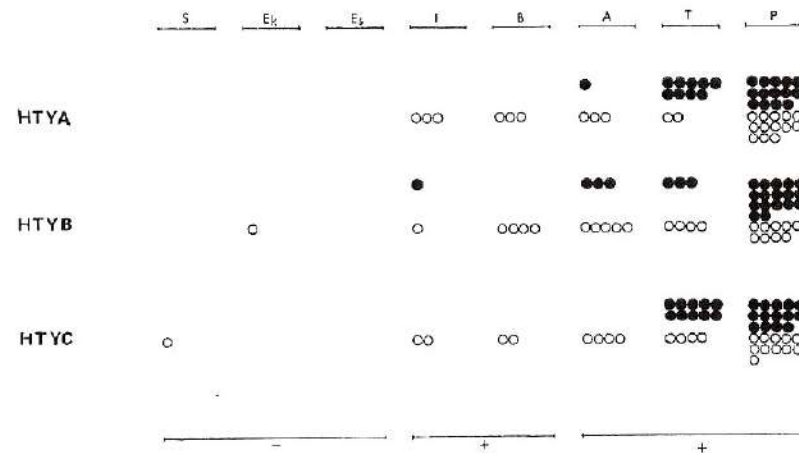
DIAGRAM 3



De lengte van de regeneraten op de 80^e dag na de amputatie.

• en ○ staan telkens voor 1 regeneraat resp. aan de linker en aan de rechter zijde. Verticaal zijn de verschillende experimenten vermeld. Horizontaal is de lengte aangegeven in mm. Het aantal proefdieren per experiment is 24.

DIAGRAM 4



Specificatie van de regeneraten op de 80^e dag na de amputatie.

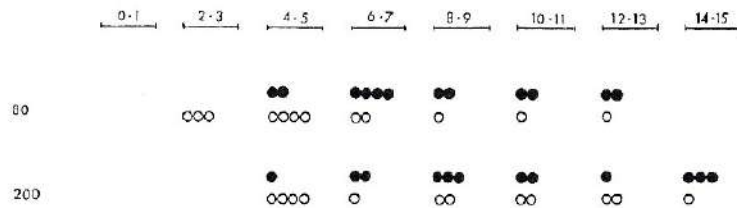
• en ○ staan telkens voor 1 regeneraat resp. aan de linker en aan de rechter zijde. Verticaal zijn de verschillende experimenten vermeld. Horizontaal is de kwaliteit van de regeneraten aangegeven (S = Gladde stomp; Ek = Epidermisknop; Es = Epidermissliert; I = Epidermissliert met bindweefsel; B = Blastema; A = Afgeplat Blastema; T = Tenenplaat; P = Poot). Het aantal proefdieren per experiment is 24.

raat komt even vaak voor aan de linker als aan de rechter zijde. Opnieuw blijken verder bij vergelijking van alle linkszijdige met alle rechtszijdige regeneraten, bij de laatste weer wat meer kleine en laag geklasseerde voor te komen.

Bij verlenging van het experiment van 80 tot 200 dagen na de amputatie nemen de regeneraten slechts weinig in lengte toe (Diagram 5); dit is in overeenstemming met de eveneens slechts geringe toename van de totale lengte van de proefdieren gedurende dezelfde periode. Ook de kwaliteit van de regeneraten blijkt niet of nauwelijks te veranderen (zie Diagram 6). In 20 van de 24 gevallen werd op beide tijdstippen dezelfde beoordeling gegeven. Twee maal werd een eerder als epidermissliert met bindweefsel geklasseerd regeneraat, nu als blastema betiteld; één maal werd een afgeplat blastema tot een tenenplaat, en eenmaal een tenenplaat tot een poot. Deze "mutaties" komen niet tot uitdrukking in de indeling van de regeneraten in de gekozen categorieën +, ± en -. Op beide tijdstippen was deze voor de linkszijdige regeneraten + : 12, ± : 0 en - : 0 en voor de rechtszijdige + : 10, ± : 2, - : 0.

Evenals bij de eerste reeks experimenten toonde ongeveer de helft van de huid-implantaten voor een groter of kleiner deel de eerder beschreven depigmentatie. Ook was weer bij verscheidene proefdieren aan het einde van het experiment de bestraalde zone van het lichaam nog te herkennen aan een grovere pigmentatie.

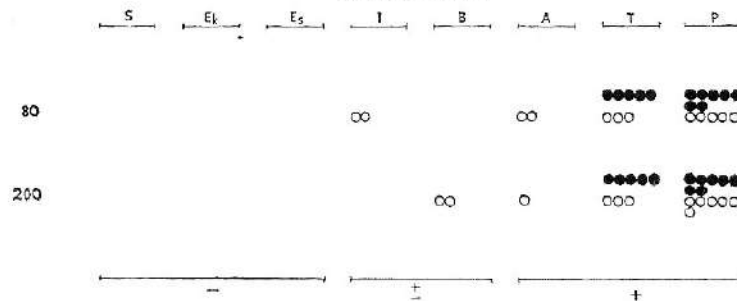
DIAGRAM 5



De lengte van de regeneraten bij de helft van de proefdieren (12) van het experiment HTYC op de 80e en 200e dag na de amputatie.

• en ○ staan voor 1 linker resp. rechter regeneraat. Verticaal is vermeld het aantal dagen na de amputatie. Horizontaal is de lengte van de regeneraten aangegeven in mm.

DIAGRAM 6



Specificatie van de regeneraten bij de helft van de proefdieren (12) van het experiment HTYC op de 80e en 200e dag na de amputatie.

• en ○ staan telkens voor 1 linker resp. rechter regeneraat. Verticaal is vermeld het aantal dagen na de amputatie. Horizontaal is de kwaliteit van de regeneraten aangegeven (S=Gladde stomp; Ek=Epidermisknop; Es=Epidermissliert; I=Epidermissliert met bindweefsel; B=Blastema; A=Afgeplat Blastema; T=Tenenplaat; P=Poot).

DISCUSSIE

De waarneming, dat het vrijwel niets uitmaakt, of men de kwaliteit van de regeneraten op de 200e dag dan wel op de 80e dag na amputatie beoordeelt, bevestigt de eerder in deze zin opgedane

ervaring. Een duur van 80 dagen voor dit type van experimenten bij proefdieren van deze leeftijd, is klaarblijkelijk voldoende, om een goed beeld te krijgen van het vermogen tot regeneratie van bestraalde pootstompen.

De resultaten van de in hoofdstuk III beschreven reeks experimenten hadden reeds laten zien, dat de mate van regeneratie van de bestraalde achterpoot-stompen niet te beïnvloeden is, door geheel verschillende implantaten in contact te brengen met het einde van de naar de flank gedeveerde linker nervus ischiadicus.

De hier beschreven reeks experimenten toont bovendien, dat noch het wel of niet in contact brengen van de zenuw met het implantaat, noch de duur van dit contact noemenswaardige verschillen teweegbrengen in de mate, waarin de bestraalde pootstompen tot regeneratie in staat zijn. Immers, de in de HTYC-serie (zonder contact zenuw-implantaat) gevormde regeneraten doen niet onder voor die in de experimenten HTYA (contact gedurende 12 dagen) en HTYB (contact gedurende 5 dagen) of die in de desbetreffende reeksen van het vorige hoofdstuk (permanent contact).

Geconcludeerd moet dus worden, dat het ontstaan van de regeneraten, waargenomen in de tot dusver uitgevoerde experimentele reeksen, niet is toe te schrijven aan een contact van de gedeveerde zenuw met het implantaat. Het is evenwel niet uit te sluiten, dat het aanbrengen of alleen de aanwezigheid van een implantaat op enigerlei wijze van belang is voor de regeneratie van de bestraalde achterpoot-stompen, daar nog geen controle-experiment is uitgevoerd, waarbij geen implantaat is aangebracht.

Vanzelfsprekend geraakt met de bovenstaande conclusie de juistheid van de interpretatie van de eerder door HARREBOMÉE waargenomen regeneratie van bestraalde pootstompen aan twijfel onderhevig. TRAMPUSCH (1964a) meende, dat hier sprake was van een herstel van het regeneratievermogen van de bestraalde achterpoten, dat berustte op het herstel van de functie van de bestraalde en gedeveerde linker nervus ischiadicus door contact met een onbestraald pootvormend implantaat in de flank; dit herstel zou zich centripetaal uitbreiden naar de bestraalde zenuwcellichamen en via deze naar de zenuwvezels, die de beide achterpoot-stompen innerveren, zodat deze daar de regeneratie tenslotte op gang konden brengen — “nerves as morphogenetic mediators”. Is bij die proef

wel inderdaad het contact tussen het implantaat en de gedeveeerde zenuw verantwoordelijk geweest voor de waargenomen regeneratie van de bestraalde pootstompen?

Alvorens deze vraag nader aan de orde te stellen zal evenwel eerst moeten worden gepoogd een verklaring te vinden voor het ontstaan van de regeneraten van de bestraalde pootstompen, zoals dit in de tot dusver uitgevoerde experimenten is waargenomen.

In dit verband zijn de volgende vier mogelijkheden te overwegen.

(1) Het implantaat wordt geïnnerveerd door zenuwvezels, die vanuit de onderliggende weefsels ingroeien. Deze komen uit dezelfde ruggemergssegmenten en spinale ganglia als de nervus ischiadicus en zouden daarom dezelfde bemiddelende rol kunnen spelen, als eerder aan de gedeveeerde nervus ischiadicus was toegeschreven.

(2) Het implantaat is verantwoordelijk voor een humoraal mechanisme, dat de regeneratie van bestraalde extremiteiten stimuleert. THORNTON (persoonlijke mededeling) meent bijvoorbeeld, dat afweerreacties tegen een homoplastisch implantaat elders in het lichaam de regeneratie van extremiteiten wel degelijk kunnen beïnvloeden. Zoals eerder gezegd, zou de depigmentatie van de huid-implantaten in de flank inderdaad op het bestaan van afweerreacties kunnen wijzen.

(3) De traumatisering van de nervus ischiadicus en het letsel aan de weefsels van de poot toegebracht bij de deviatie zouden regeneratie ter plaatse kunnen bevorderen en mogelijk, via de zenuw en het ruggemerg, ook in de poot aan de andere zijde. POLEZHAEV (1939) heeft een stimulerend effect van traumata op de regeneratie beschreven. Bij pootstompen van pas gemetamorfoseerde kikkers, die anders geen regeneraat gevormd zouden hebben, kon hij regeneratie opwekken door herhaalde traumatisatie.

(4) Hoewel de proefdieren zijn bestraald op een wijze, die sinds jaren beschouwd wordt als adequaat om regeneratie te verhinderen, zou toch de bestraling niet toereikend kunnen zijn om regeneratie voor de duur van het experiment uit te sluiten.

Om tot een besluit te komen ten aanzien van de betekenis van deze verschillende mogelijkheden, die zich afzonderlijk of in combinatie zouden kunnen voordoen, was nader onderzoek van elk ervan gewenst. Daarna pas zal de juistheid van de interpretatie van het ontstaan van de door HARREBOMÉE opgewekte regeneraten ter discussie worden gesteld.

HOOFDSTUK V

EEN VERKLARING VOOR DE WAARGENOMEN REGENERATIE VAN BESTRAALDE POOTSTOMPEN

INLEIDING

De regeneratie van bestraalde achterpoot-stompen, nadat aan één zijde de nervus ischiadicus onderhuids was gedeveerd naar de flank en in contact gebracht met een wondepitheel, gevormd door een daar geïmplanteerde onbestraalde huidlap, was door TRAMRUSCH (1964a) als volgt geïnterpreteerd. De gedeveeerde zenuw herstelt zich van de gevolgen van de bestraling door het contact met het dermisvrije wondepitheel; dit herstel breidt zich centripetaal uit naar de (bestraalde) zenuwcellichamen en vandaar centrifugaal naar de andere zenuwen in de bestraalde achterpootstompen, waarvan de regeneratie door de herstellende axonen weer wordt mogelijk gemaakt. Verder werd verondersteld, dat contact met dermis bevattende huid (bestraald of onbestraald) of met een uit bestraalde huid voortgekomen onvolwaardig wondepitheel, niet het herstel van een bestraalde zenuw zou kunnen bewerkstelligen.

Het in de hoofdstukken III en IV gerapporteerde onderzoek heeft inmiddels geleerd, dat (a) het aanbrengen van bestraalde of onbestraalde, wel of geen wondepitheel vormende implantaten in contact met een gedeveeerde zenuw, steeds gevolgd werd door ongeveer dezelfde mate van regeneratie van de bestraalde pootstompen en (b) dat deze laatste zelfs evenzo tot regeneratie in staat waren, als de gedeveeerde zenuw al vóór het aanbrengen van het implantaat in de poot was teruggelegd, dus zonder dat enig contact tussen beide had plaats gevonden.

Ter verklaring van deze regeneratie zijn aan het einde van het vorige hoofdstuk vier mogelijkheden geopperd. Bij de opzet van de volgende experimenten, die bedoeld waren om elk dezer mogelijkheden te toetsen, werd er rekening mee gehouden, dat zij gelijktijdig uitgevoerd moesten worden. Dit was nodig, omdat proefdieren van de gewenste afmetingen in de regel slechts twee keer per jaar beschikbaar zijn en bij successievelijke uitvoering van de proeven de resultaten al te lang op zich zouden laten wachten.

Ten eerste werd nagegaan, of de gebruikelijke wijze van bestraling met 1000 *r* inderdaad afdoende was om "spontane" regeneratie van de achterpoten geheel te onderdrukken. Hiertoe werden bij experiment X bestraalde achterpoten, zonder enige verdere ingreep, geamputeerd.

Ten tweede werd onderzocht, in hoeverre het bij de deviatie aan de zenuw of aan de andere delen van de poot toegebrachte letsel de regeneratie van de op gebruikelijke wijze bestraalde pootstompen zou kunnen bevorderen (experiment MZ; M=manipuleren, Z=zenuw).

Ten derde werd de betekenis nagegaan van een innervatie van het implantaat in de flank door zenuwen daar ter plaatse, die mogelijk uit dezelfde ruggemergssegmenten en spinale ganglia voortkwamen als de nervus ischiadicus. Om hierbij afweerreacties uit te sluiten werd het huidimplantaat genomen van de staart van hetzelfde dier (autoplastisch). Bij het experiment AHTY werd een dergelijke huidlap, onbestraald en gevensterd, in de flank in contact gebracht met de uit de linker bestraalde achterpoot gedevieerde nervus ischiadicus (A=autoplastisch, H=huid, T=gevensterd, Y=onbestraald); bij het experiment AHTYC werd eenzelfde implantaat aangebracht, maar pas nadat de eerder voor deviatie vrijgeprepareerde zenuw weer in de poot was teruggelegd. Opdat andermaal de bijzondere betekenis zou kunnen blijken van een door onbestraalde huid gevormd wondepitheel, werden in de experimenten AHSY en AHTX nog autoplastische implantaten bestaande uit ongevensterde, onbestraalde huid, respectievelijk gevensterde, bestraalde huid in contact gebracht met een gedevieerde nervus ischiadicus (S=ongevensterd, X=bestraald).

Door een vergelijking te maken tussen de resultaten van de bovengenoemde 4 proefseries met autoplastische implantaten en de overigens geheel gelijk uitgevoerde experimenten met homoplastische implantaten in de vorige hoofdstukken (series HTY, HSY, HTX en HTYC), zal een eventuele stimulans van afweerreacties tegen weefsel, afkomstig van een donor, op de regeneratie van bestraalde pootstompen zijn aan te tonen.

Tenslotte werden, voor het geval dat een dosis van 1000 *r* inderdaad onvoldoende zou blijken (experimenten X en MZ) om regeneratie te voorkomen, de proeven MZ, AHTY en AHTYC ook verricht bij dieren, die overigens op de gebruikelijke wijze, maar nu met een dosis van 1500 *r*, waren bestraald (experimenten 15MZ, 15AHTY, 15AHTYC).

Het resultaat van de proeven werd, zoals steeds, afgelezen aan het al of niet regenereren van de beide bestraalde en geamputeerde achterpoten.

De ervaringen met de eerdere experimenten (hoofdstukken III en IV) leerden, dat ook uit de resultaten bij de helft van het per proef gebruikte aantal dieren dezelfde conclusies getrokken hadden moeten worden, namelijk dat in alle experimenten regeneratie van de bestraalde achterpoten mogelijk was geweest. Daarom werd gemeend, dat in het vervolg – tot het tegendeel eventueel zou blijken – met 12 proefdieren per experiment kon worden volstaan. Alleen voor de X-serie werden, vanwege het bijzonder grote belang van dit experiment, 24 proefdieren gebruikt.

KORTE BESCHRIJVING VAN DE EXPERIMENTEN

Experiment X; uitsluitend bestraling met 1000 r

- (a) Bestraling van het lumbo-sacrale gebied en de achterpoten met 1000 *r*.
- (b) 7 dagen na bestraling: amputatie van beide achterste extremiteiten halverwege het bovenbeen.
- (c) 80 dagen na amputatie: einde van het experiment.

Experiment MZ; schijndeviatie van de nervus ischiadicus na bestraling met 1000 r

- (a) Bestraling van het lumbo-sacrale gebied en de achterpoten met 1000 *r*.
- (b) 7 dagen na bestraling:
 1. Vrijprepareren van de linker nervus ischiadicus en verdere behandeling als voor deviatie, echter direct gevolgd door teruglegging van de zenuw in de poot en sluiting van de wond.
 2. Amputatie van beide achterpoten halverwege het bovenbeen.
- (c) 80 dagen na amputatie: einde van de proef.

Experimenten AHTY, AHSY, AHTX; autoplastische implantaten na bestraling met 1000 r

- (a) Bestraling van het lumbo-sacrale gebied en de achterpoten met 1000 *r*; uitsluitend bij experiment AHTX werd, omdat in dit geval autoplastische bestraalde huid-implantaten gebruikt zouden moeten worden, 1 dag later bovendien het gebied, direct achter de cloaca, met 1000 *r* bestraald.

(b) 7 dagen na de (eerste) bestraling:

1. Maken van een huidvrij carré in de flank binnen de bestraalde zone.
2. Onderhuidse deviatie van de linker nervus ischiadicus naar het carré.
3. Uitsluitend bij experiment AHTYC: terugleggen van de gedeveerde zenuw in zijn oorspronkelijke positie.
4. Aanbrengen van een autoplastisch implantaat (zie Tabel 4) in het carré.
5. Amputatie van de linker en rechter achterpoot halverwege het bovenbeen.
6. Sluiting van het wondgebied waarvandaan het huid-implantaat genomen was, met huid van de geamputeerde pootdelen.

(c) 80 dagen na amputatie: einde van het experiment.

TABEL 4

Experiment	Aard van het implantaat	Kenmerken van het implantaat	
		getraumatiseerd	bestraald
AHTY en 15AHTY	huid	+	—
AHTYC* en 15AHTYC*	huid	+	—
AHSY	huid	—	—
AHTX	huid	—	+

Overzicht van de aard en de kenmerken van de in hoofdstuk V gebruikte autoplastische implantaten (A=autoplastisch; H=huid; S=ongetraumatiseerd; T=getraumatiseerd; Y=onbestraald; X=bestraald).

* geen contact met de gedeveerde zenuw.

Experiment 15MZ; schijndeviatie van de nervus ischiadicus na bestraling met 1500 r

Dit experiment is, behalve de toepassing van een dosis van 1500 r, op geheel dezelfde wijze uitgevoerd als experiment MZ.

Experimenten 15AHTY en 15AHTYC; autoplastische implantaten na bestraling met 1500 r

De uitvoering van deze experimenten komt, afgezien van de toegediende dosis röntgenstralen, overeen met die van de experimenten AHTY en AHTYC.

Het aantal proefdieren per experiment bedroeg 12, behalve bij

experiment X, waar 24 dieren werden gebruikt. Bij het begin van de proeven hadden de dieren een totale lengte van 75–85 mm en een kop-poot lengte van 38–42 mm.

WAARNEMINGEN

Geen van de proefdieren is voor het einde van een experiment gestorven. Zij bereikten een totale lengte van 95–106 mm en een kop-poot lengte van 47–53 mm. Deze lengten zijn duidelijk geringer dan die, welke bij de voorgaande experimenten werden bereikt. Daar groeiden immers de proefdieren in totale lengte omstreeks 33 mm tegen ongeveer 20 mm bij deze experimenten; de overeenkomstige cijfers voor de kop-poot lengte zijn ongeveer 16 tegen circa 10 mm.

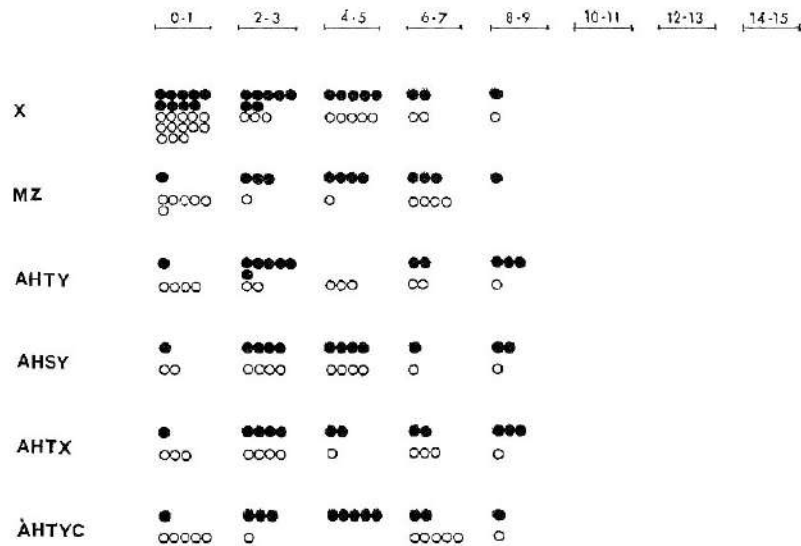
Bij alle experimenten, waar een bestralingsdosis van 1000 r is toegepast (X, MZ, AHTYC, AHSY, AHTX) heeft een groot deel van de bestraalde pootstompen poten, tenenplaten, blastemata als regeneraten gevormd. Dit is duidelijk geïllustreerd in Tabel 5 en

TABEL 5

Serie	Experiment (links)	Totaal aantal proefdieren	Resultaat					
			Links			Rechts		
			—	±	+	—	±	+
X	alleen bestraling met 1000 r	24	8	5	11	12	2	10
MZ	schijndeviatie	12	0	3	9	3	3	6
AHTY	gedeveerde zenuw in contact met getraumatiseerde, onbestraalde huid	12	0	1	11	3	2	7
AHSY	gedeveerde zenuw in contact met ongetraumatiseerde, onbestraalde huid	12	1	0	11	2	2	8
AHTX	gedeveerde zenuw in contact met ongetraumatiseerde, bestraalde huid	12	0	2	10	1	4	7
AHTYC	schijndeviatie, autoplastisch huid-implantaat	12	0	0	12	3	3	6

De mate van regeneratie van bestraalde pootstompen aan linker en rechter zijde, uitgedrukt in —, ± en +, beoordeeld op de 80e dag na amputatie (—=gladde stomp, epidermisknop of -sliert; ±=epidermissliert met bindweefsel, blastema; +=afgeplat blastema, tenenplaat, poot). De rechter achterpoot is steeds alleen bestraald met 1000 r.

DIAGRAM 7



De lengte van de regeneraten op de 80e dag na de amputatie.

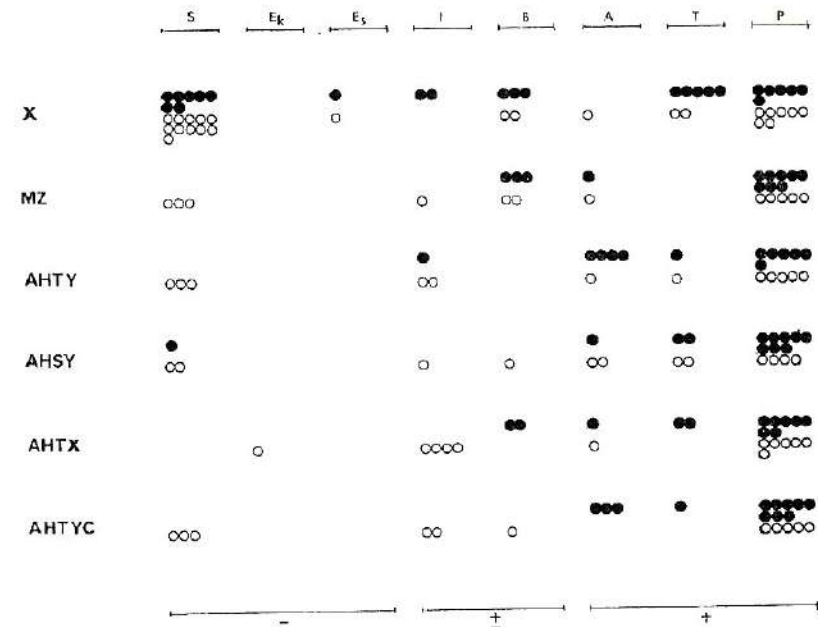
● en ○ staan telkens voor 1 regeneraat resp. aan de linker en aan de rechter zijde. Verticaal zijn de verschillende experimenten vermeld. Horizontaal is de lengte aangegeven in mm. Het aantal proefdieren bij experiment X is 24, bij de overige experimenten 12.

in de Diagrammen 7 en 8, waarin de lengte en de aard van de regeneraten is weergegeven.

Binnen de diverse series zijn de onderlinge verschillen tussen de linkszijdige regeneraten van de onderscheiden proefdieren, evenals die tussen de rechtszijdige, aanzienlijk. Bovendien zijn de regeneraten aan de beide zijden van eenzelfde proefdier vrijwel nooit van gelijke grootte en kwaliteit, zoals trouwens ook bij vroegere experimenten al werd opgemerkt.

In de X-serie is de mate van regeneratie van de zonder verdere ingrepen geamputeerde linker en rechter poten gelijk. Bij de andere series hebben de pootstompen aan de linker geopereerde zijde (deviatie) relatief een groter aantal beter ontwikkelde regeneraten, dan de slechts geamputeerde rechter pootstompen. Het aantal van 11 aan de linker kant als + geklasseerde regeneraten in de 24 proefdieren tellende X-serie is wat klein vergeleken met 10 van bijvoor-

DIAGRAM 8



Specificatie van de regeneraten op de 80e dag na de amputatie.

● en ○ staan telkens voor 1 regeneraat resp. aan de linker en aan de rechter zijde. Verticaal zijn de verschillende experimenten vermeld. Horizontaal is de kwaliteit van de regeneraten aangegeven (S=Gladdo stomp; Ek=Epidermisknop; Es=Epidermissliert; I=Epidermissliert met bindweefsel; B=Blastema; A=Afgeplat Blastema; T=Tenenplaat; P=Poot). Het aantal proefdieren bij experiment X is 24, bij de overige experimenten 12.

beeld serie MZ met 12 proefdieren. Er is natuurlijk in samenhang hiermee ook een verschil tussen de aantallen van als — beoordeelde regeneraten in de X-serie en de volgende series.

Verder is er een onderscheid in de vorm van de verst ontwikkelde regeneraten tussen de serie X en de andere experimenten uit deze en eerder beschreven reeksen. Zij vallen op door hun slanke bouw en het geringe aantal tenen (meestal 2), die bovendien in verhouding tot de rest van het regeneraat erg kort lijken (Fig. 1a). Bij de andere experimenten werden regeneraten met een dergelijke bouw ook waargenomen, maar vaker waren de regeneraten hier toch forser en droegen zij meer tenen (zie Fig. 1b en Tabel 6).

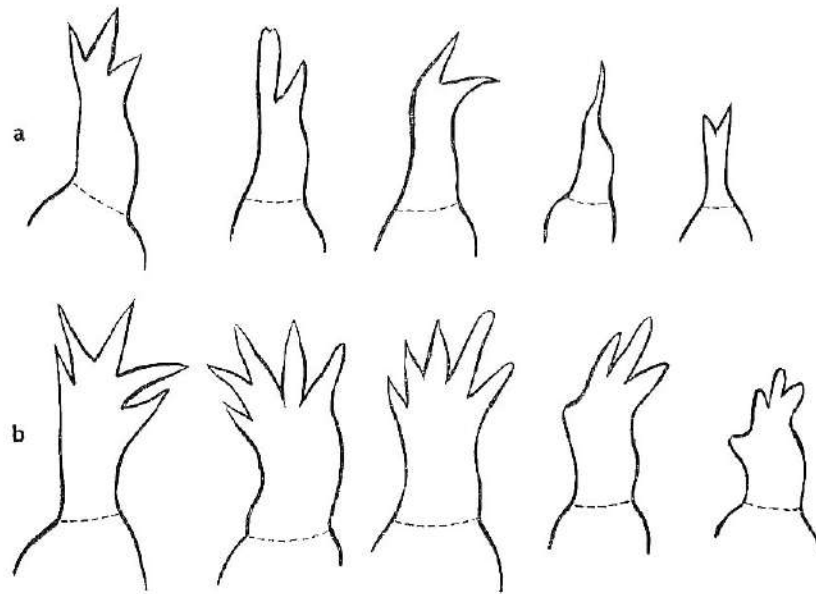


Fig. 1. a. Slanke regeneraten met een gering aantal tenen, voortgekomen uit linkszijdige bestraalde pootstompen in serie X (bestraling met 1000 r bij dieren in zijligging; amputatie zonder verdere ingrepen).
b. Forsere regeneraten met meer tenen, voortgekomen uit bestraalde linkszijdige pootstompen in serie AHTYC (bestraling met 1000 r bij dieren in zijligging; schijndeviatie van de linker nervus ischiadicus; aanbrengen van een autoplastisch implantaat in de flank; amputatie).

TABEL 6

Serie	Linker achterpoot						Rechter achterpoot							
	als “poot” geklasseerd	met aantal tenen van						als “poot” geklasseerd	met aantal tenen van					
		1	2	3	4	5	6		1	2	3	4	5	6
X	6	1	4	1	0	0	0	7	0	7	0	0	0	0
MZ	8	0	2	1	3	2	0	5	0	2	1	2	0	0
AHTY	6	0	1	4	0	1	0	5	0	3	1	1	0	0
AHTYC	8	0	1	2	2	3	0	6	0	1	2	3	0	0
AHSY	8	0	3	2	0	2	1	4	0	2	1	1	0	0
AHTX	7	0	2	1	1	3	0	6	0	3	1	1	1	0

Het aantal tenen van de als "poot" geklasseerde regeneraten bij de verschillende proefseries.

Wat betreft de kwaliteit van de regeneraten, tonen de experimenten MZ, AHTY, AHTYC, AHSY, AHTX een grote overeenkomst, zowel onderling als ook met de soortgelijke experimenten waarin homoplastische implantaten werden gebruikt (hoofdstukken III en IV). De lengte van de regeneraten was bij deze laatstgenoemde proeven wel groter; dit is echter in overeenstemming met de grotere totale lengte, die de proefdieren daar tijdens de duur van de proeven hebben bereikt.

Een geheel ander beeld leveren de resultaten van de 3 experimenten, waarbij een dosis röntgenstralen van 1500 r is toegepast: de beide achterpoten toonden hier géén of slechts een geringe mate van regeneratie. Poten of tenenplaten werden in het geheel niet waargenomen; de verst ontwikkelde regeneraten waren afgeplatte blastemata (Tabel 7, Diagrammen 9 en 10).

TABEL 7

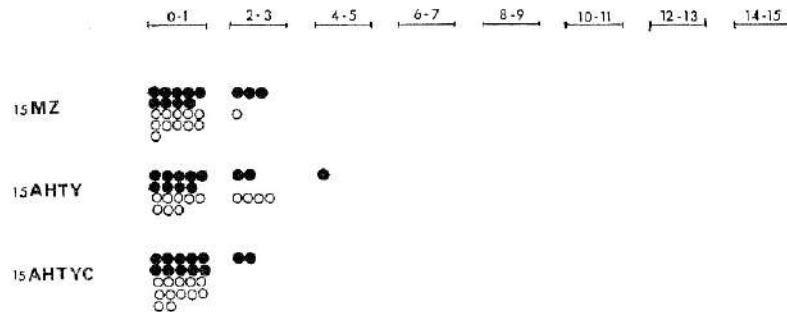
Serie	Experiment (links)	Totaal aantal proefdieren	Resultaat			
			Links		Rechts	
			—	±	+	— ± +
15MZ	schijndeviatie na bestraling met 1500 r	12	8	1	3	10 1 1
15AHTY	gedevieerde zenuw in contact met getraumatiseerde onbestraalde huid	12	6	4	2	9 2 1
15AHTYC	schijndeviatie met implantatie van getraumatiseerde onbestraalde huid	12	8	4	0	12 0 0

De mate van regeneratie van bestraalde (1500 r) pootstompen aan linker en rechter zijde, uitgedrukt in —, ± en +, beoordeeld op de 80e dag na amputatie (—=gladde stomp, epidermisknop of -sliert; ±=epidermissliert met bindweefsel, blastema; +=afgeplat blastema, tenenplaat, poot). De rechter poot is steeds alleen bestraald met 1500 r.

Bij de in 6 proefseries (AHTY, AHTYC, AHSY, AHTX, 15AHTY, 15AHTYC) aangebrachte autoplastische huidimplantaten werd in geen enkel geval de eerder bij homoplastische regeneraten waargenomen depigmentatie opgemerkt.

Ook in deze reeks experimenten was aan het einde van de proeven bij verscheidene dieren het bestraalde lumbo-sacrale gebied duidelijk aan zijn afwijkende pigmentatiepatroon te onderscheiden van de aangrenzende onbestraalde huid.

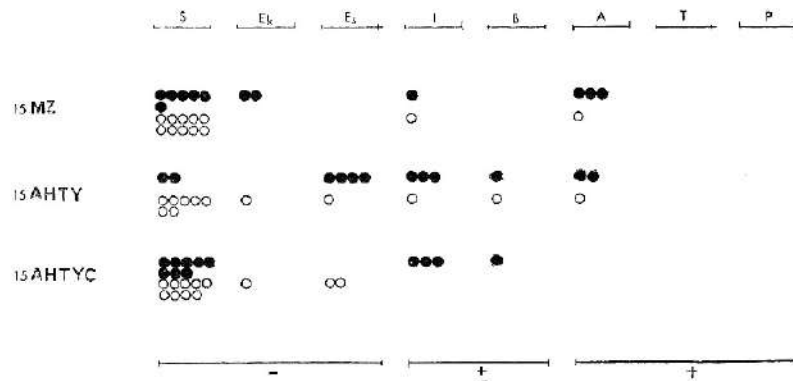
DIAGRAM 9



De lengte van de regeneraten op de 80e dag na de amputatie.

● en ○ staan telkens voor 1 regeneraat resp. aan de linker en aan de rechter zijde. Verticaal zijn de verschillende experimenten vermeld. Horizontaal is de lengte aangegeven in mm. Het aantal proefdieren per experiment is 12.

DIAGRAM 10



Specificatie van de regeneraten op de 80e dag na de amputatie.

● en ○ staan telkens voor 1 regeneraat resp. aan de linker en aan de rechter zijde. Verticaal zijn de verschillende experimenten vermeld. Horizontaal is de kwaliteit van de regeneraten aangegeven (S=Gladde stomp; Ek=Epidermisknop; Es=Epidermissliert; I=Epidermissliert met bindweefsel; B=Blastema; A=Afgeplat Blastema; T=Tenenplaat; P=Poot). Het aantal proefdieren per experiment is 12.

DISCUSSIE

De vele regeneraten, ontstaan in het experiment X, waarbij de bestraalde achterpoten enkel en alleen waren geamputeerd, tonen onomstotelijk aan, dat bestraling met 1000 r, op een wijze zoals tot nu toe in dit onderzoek en ook sinds verscheidene jaren in het laboratorium uitgevoerd, niet afdoende is om regeneratie blijvend te onderdrukken. De in deze proefserie gevormde slanke en meestal slechts 2 tenen dragende poten doen denken aan regeneraten, verkregen door Goss (1957) onder de volgende omstandigheden. Bij volwassen *Triturus viridescens* werd één overlangse helft van het onderbeen bestraald. De na amputatie door het distale deel van het onderbeen waargenomen regeneratie ging alleen uit van de onbestraalde helft van de stomp. De regeneraten bestonden alleen uit de bijpassende helft van de voet en hadden gemiddeld 2 tenen. De in de X-serie waargenomen regeneraten ontstonden vanaf een amputatievlak door het bovenbeen en zijn (daarom) langer; hun distale deel toont echter grote gelijkenis met de door Goss beschreven regeneraten. Zou deze morfologische overeenkomst er misschien op wijzen, dat in de poten van de X-serie een zo groot verval van het stralingseffect bestaat, dat nog maar één (overlangse) helft van de poot in staat is tot regeneratie?

De regeneraten in de series MZ, AHTY, AHTYC, AHSY en AHTX zijn talrijker maar ook forser gebouwd en van meer tenen voorzien, dan die in de X-serie. Daar de procedure in de X-serie zich alleen door het niet vrijprepareren van de nervus ischiadicus onderscheidt van die in de andere hier besproken experimenten, zou het verschil in aanzien van de regeneraten, door deze ingreep veroorzaakt kunnen zijn. Het letsel aan de zenuw en aan de omgevende delen in de poot toegebracht, zou tot een "betere" regeneratie van deze op zich zelf onvoldoende bestraalde linkszijdige pootstompen kunnen leiden. Opmerkelijk is dan echter, dat ook aan de rechter niet getraumatiseerde zijde forser regeneraten worden gevormd.

Uit de grote overeenkomst in de resultaten van enerzijds de serie MZ, en anderzijds de series AHTY, AHTYC, AHSY, AHTX kan worden afgeleid, dat het contact van een gedeveerde zenuw met een implantaat in de flank niet verantwoordelijk is voor de regeneratie van de bestraalde pootstompen; dit bevestigt een reeds eerder (hoofdstuk IV) geformuleerde conclusie. Voorts mag er uit worden afgeleid, dat het autoplastische implantaat — bestraald of on-

bestraald, getraumatiseerd of niet — ook op andere wijze geen invloed uitoefent op het regeneratievermogen van de bestraalde pootstompen, dus ook niet via een eventuele innervatie door ter plaatse in de flank aanwezige zenuwen.

Vergeleken met de regeneraten, die ontstonden wanneer homoplastische implantaten waren aangebracht (alle experimenten in de hoofdstukken III en IV), zijn de regeneraten in de series met autoplastische implantaten beslist kleiner. Dit zal verband houden met de geringere totale lengten, die de proefdieren in deze laatste series, mogelijk ten gevolge van een andere voeding hebben bereikt. De hoge mate van overeenkomst in de kwaliteit van de regeneraten bij de experimenten met homoplastische (hoofdstukken III en IV) en die met autoplastische implantaten (AHTY, AHTYC, AHSY en AHTX) levert een aanwijzing, dat aan afweerreacties geen speciale betekenis voor de regeneratie van bestraalde pootstompen mag worden toegekend. Wel wordt het vermoeden gesteund, dat afweerreacties de oorzaak zijn van de in ongeveer de helft van de gevallen waargenomen depigmentatie van homoplastische implantaten, doordat dergelijke pigment-veranderingen bij autoplastische implantaten volledig ontbreken.

Bij de tot nu toe besproken experimenten waren de achterpoten en het lumbo-sacrale gebied steeds met een dosis röntgenstralen van 1000 r bestraald. De vorming van regeneraten kon worden toegeschreven aan gebruik van een bestralingsdosis, die, althans op deze wijze toegediend, onvoldoende was om het vermogen tot regeneratie geheel te onderdrukken; aan het eventuele vrijprepareren van de nervus ischiadicus kon bovendien nog een regeneratie bevorderend effect worden toegeschreven. Een dosis van 1500 r zoals bij de experimenten 15MZ, 15AHTY, 15AHTYC gebruikt, was kennelijk wel afdoende om het ontstaan van als poot of als tenenplaat te kenmerken regeneraten te voorkomen. Bij onderlinge vergelijking van de resultaten van deze experimenten bleek opnieuw, dat een in de flank aangebracht onbestraald implantaat, al of niet in contact met een gedeveerde zenuw, de regeneratie van bestraalde pootstompen niet bevordert.

Als samenvatting mag gesteld worden:

(1) De sinds verscheidene jaren in het laboratorium en ook in dit onderzoek toegepaste bestraling is onvoldoende om regeneratie geheel te verhinderen.

(2) Het vrijprepareren van de nervus ischiadicus, voorafgaand aan de amputatie van op deze wijze bestraalde poten, heeft het ontstaan van forsere en meer tenen dragende regeneraten tot gevolg.

(3) Het aanbrengen van een implantaat, van welke aard ook, in contact met een gedeveerde zenuw resulteert niet in de vorming van "betere" regeneraten, dan wanneer de nervus ischiadicus alleen is vrijgeprepareerd en weer in de poot teruggelegd (er is dus geen reden om de waargenomen regeneratie toe te schrijven aan het contact van een gedeveerde zenuw met een onbestraald implantaat).

(4) Van een homoplastisch implantaat gaat, vergeleken met een autoplastisch, geen extra stimulans — via eventueel opgewekte afweerreacties — uit op het ontstaan van regeneraten uit bestraalde pootstompen.

Deze conclusies zijn van grote betekenis voor het uitgangspunt van het onderzoek. Het door TRAMPUSCH (1964a) voorgestelde mechanisme ter verklaring van het herstel van het regeneratievermogen van bestraalde achterpoten was voor een belangrijk deel gebaseerd op de waarneming van regeneratie van bestraalde achterpoot-stompen, nadat aan één zijde de nervus ischiadicus was gedeveerd en in de flank in contact gebracht met een pootvormend implantaat. De bij deze proef gebruikte proefdieren waren even groot en op dezelfde wijze, met een gelijke dosis (1000 r) en in hetzelfde bestralingsapparaat bestraald, als de dieren bij de in dit hoofdstuk beschreven experimenten. Aangenomen moet dus worden, dat ook toen de bestraling niet afdoende is geweest om regeneratie geheel te verhinderen. Bovendien kan het trauma, veroorzaakt door het vrijprepareren van de nervus ischiadicus, ook bij dat experiment de regeneratie van de bestraalde achterpoten nog bevordert hebben. De indertijd waargenomen regeneratie van bestraalde achterpoten kan zonder moeite op deze wijze worden verklaard. Dit houdt in, dat er geen reden meer is om daarvoor het contact van de gedeveerde nervus ischiadicus met het implantaat verantwoordelijk te stellen. Hiermee is tevens elke grond weggevalen voor de opvatting, dat de bestraalde gedeveerde zenuw zich herstelt door contact met het wondepitheel, gevormd door het onbestraald huid-implantaat.

De twee oorspronkelijk tot onderwerp van het onderzoek gekozen problemen hadden betrekking op twee aspecten van de veronderstelde relatie tussen de gedeveerde zenuw en het onbestraalde

implantaat in de flank. Het is nu duidelijk geworden, waarom bij onderzoek van het eerste probleem (hoofdstuk III) — aan welke voorwaarden het milieu van het einde van de gedeveerde zenuw moet voldoen om deze bestraalde zenuw en indirect ook het regeneratievermogen van de bestraalde pootstompen te kunnen herstellen — de resultaten moesten teleurstellen: bij gebruik van verschillende implantaten werd ongeveer eenzelfde mate van regeneratie van de achterpoten vastgesteld. Eveneens is nu duidelijk, waarom in hoofdstuk IV moest worden vastgesteld, dat de duur van het contact tussen het implantaat en de gedeveerde zenuw — en zelfs dat contact zelf — geen invloed had op de regeneratie van de bestraalde achterpoten. Inderdaad is in al deze gevallen, zoals al eerder (hoofdstuk III) werd vermoed, de waargenomen regeneratie het gevolg geweest van een “andere omstandigheid”, die zich bij alle experimenten gelijkelijk voordeed. Van de vier mogelijke omstandigheden, die in dit verband zijn voorgesteld (hoofdstuk IV) zijn nu de laatste twee, t.w. een onvoldoende mate van bestraling en daarbij een regeneratie bevorderend effect van het trauma, veroorzaakt door het vrijprepareren van de zenuw, bevestigd.

Bij de hierboven gegeven nieuwe interpretatie van de indertijd waargenomen regeneratie van beide bestraalde achterpoten, wanneer één nervus ischiadicus in contact stond met een implantaat in de flank (HARREBOMÉE, zie TRAMPUSCH 1964a), moet nog een enkel voorbehoud worden gemaakt. Bij de toen verrichte proeven bestond het implantaat uit gevensterde, onbestraalde poothuid en een onbestraalde epiphysis femoris, waaruit tezamen een ectopische poot ontstond. Ook bevond het implantaat zich craniaal van de bestraalde lumbo-sacrale zone, in onbestraald gebied en niet — zoals bij het eigen onderzoek — binnen de bestraalde gordel. Een eventuele betekenis van deze verschillen zal nog moeten worden onderzocht (hoofdstuk VII).

Toch bleef het moeilijk te aanvaarden, dat in eerdere proeven (TRAMPUSCH 1951, 1959a) bestraling met 1000 *r* wel afdoende was geweest om regeneratie te voorkomen terwijl nu het tegendeel is gebleken. Trouwens de bij alle experimenten gesignaleerde grote variaties in de mate van regeneratie van met 1000 *r* bestraalde achterpoten, waren op zichzelf ook al merkwaardig; temeer daar na

bestraling met 1500 *r* de pootstompen vrijwel uniform op amputatie reageerden. Deze overwegingen gaven aanleiding tot het opnieuw bestuderen van de grote variaties in de mate van regeneratie bij de met 1000 *r* bestraalde proefdieren. Zoals eerder is vermeld was opgemerkt dat bij hetzelfde proefdier de regeneraten aan de linker en aan de rechter zijde nooit precies gelijk waren en dat het grootste van de beiderzijdse regeneraten even vaak aan de linker als aan de rechter zijde voorkwam. Op deze bijzonderheden werd nu speciaal gelet. Bij het bezien van de resultaten van het experiment HSX (hoofdstuk III), viel het nu voor het eerst op, dat de proefdieren verdeeld leken te kunnen worden in tweetallen, zodanig dat het grootste regeneraat bij de ene partner van het tweetal zich aan de andere zijde bevond, dan dat bij de andere partner. Een dergelijk klaarblijkelijk paarsgewijs bepaald verschijnsel kon niet anders dan in verband worden gebracht met het enige onderdeel van het experiment, waarbij de proefdieren met tweetallen tegelijk waren behandeld, t.w. de bestraling. Uit de protocollen kon worden opgemaakt, dat van de in totaal 384 met 1000 *r* bestraalde proefdieren er 302 waren, waarvan de partner ook als proefdier was gebruikt (in de overige gevallen had de partner als donor gediend of was hij vroegtijdig overleden). Bij de zo gevonden 151 tweetallen van gelijktijdig bestraalde proefdieren bleek vervolgens, dat tenminste in 144 gevallen bij de HSX-serie gevonden regel opging.

Zoals in hoofdstuk II is beschreven, werden vóór de bestraling 2 genarcotiseerde dieren, face en face, de één op zijn linker en de ander op zijn rechter zijde, neergelegd op een vochtig gaasje in het bestralingsbakje, dat daarna in de stralenbundels van een erboven en een eronder aangebrachte röntgenbuis werd geplaatst. Verder naspeuren bracht aan het licht, dat bij een dergelijk tweetal het grootste regeneraat zich bij het in rechter zijligging bestraalde dier aan de rechter zijde bevond, en bij een in linker zijligging bestraald dier aan de linker zijde. Dit hield in, dat de pootstompen, die na amputatie de beste regeneraten vormden, tijdens de bestraling aan de onderkant, dus op de bodem van het bakje, gelegen hadden. Daarmee werd het zeer aannemelijk, dat deze onderliggende poten minder door de bestraling waren geschaad dan de bovenliggende.

Bij de overweging van de oorzaken hiervoor kwamen in beginsel twee mogelijkheden in aanmerking. Ten eerste zouden de proefdieren van onder door een geringere hoeveelheid straling bereikt kunnen

zijn dan van boven. Daarbij zou dan de absorptie door de in de stralenbundel over elkaar heen geprojecteerde lichaamsdelen (poten en tussenliggend deel van de romp) moeten hebben belet, dat bijvoorbeeld ter plaatse van de onderliggende poot een geringere dosis vanuit de onderste buis gecompenseerd zou worden door een grotere vanuit de bovenste. Ten tweede was het mogelijk, dat een ongelijke stralingsgevoeligheid van de weefsels in beide poten bestond, die wellicht verband zou kunnen houden met de zijligging van het proefdier tijdens de bestraling; men kan hier denken aan een eventuele belemmering van de bloed- of lymfe-circulatie.

De uitkomsten van enkele ter orientatie bedoelde dosimetriscie bepalingen wezen er inderdaad op, dat de hoeveelheden röntgenstralen, die een proefdier van boven, resp. van onder bereikten, niet gelijk waren. De bovenste buis leverde namelijk op het niveau van de bovenliggende achterpoot van het in zijligging neergelegde proefdier 540 r, terwijl in dezelfde tijdsduur voor de onderste buis op het niveau van de onderliggende poot 500 r werd gemeten. Bij dit laatste getal moet nog worden aangetekend dat de dosis röntgenstralen, die de onderliggende achterpoot de facto zal hebben bereikt, nog geringer zal zijn geweest als gevolg van een absorptie van ongeveer 10 % van de stralen door het als onderlegger dienende vochtige gaasje.

De wijze, waarop de genarcotiseerde proefdieren ter bestraling werden neergelegd, kan mogelijk ook de verklaring bieden voor de boven gesignaleerde discrepantie tussen TRAMPUSCH's (1951, 1959a) eerdere ervaring, volgens welke een dosis van 1000 r voldoende was om regeneratie te verhinderen en de in dit onderzoek verkregen tegengestelde resultaten (experiment X). Bij de betreffende experimenten van TRAMPUSCH waren de proefdieren afzonderlijk en in buikligging bestraald. Later, sinds 1958, werd het gebruik om tweetallen van proefdieren, face en face, in zijligging te bestralen, precies zoals het ook in dit onderzoek tot nu toe is gedaan. Aangenomen werd (TRAMPUSCH 1964a), dat 1000 r op deze wijze toegediend, ook voldoende was om regeneratie te onderdrukken. De mogelijkheid bestaat echter zeker, dat wanneer de proefdieren in zijligging zijn bestraald, elk van de in de stralenbundels over elkaar en over het tussenliggende deel van de romp heen geprojecteerde achterpoten aan een geringere hoeveelheid straling bloot heeft gestaan dan bij de zijwaarts gestrekte poten van een proefdier in

buikligging het geval was. Een dosis röntgenstralen, die in het laatste geval afdoende zou zijn om regeneratie geheel te verhinderen, kan in het eerste geval daartoe niet toereikend zijn. Zou men de regeneratie van de achterpoten bij in zijligging resp. in buikligging bestraalde proefdieren vergelijken, dan zou — hoewel ten onrechte — bij de eerste tot een herstel van het regeneratievermogen geconcludeerd moeten worden.

Op grond van het voorgaande mag men tot de onderstaande besluiten komen:

(1) De vorming van regeneraten uit bestraalde pootstompen, zoals waargenomen wanneer een gedeveerde nervus ischiadicus in contact is gebracht met een onbestraald poot-vormend implantaat (HARREBOMÉE, zie TRAMPUSCH 1964a), kan hoogstwaarschijnlijk worden toegeschreven aan een mate van bestraling, die niet voldoende was om regeneratie geheel te onderdrukken, en aan een de regeneratie bevorderend effect van het vrijprepareren van de zenuw.

(2) Wanneer de waarneming van HARREBOMÉE op deze wijze wordt geïnterpreteerd, is er geen grond meer voor de veronderstelling (TRAMPUSCH 1964a), dat de door bestraling teniet gedane regeneratie bevorderende invloed van axonen en zenuwcellichamen kan worden hersteld door contact van de axonen met een door onbestraalde huid gevormd wondepitheel.

(3) De oorspronkelijke probleemstelling, die een nadere analyse beoogde van het indertijd als gegeven beschouwde herstel van de bestraalde gedeveerde zenuw door een onbestraald implantaat in de flank, zoals in het experiment van HARREBOMÉE, mag nu als niet meer relevant worden beschouwd.

(4) Voor verder onderzoek zal de wijze van bestralen moeten worden gewijzigd, opdat de beide achterpoten steeds zo gelijk mogelijk worden bestraald.

Nu een herstel van het negatieve effect van röntgenstralen op de regeneratie bevorderende functie van de zenuw niet kon worden aangetoond, rijst vanzelf de vraag: of een dergelijk effect van röntgenstralen eigenlijk wel vast staat. Het is de bedoeling om de indertijd daarvoor aangevoerde experimentele resultaten nader te overwegen en met eigen experimenten te toetsen. Hierbij zal dan een gemodificeerde wijze van bestraling moeten worden toegepast.

Eerst zal echter dienen te worden vastgesteld, welke dosis

röntgenstralen toegediend volgens de nieuwe methode, werkelijk voldoende is om regeneratie van de achterpoten geheel te onderdrukken (hoofdstuk VI). Verder zullen enige conclusies, die in dit hoofdstuk zijn getrokken, op grond van uitkomsten van experimenten, waarbij de "oude" bestralingswijze nog werd gebruikt, worden geverifieerd onder gebruikmaking van de gemodificeerde methode. Het betreft hier met name de conclusies aangaande de gevolgen die het vrijprepareren van de nervus ischiadicus en ook eventuele afweerreacties tegen een homoplastisch implantaat voor de vorming van regeneraten uit bestraalde pootstompen hebben. Ook zal ter ondervanging van het voorbehoud, gemaakt bij de nieuwe interpretatie van de reeds vele malen geciteerde waarneming van HARREBOMÉE, het desbetreffende experiment — afgezien van de wijze van bestraling — zo nauwkeurig mogelijk worden herhaald (hoofdstuk VII). Daarna zal dan de vraag naar het al of niet bestaan van een effect van röntgenstralen op de trofische functie van de zenuw aan de orde komen (hoofdstuk VIII).

HOOFDSTUK VI

HET EFFECT VAN VERSCHILLENDE DOSES RÖNTGENSTRALEN OP HET REGENERATIEVERMOGEN VAN DE ACHTERPOTEN

INLEIDING

In hoofdstuk V zijn ernstige bedenkingen gerezen tegen de wijze, waarop bij vroeger onderzoek (TRAMPUSCH, HARREBOMÉE en VERWOERD 1963, TRAMPUSCH 1964a) en bij het eigen onderzoek, zoals tot dusver beschreven, de achterpoten zijn bestraald. Ten eerste is gebleken, dat de hierbij toegediende dosis over het geheel genomen te laag was om na amputatie regeneratie te voorkomen. Verder werd opgemerkt, dat de mate, waarin het regeneratievermogen van de beide achterpoten van het zelfde proefdier door de bestraling verminderde, aanmerkelijk verschilde. Dit verschil kon in verband worden gebracht met het feit, dat de proefdieren in zijligging werden bestraald, terwijl de van boven en onder invallende stralenbundels niet van gelijke sterkte waren.

De methode van bestraling werd daarom gewijzigd (zie hoofdstuk II, blz. 29, gemodificeerde bestralingswijze). In het vervolg werd slechts één proefdier tegelijk bestraald. Dit werd neergelegd in buikligging, direct — zonder een vochtig gaasje als onderlegger — op de bodem van het bestralings-bakje. De achterpoten waren zijwaarts gestrekt en bevonden zich op gelijke afstand van de erboven en eronder opgestelde röntgenbuizen. Beide buizen werden zo ingesteld, dat zij ter hoogte van het midden van de poten elk precies de helft van de totale dosis leverden.

Ten einde vast te stellen welke dosis röntgenstralen bij de gemodificeerde wijze van bestralen voldoende is om regeneratie te verhinderen, werden de achterpoten en het lumbo-sacrale gebied bestraald met een reeks van doses tussen 375 en 1500 r. Het onderlinge verschil tussen de doses beneden 1000 r bedroeg 125 r en daarboven 250 r. Even oude, doch onbestraalde proefdieren dienden als controle. Bij de onbestraalde en de bestraalde dieren — bij deze laatste, zoals bij vroegere experimenten, 1 week na de bestraling — werden de achterpoten geamputeerd door het distale deel van het

bovenbeen. Dit niveau werd gekozen, opdat het amputatievlak zeker zou verlopen door een deel van de poot, dat bij de bestraling niet afgeschermd geweest kon zijn door overhangende delen van de romp.

Tabel 8 geeft de code-namen van de diverse experimenten en de bij elk daarvan gebruikte dosis röntgenstralen.

TABEL 8

Naam van het experiment	0X	3X	5X	6X	7X	8X	10X	12X	15X
Dosis in r	0	375	500	625	750	875	1000	1250	1500

De code-namen en de doses röntgenstralen, gebruikt bij de experimenten, besproken in hoofdstuk VI.

KORTE BESCHRIJVING VAN DE EXPERIMENTEN

- Bestraling van het lumbo-sacrale gebied en de achterpoten volgens de gemodificeerde methode met de vermelde reeks doses (Tabel 8).
- 7 dagen na bestraling: amputatie van de beide bestraalde achterpoten door het distale deel van het bovenbeen.
- 80 dagen na amputatie: einde van het experiment.

Het aantal proefdieren bedroeg bij elk experiment 12. Bij het begin van de proeven was hun totale lengte 75–85 mm, hun kop-poot lengte 38–42 mm.

WAARNEMINGEN

Slechts 1 proefdier (van experiment 3X) is vroegtijdig gestorven. De overige verkeerden aan het einde van de experimenten nog in goede conditie. Hun totale lengte was inmiddels toegenomen tot 116–132 mm, hun kop-poot lengte tot 57–63 mm.

De beoordeling van de lengte en de aard van de regeneraten op de 80e dag na amputatie is vermeld in Tabel 9 en de Diagrammen 11 en 12.

De onderlinge verschillen tussen de regeneraten van elk der experimentele series van deze reeks zijn veel kleiner, dan bij de eerder beschreven proeven (hoofdstukken III, IV en V). Ook de daar waargenomen, dikwijls zeer grote verschillen tussen het linkszijdige en het rechtszijdige regeneraat zijn hier niet aanwezig.

TABEL 9

Serie	Experiment (links)	Totaal aantal proefdieren	Resultaat					
			Links			Rechts		
			—	±	+	—	±	+
0X	onbestraald	12	0	0	12	0	0	12
3X	alleen bestraald met 375 r	11	0	0	11	0	0	11
5X	alleen bestraald met 500 r	12	0	0	12	0	0	12
6X	alleen bestraald met 625 r	12	0	3	9	1	5	6
7X	alleen bestraald met 750 r	12	6	5	1	4	2	6
8X	alleen bestraald met 875 r	12	8	4	0	9	2	1
10X	alleen bestraald met 1000 r	12	10	1	1	7	4	1
12X	alleen bestraald met 1250 r	12	10	2	0	7	4	1
15X	alleen bestraald met 1500 r	12	12	0	0	9	3	0

De mate van regeneratie van bestraalde pootstompen aan linker en rechter zijde, uitgedrukt in —, ± en +, beoordeeld op de 80e dag na amputatie (—=gladde stomp, epidermisknop of -sliert; ±=blastema, epidermissliert met bindweefsel; +=afgeplat blastema, tenenplaat, poot). De rechter achterpoot is steeds op dezelfde wijze behandeld als de linker.

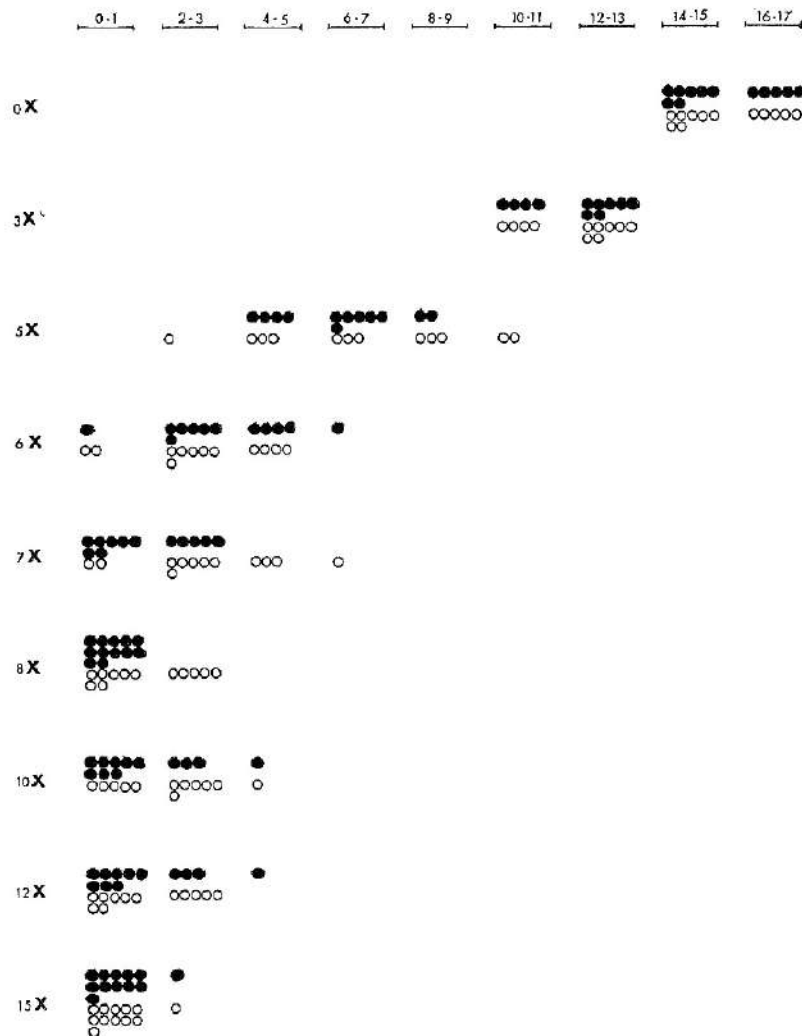
Enkele pootstompen, met hun eventuele regeneraten, in Figuur 2 afgebeeld, illustreren de resultaten in de opeenvolgende series.

De onbestraalde achterpootstompen in de controle-serie 0X vormden zonder uitzondering regeneraten, die het evenbeeld waren van niet-geamputeerde poten. Alle regeneraten hadden 5 normaal gevormde tenen.

Na bestraling met 375 en 500 r (series 3X en 5X) ontstonden nog wel duidelijk als poot te herkennen regeneraten, maar deze waren kleiner, resp. veel kleiner dan die in de controle-serie. Het verschil in lengte tussen de regeneraten in de series 3X en 0X was uitsluitend te wijten aan een kleinere afmeting van de proximale delen (boven- en onderbeen) bij het eerstgenoemde experiment. De distale delen, dus de voet, waren in beide series even groot. De verkorting van de proximale delen is nog veel sterker uitgesproken in serie 5X, maar hier zijn ook de distale delen veel te klein. Het een en ander is geïllustreerd in de Diagrammen 13 en 14, waarin de lengten van de proximale en de distale delen van de regeneraten zijn aangegeven.

In serie 3X werden ook de volgende afwijkingen in de vorm waargenomen. Zes regeneraten hadden 4 in plaats van 5 tenen, terwijl geregenereerde poten met 3 en 6 tenen ieder 1 maal werden gezien. Zeven maal was er een verdubbeling van de distale helft van een teen, 4 maal bij een 5-tenige en 3 maal bij een 4-tenige voet.

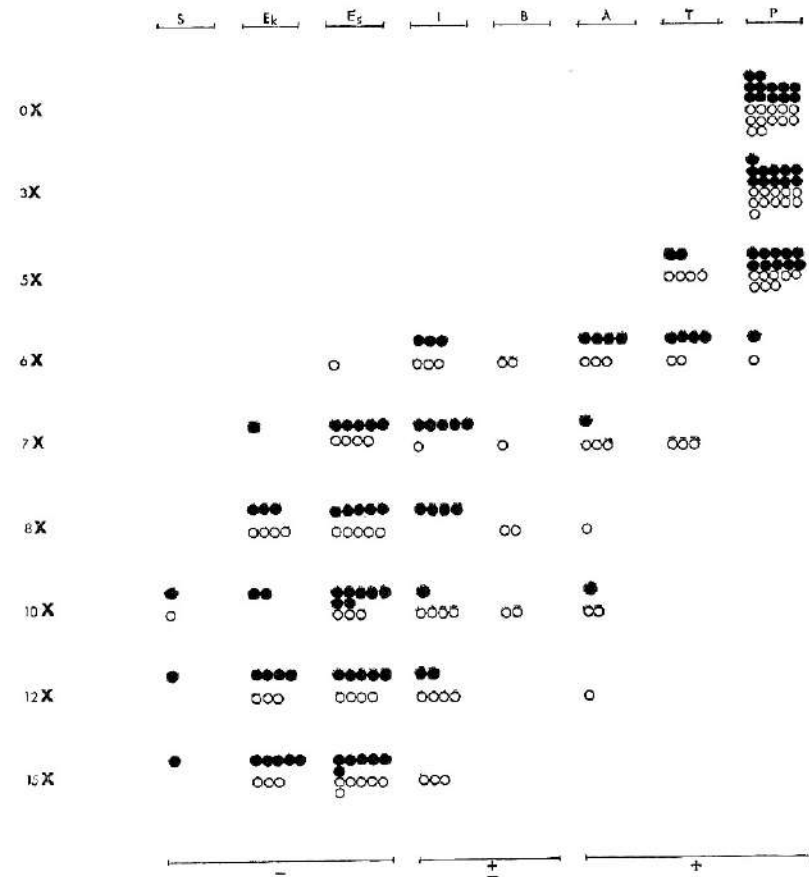
DIAGRAM 11



De lengte van de regeneraten op de 80e dag na de amputatie.

● en ○ staan telkens voor 1 regeneraat resp. aan de linker en aan de rechter zijde. Verticaal zijn de verschillende experimenten vermeld. Horizontaal is de lengte aangegeven in mm. Het aantal proefdieren per experiment is 12; een uitzondering vormt experiment 3X met 11 proefdieren.

DIAGRAM 12



Specificatie van de regeneraten op de 80e dag na de amputatie.

● en ○ staan telkens voor 1 regeneraat resp. aan de linker en aan de rechter zijde. Verticaal zijn de verschillende experimenten vermeld. Horizontaal is de kwaliteit van de regeneraten aangegeven (S=Gladde stomp; Ek=Epidermisknop; Es=Epidermissliert; I=Epidermissliert met bindweefsel; B=Blastema; A=Afgeplat Blastema; T=Tenenplaat; P=Poot). Het aantal proefdieren per experiment is 12; een uitzondering vormt experiment 3X met 11 proefdieren.

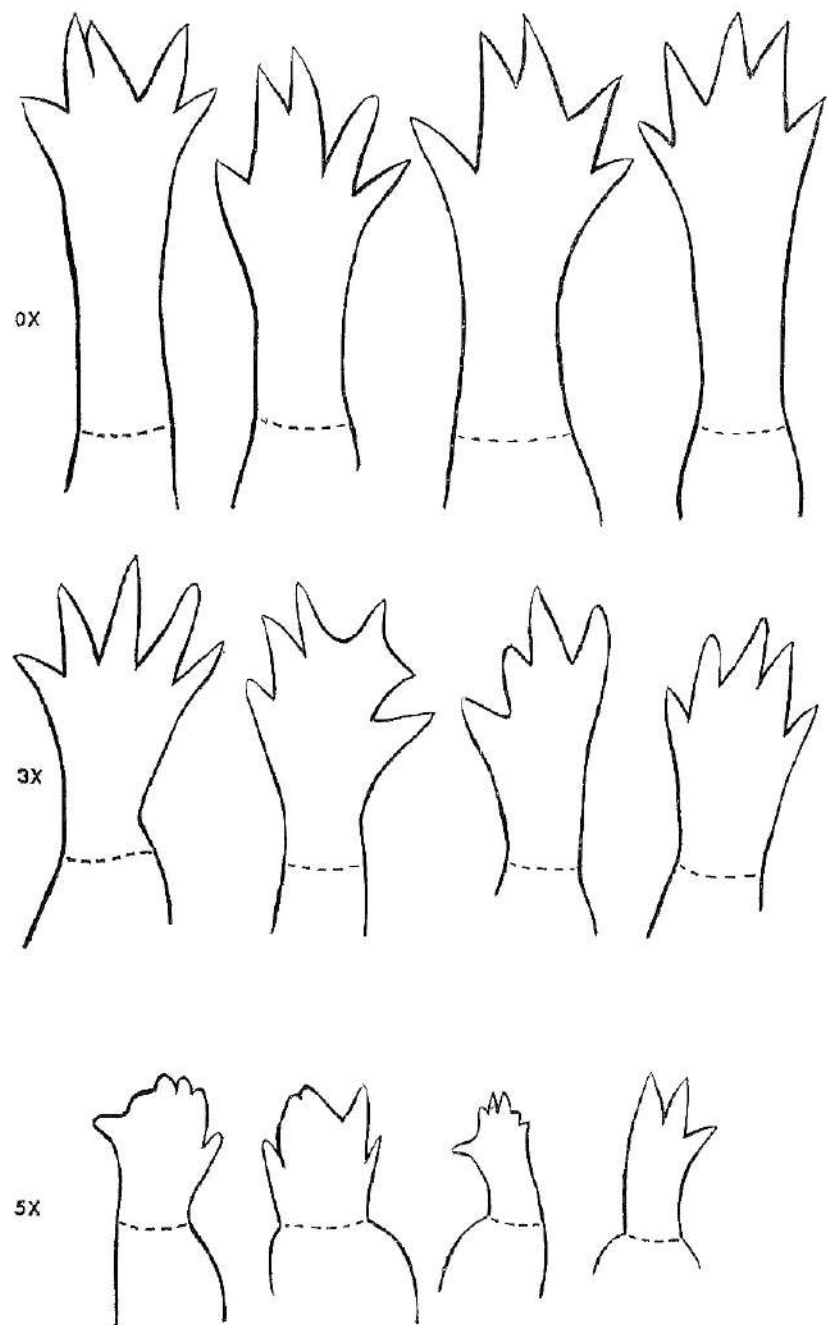


Fig. 2. Pootstompen en daaruit voortgekomen regeneraten in de series 0X, 3X, 5X, 6X, 7X, 8X, 10X, 12X en 15X (resp. onbestraald en in buikligging bestraald met 375, 500, 625, 750, 875, 1000, 1250 en 1500 r).

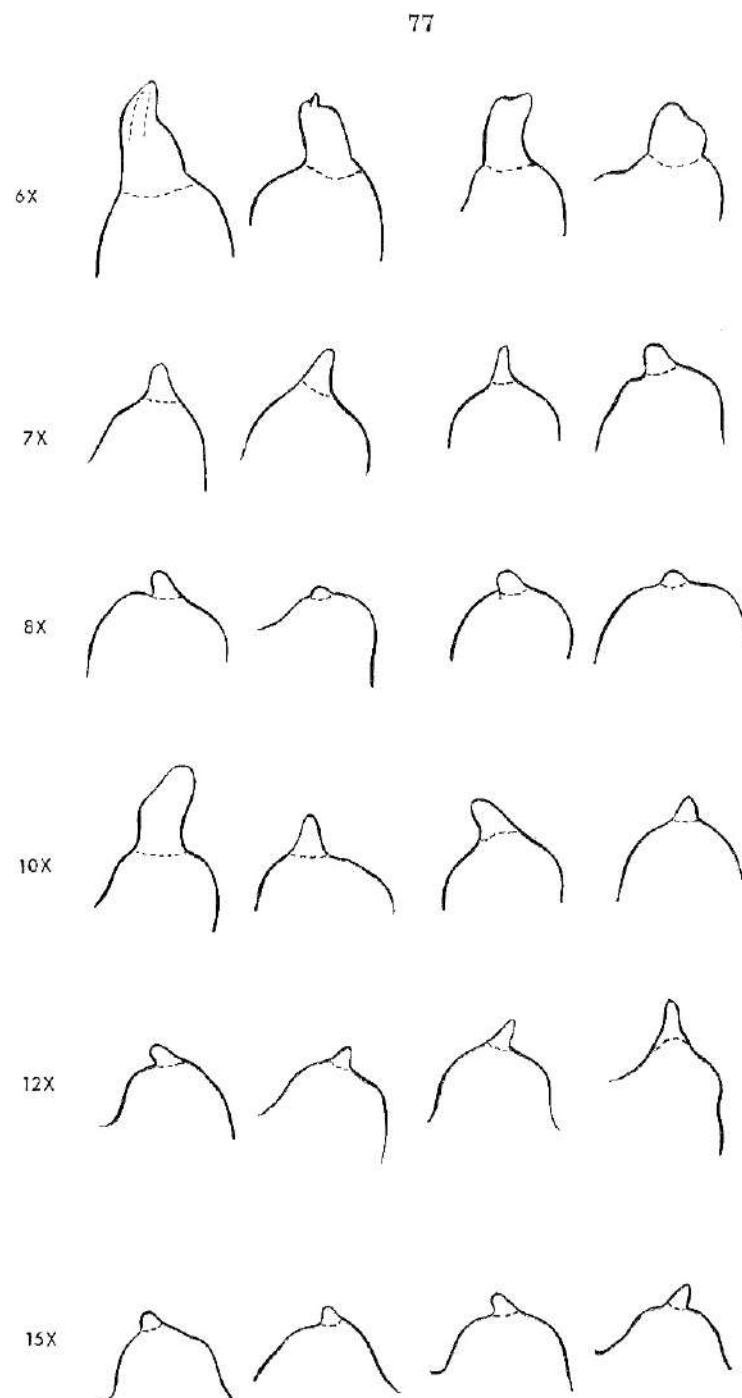
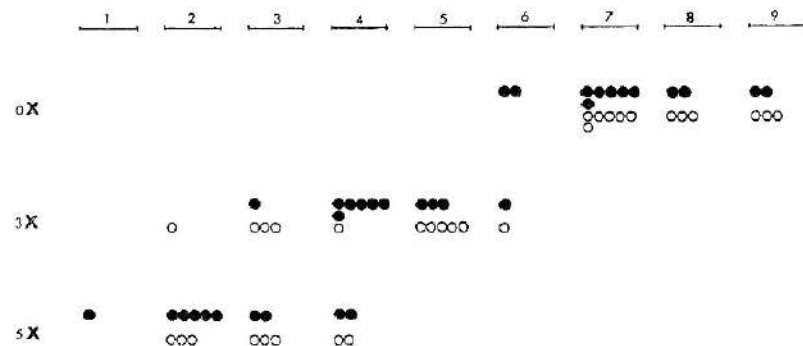


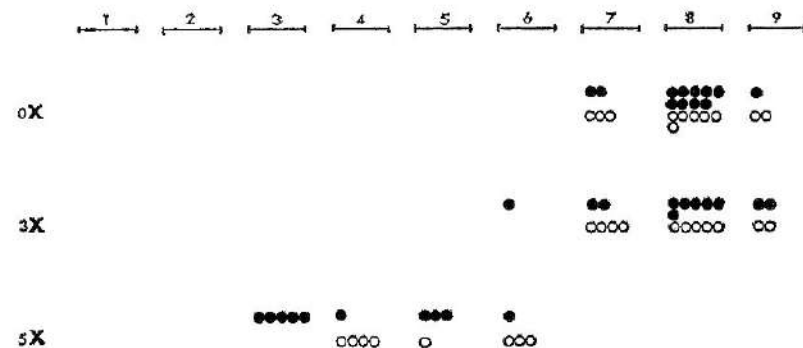
DIAGRAM 13



De lengte van het proximale deel van de als poot geklasseerde regeneraten.

● en ○ staan telkens voor 1 regeneraat resp. aan de linker en aan de rechter zijde. Verticaal zijn de verschillende experimenten vermeld. Horizontaal is aangegeven in mm de totale lengte van het regeneraat minus die van het distale als voet beschouwde deel. Het aantal als poot geklasseerde regeneraten bij de experimenten 0X, 3X en 5X bedraagt resp. 24, 22 en 18.

DIAGRAM 14



De lengte van de "voet" bij de als poot geklasseerde regeneraten.

● en ○ staan telkens voor 1 regeneraat resp. aan de linker en aan de rechter zijde. Verticaal zijn de verschillende experimenten vermeld. Horizontaal is aangegeven in mm de lengte van het als voet beschouwde deel, d.w.z. de lengte gerekend vanaf de punt van de langste teen tot en met de meest proximale aanhechtingsplaats van een teen aan de voet. Het aantal als poot geklasseerde regeneraten bij de experimenten 0X, 3X en 5X bedraagt resp. 24, 22 en 18.

Bij de regeneraten van de serie 5X, die imponeerden als voet-achtige structuren, verbonden via zeer korte proximale poot-delen met een bovenbeensstomp, was het aantal tenen bijna nooit normaal (er waren er teveel of te weinig) en ook hun plaatsing ten opzichte van elkaar week dikwijls van de norm af.

Kortom, bestraling van de achterpoten met een dosis van 375 r en a fortiori met 500 r heeft tot gevolg, dat na amputatie gevormde regeneraten kleiner zijn dan, en in vorm afwijken van even oude regeneraten van onbestraalde proefdieren. In Tabel 9 en Diagram 12 kwam dit niet tot uiting, omdat zo goed als alle regeneraten in deze series losstaande tenen droegen en dus als poot waren geklasseerd.

Bij opvoering van de dosis röntgenstralen tot 625 r en hoger zijn de gevolgen voor het regeneratievermogen zo ingrijpend, dat nauwelijks meer regeneraten als poot geklasseerd konden worden. Werden in serie 5X (500 r) nog 18 als poot beoordeelde regeneraten geteld, in serie 6X (625 r) waren dat er nog maar 2. In beide series werd zes maal een tenenplaat waargenomen. Lager gekwalificeerde regeneraten (afgeplatte blastemata, blastemata, epidermisslierten etc.) kwamen in serie 5X niet voor, maar waren in serie 6X in de meerderheid (16 van de 24). In serie 7X (750 r) konden nog maar 3 regeneraten als tenenplaat worden geklasseerd. Bij hogere doses werd geen enkele poot of tenenplaat meer waargenomen en slechts incidenteel een (afgeplat) blastema. Daarbij werd het aantal pootstompen, dat ten hoogste epidermisslierten — met soms basaal enig bindweefsel — vormde, steeds groter. In serie 7X (750 r) was dit 16 maal het geval, in serie 8X (875 r) 21 maal, in serie 10X (1000 r) 20 maal en in serie 12X (1250 r) 23 maal, steeds op 24 pootstompen (12 linker en 12 rechter). Van de met 1500 r bestraalde pootstompen bracht geen enkele méér dan een epidermissliert voort. Dergelijke slierten werden geregeld voor een deel of in hun geheel afgestoten; in het laatste geval vertoonde de stomp tijdelijk een glad oppervlak.

De grens tussen regeneraat en pootstomp was bij de bestraalde dieren als regel duidelijk te onderscheiden door een verschil in diameter en/of in pigmentatie. De lengte van de pootstompen was in al deze series ongeveer 3 mm. Bij onbestraalde dieren was de pootstomp veelal niet goed af te bakenen van het regeneraat, maar zijn lengte werd geschat, op eveneens 3 mm. Het overige deel van de poot werd als regeneraat beschouwd.

DISCUSSIE

Met deze reeks proeven werd beoogd vast te stellen, welke dosis röntgenstralen minimaal gebruikt moet worden om bij axolotl-larven (totale lengte 75–85 mm) de regeneratie van de achterpoten voor de duur van ten minste 80 dagen na amputatie te verhinderen.

De verkregen resultaten laten zien, dat bij doses van 875 *r* en hoger (1000, 1250 en 1500 *r*) geen enkele pootstomp meer in staat was binnen dit tijdsbestek een poot of tenenplaat als regeneraat te vormen. Op enkele uitzonderingen na (blastemata) ontstonden slechts slierten epidermis, waarin basaal soms enig bindweefsel. Vooral het resultaat van de serie 10X waar een dosis van 1000 *r* was gebruikt, is van belang, omdat het verschil met de uitkomsten van serie X (hoofdstuk V), waar dezelfde dosis op de "oude wijze" werd gegeven, evident is. Daar bracht immers de helft van de pootstoppen als poot of tenenplaat te beschouwen regeneraten voort. De uitkomsten van beide experimenten gezamenlijk demonstren heel duidelijk, hoe misleidende gevolgtrekkingen gemaakt kunnen worden uit de vergelijking van experimenten, waarbij de bestraling wel met een zelfde dosis doch niet op dezelfde wijze is uitgevoerd. Hiermee wordt het vermoeden (hoofdstuk V) bevestigd, dat een dergelijke vergelijking aanleiding heeft kunnen geven om een herstel van het regeneratievermogen van de bestraalde pootstoppen in het experiment van HARREBOMÉE (TRAMPUSCH 1964a) te veronderstellen.

De resultaten in de series 0X (onbestraald), 3X (375 *r*), 5X (500 *r*), 6X (625 *r*), 7X (750 *r*) en 8X (875 *r*) tonen aan, dat er geen dosis bestaat, waarboven regeneratie onmogelijk is, en waaronder deze ongestoord voortgang vindt. Het regeneratievermogen blijkt bij deze opklimmende reeks doses in steeds ernstiger mate gestoord. In serie 3X, waar de kleinste dosis werd toegediend, onderscheiden de regeneraten zich al in twee opzichten van die in de controle-serie 0X: de proximale delen van de geregenereerde poot, zijn — in tegenstelling tot de distale — veel korter, terwijl aan de tenen vaker verdubbelingen voorkomen. Een dosis van 500 *r* (serie 5X) tast het regeneratievermogen nog verder aan. De regeneraten zijn dan abnormaal gevormde kleine voet-achtige delen, die vrijwel direct aan de bovenbeensstomp vastzitten. Bij nog hogere doses (625, 750 en 875 *r*) worden uitgroeisels gevormd, die uitwendig nauwelijks of niet als pootachtig zijn te herkennen (afgeplatte

blastemata, blastemata) of alleen maar uit slierten epidermis bestaan.

Merkwaardig is, dat bij deze reeks experimenten de slanke, slechts 2 tenen dragende regeneraten, die in de serie, X (hoofdstuk V) zo frekwent werden gezien, niet voorkwamen. Dit zelfde type regeneraat was door Goss (1957) waargenomen na amputatie van een onderbeen, dat slechts voor een longitudinale helft bestraald was. Men kan daarom vermoedelijk terecht veronderstellen, dat een door de — ongewild — niet feilloze wijze van bestralen ontstaan, regionaal verschil in beschadiging van de poot-weefsels, bij het experiment X verantwoordelijk is geweest voor hun vorming.

Het regeneraat, dat na amputatie van een poot bij amphibia ontstaat, ontwikkelt zich uit een zogenaamd blastema. Dit is een opeenhoping van morfologisch weinig gedifferentieerde cellen, die ontstaan zijn door dedifferentiatie van in de pootstomp aanwezige weefsels. Herhaalde celdelingen doen het blastema in omvang toenemen. Door differentiatie van het blastema komt dan het regeneraat met zijn kenmerkende bouw tot stand. Het regeneraat is aanvankelijk kleiner dan een niet-geamputeerde poot, maar zal door snelle groei binnen enkele weken of maanden, afhankelijk van de leeftijd van het dier, eenzelfde grootte bereiken.

Na bestraling met 375 en 500 *r* blijken de proximale, resp. de proximale en de distale delen van de geregenereerde poten veel kleiner te zijn dan bij onbestraalde dieren. Men zou nu kunnen veronderstellen, dat de verschillen tussen de regeneraten, verkregen in de series 0X, 3X en 5X terug te voeren zijn op verschillen in het aantal blastemacellen, dat na amputatie gevormd wordt. Steun voor deze hypothese is te ontleen aan experimenten van FABER (1965) en de BOTH (1965). Deze onderzoekers hebben verschillende hoeveelheden blastemacellen in een neutraal gebied van het lichaam geïsoleerd en hun verdere ontwikkeling bestudeerd. De regeneraten, die uit kleinere hoeveelheden blastema-cellen voortkwamen, waren relatief klein en bevatten uitsluitend skeletdelen, die in het distale deel van een (voor-)poot thuishoren, zoals phalanges en carpalia. Daarentegen waren de ectopische poten, die ontstonden uit grotere kwantiteiten blastemacellen, omvangrijker en hun skelet bestond uit een groter aantal distale elementen en tevens, in disto-proximale volgorde, meer proximale elementen tot zelfs delen van de humerus. Deze verschillen, voortvloeiend uit verschillen in de hoeveelheden geïsoleerde blastemacellen, gelijken sterk op die tussen de regeneraten in de series 5X, 3X en 0X. Hieruit zou men kunnen afleiden, dat

naarmate een pootstomp bloot gesteld is geweest aan een grotere dosis röntgenstralen, er inderdaad na amputatie een kleiner aantal blastemacellen beschikbaar komt. Bij doses tot en met 500 *r* zouden nog juist voldoende blastemacellen kunnen ontstaan, om kleine en weliswaar gedisproportioneerde, maar toch nog als poot te herkennen regeneraten te vormen. Bij hogere doses, 875 tot 1500 *r*, zouden als regel geen blastemata meer tot stand komen en slechts epidermisslierten worden gevormd.

Hoe bestraling een dergelijke vermindering van het aantal na een amputatie gevormde blastemata teweegbrengt, zou men zich op één van beide volgende wijzen kunnen voorstellen. Ten eerste, zouden röntgenstralen de in de poot aanwezige cellen zo kunnen beschadigen, dat zij niet meer tot dedifferentiatie, en dus tot de vorming van blastemacellen, in staat zijn. Een tweede mogelijkheid is, dat het vermogen tot dedifferentiatie niet is aangetast, maar dat de proliferatie van de blastemacellen, die in een latere fase behoort op te treden, uitblijft.

De resultaten kan men als volgt samenvatten:

(1) Röntgenstralen in een reeks doses van 375 tot 875 *r* bleken het regeneratievermogen van de achterpoten van axolotl-larven in toenemende mate te verminderen; er is geen drempel-dosis gevonden, waarboven de regeneratie geheel uitblijft en waaronder deze ongestoord verloopt.

(2) De na bestraling met 375 *r* geregenereerde poten zijn gedisproportioneerd door een verkorting van de proximale delen en tonen frekwent afwijkingen in aantal en bouw der tenen; na 500 *r* werden slechts kleine, als voetachtige delen te beschouwen regeneraten waargenomen; bij doses van 625 en 750 *r* ontstonden nog enkele regeneraten met duidelijke kenmerken van een poot, maar meestal slechts (afgeplatte) blastemata of slierten epidermis.

(3) Met 875 tot 1500 *r* bestraalde pootstompen vormden, op enkele uitzonderingen na, binnen de experimentele periode van 80 dagen alleen maar epidermisslierten.

(4) De hier na bestraling met 1000 *r* verkregen uitkomsten wijken aanzienlijk af van die in serie X (hoofdstuk V). Hieruit blijkt duidelijk, dat een vergelijking van experimenten, waar wel met dezelfde dosis, doch niet op geheel overeenkomstige wijze is bestraald, tot misverstanden aanleiding geeft.

HOOFDSTUK VII

TOETSING VAN ENKELE EERDER GEFORMULEERDE CONCLUSIES

INLEIDING

Eerder was gevonden (hoofdstuk V), dat het vrijprepareren van de nervus ischiadicus bij op de "oude" wijze bestraalde poten ertoe leidt, dat na amputatie in een groter aantal gevallen regeneraten ontstaan, die bovendien forser zijn en meer tenen hebben dan na enkele amputatie. Zou deze behandeling bij poten, die op de gemodificeerde wijze zijn bestraald hetzelfde effect hebben? Hiertoe werd bij een drietal series proefdieren 1 week na bestraling de nervus ischiadicus van de linker achterpoot vrijgeprepareerd en teruggelegd (schijndeviatie), waarna beide achterpoten werden geamputeerd. De drie proeven verschilden slechts in de gebruikte dosis röntgenstralen: in de series 10XMZ, 12XMZ en 15XMZ achtereenvolgens 1000, 1250 en 1500 *r* (M=manipuleren, Z=zenuw). Als controle dienden de tegelijkertijd uitgevoerde experimenten 10X, 12X en 15X (reeds beschreven in hoofdstuk VI), waar dezelfde doses werden toegepast. De verwachting was immers gewettigd, het effect van de schijndeviatie het scherpst te kunnen zien, wanneer de bestraling de regeneratie van de controlepoten juist geheel kon onderdrukken. Daar de hiervoor meest geschikte dosis bij de aanvang van de experimenten nog niet precies bekend was, werden deze 3 doses gebruikt.

In hoofdstuk V was ook opgemerkt, dat het contact van een gedeveerde nervus ischiadicus met een niet-pootvormend, onbestraald implantaat binnen een bestraald deel van de flank, niet resulteerde in een betere regeneratie van de bestraalde ("oude" methode) achterpoten, dan een schijndeviate van deze zenuw. Om deze conclusie te verifiëren werd naast serie 10XMZ de serie 10XARSX uitgevoerd (A=autoplastisch, R=romphuid, S=ongevensterd, X=bestraald). Hierbij werd de zenuw gedeveerd naar de flank binnen de bestraalde zone en in contact gebracht met de huid daar ter plaatse, die ten behoeve van de deviatie even was losgemaakt en direct daarna gereïmplanteerd.

Ook was een nieuwe interpretatie voorgesteld voor het ontstaan van regeneraten uit de bestraalde pootstompen in het experiment van HARREBOMÉE, namelijk, dat dit het gevolg is geweest van (a) het gebruik van een te geringe dosis röntgenstralen om regeneratie geheel te onderdrukken, en (b) een regeneratie-bevorderend effect van het manipuleren met de zenuw bij de deviatie.

Daarmee werd het door TRAMPUSCH (1964a) aangenomen herstel van het regeneratievermogen van de bestraalde poten, berustend op het contact van de gedeveerde nervus ischiadicus met een pootvormend implantaat in de flank, verworpen.

Wel werd hierbij aangetekend, dat bij de proef van HARREBOMÉE een ander implantaat was gebruikt dan in het eigen onderzoek. Het bestond uit een lap onbestraalde poothuid, waarin centraal een gat was geponst; wanneer dit zogenaamde venster enkele dagen later door wondepitheel was gesloten, werd hieronder een onbestraalde epiphysis femoris geschoven. Uit dit complexe implantaat, waarheen nog een nervus ischiadicus was gedeveerd, ontstond meestal een extra poot. Voorts bracht HARREBOMÉE het implantaat zover naar craniaal aan als de lengte van de gedeveerde zenuw toeliet, dus grotendeels buiten de bestraalde lumbale zone en dus niet — zoals in het eigen onderzoek — daarbinnen.

Om deze verschillen naar waarde te kunnen schatten werd het experiment van HARREBOMÉE zo nauwkeurig mogelijk overgedaan met dieren, die op de gemodificeerde wijze waren bestraald. Er werden weer 3 verschillende doses gebruikt: achtereenvolgens, 1000, 1250 en 1500 r in de series 10XPTYBSY, 12XPTYBSY en 15XPTYBSY (P=poothuid, T=gevensterd, Y=onbestraald, B=epiphysis femoris, S=ongekliefd). De uitkomsten werden vergeleken met die van de series, waarin de nervus ischiadicus aan schijndeviatie was onderworpen of de poten alleen maar waren geamputeerd.

In de zojuist vermelde experimenten werden homoplastische implantaten gebruikt. In hoofdstuk V is reeds geconcludeerd, dat eventuele afweerreacties tegen deze implantaten de vorming van regeneraten door bestraalde pootstompen niet merkbaar stimuleren. Deze conclusie was echter ook gebaseerd op proeven, waarbij de "oude" bestralingsmethode was gebezigd. Daarom werd in serie 10XPTYBSY-t (t=op de thorax) vlak achter de linker voorpoot een poot-vormend implantaat aangebracht, in contact met een gedeveerde nervus brachialis; de bestraalde achterpoten werden geamputeerd.

Omdat het aantal geschikte proefdieren te klein was, kon het laatste experiment niet meer met toepassing van andere doses worden uitgevoerd. Hetzelfde gold voor het experiment 10XAHXSX.

KORTE BESCHRIJVING VAN DE EXPERIMENTEN

Experimenten 10XMZ, 12XMZ en 15XMZ; schijndeviatie van de nervus ischiadicus

- (a) Bestraling van het lumbo-sacrale gebied en de achterpoten met respectievelijk 1000, 1250 en 1500 r volgens de gemodificeerde methode.
- (b) 7 dagen na bestraling:
 - 1. Vrijprepareren van de linker nervus ischiadicus op identieke wijze als voor de deviatie.
 - 2. Onmiddellijk terugleggen van de zenuw in de poot.
 - 3. Amputatie van de linker en rechter achterpoot door het distale deel van het bovenbeen.
- (c) 80 dagen na amputatie: einde van de proef.

Experiment 10XARSX; autoplastisch implantaat, niet in staat tot de vorming van een ectopische poot

- (a) Bestraling van het lumbo-sacrale gebied en de achterpoten met een dosis van 1000 r, volgens de gemodificeerde methode.
- (b) 7 dagen na bestraling:
 - 1. Over een rechthoekig gebied binnen de bestraalde zone in de flank (op dezelfde plaats als het gebruikelijke carré, maar dorsaal tot aan de rugvin reikend) wordt de huid van ventraal af ondermijnd; de aanhechting aan de dorsale zijde wordt tijdelijk gespaard en de zo gevormde huidlap voorlopig teruggeslagen ter voorkoming van uitdroging.
 - 2. Deviatie van de linker nervus ischiadicus onderhuids naar het gebied, waar de huid is losgemaakt.
 - 3. Nadat de huidlap ook aan de dorsale zijde is losgeknipt wordt deze 90° gedraaid; deze lap past dan ten gevolge van de retractie van de wondranden en de huidlap zelf, met zijn dorso-ventrale afmeting in cranio-caudale richting precies in de huidvrije plek.
 - 4. Amputatie van de linker en rechter achterpoot door het distale deel van het bovenbeen.

5. Het dorsaal van de gedraaide en gereïmplanteerde huidlap resterende huidvrije gebied, wordt bedekt met huid afkomstig van de geamputeerde (bestraalde) poot-delen.
- (c) 80 dagen na amputatie: einde van de proef.

Experimenten 10XPTYBSY, 12XPTYBSY en 15XPTYBSY; homoplastisch implantaat, dat een ectopische poot vormt

- (a) Bestraling van het lumbo-sacrale gebied en de achterpoten (1000, 1250 en 1500 r) volgens de gemodificeerde methode.
- (b) 7 dagen na bestraling:
1. Maken van een huid-vrij carré in de flank, zo ver craniaal van de linker achterpoot, dat het midden nog bereikbaar is voor de te devieren zenuw (dus in onbestraald gebied).
 2. Deviatie van de linker nervus ischiadicus onderhuids tot in het huidvrije carré.
 3. Aanbrengen van een gevensterd stukje poothuid, afkomstig van een onbestraalde donor.
 4. Amputatie van linker en rechter achterpoot door het distale deel van het bovenbeen.
- (c) 10 dagen na bestraling: onderschuiven van een onbestraalde epiphysis femoris vanaf de caudale rand van het geïmplanteerde huidlapje tot onder het in het venster gevormde wond-epitheel;
- (d) 80 dagen na amputatie: einde van het experiment.

Experiment 10XPTYBSY-t; homoplastisch poot-vormend implantaat op de thorax

De uitvoering van dit experiment komt overeen met die van de vorige proeven, behalve dat het homoplastische implantaat in de flank, achter de voorpoot in contact werd gebracht met een gedeveerde nervus brachialis. De beide achterpoten werden alleen geamputeerd.

Alle series bestonden uit 12 proefdieren, met een totale lengte van 74-83 mm en een kop-poot lengte van 37-42 mm bij het begin van de proef.

WAARNEMINGEN

De proefdieren bleven in goede conditie; 1 dier uit de serie 12XMZ is per ongeluk verloren gegaan. Zij bereikten een totale lengte van 118-132 mm en een kop-poot lengte van 57-63 mm.

Tabel 10 geeft een overzicht van de beoordeling van de regeneraten, uitgedrukt in de bekende symbolen +, ± en -, in de series 10XMZ, 12XMZ en 15XMZ en de series 10XPTYBSY, 12XPTYBSY en 15XPTYBSY. De lengte en de aard van de regeneraten zijn weergegeven in de Diagrammen 15 en 16.

Ter vergelijking zijn tevens de uitkomsten van de series 10X, 12X en 15 X (hoofdstuk VI) daarin opgenomen.

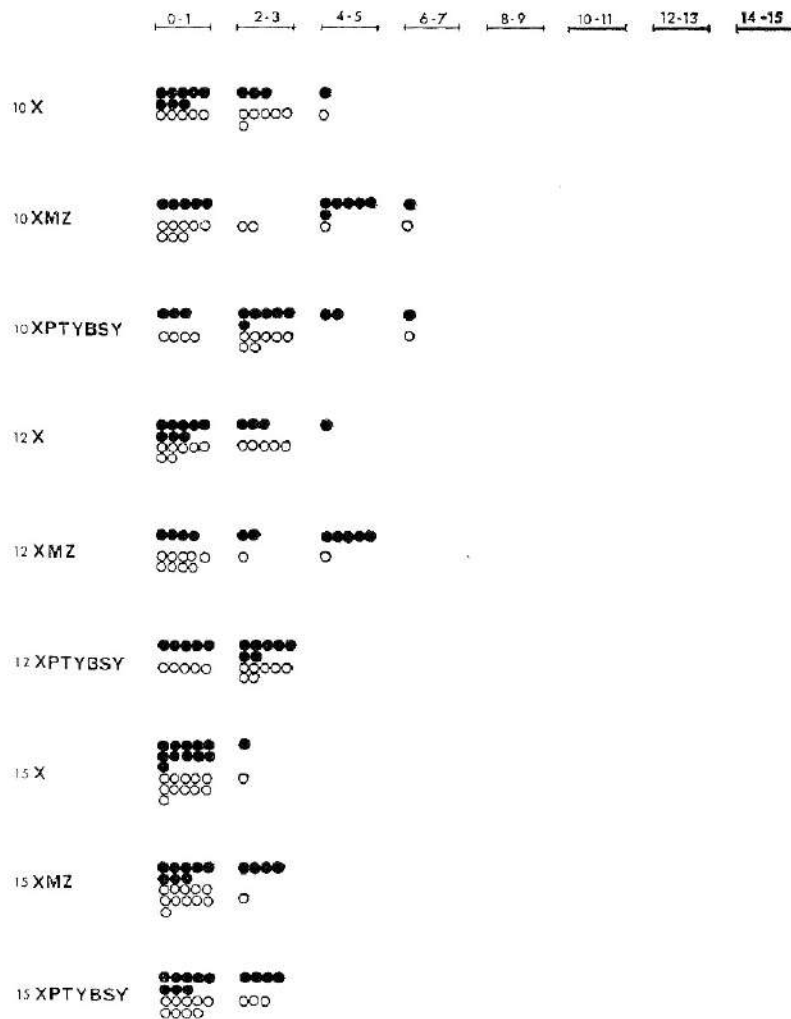
In de serie 10XMZ vormden 10 van de 12 bestraalde linker achterpoten, waar een schijndeviatie van de nervus ischiadicus was

TABEL 10

Serie	Experiment (links)	Totaal aantal proefdieren	Resultaat					
			Links			Rechts		
			—	±	+	—	±	+
10X	alleen bestraling met 1000 r	12	9	2	1	4	6	2
10XMZ	schijndeviatie	12	1	1	10	8	2	2
10XPTYBSY	gedeveerde zenuw in contact met poot-vormend implantaat	12	1	5	6	3	5	4
12X	alleen bestraling met 1250 r	12	10	2	0	6	5	1
12XMZ	schijndeviatie	11	2	3	6	7	3	1
12XPTYBSY	gedeveerde zenuw in contact met poot-vormend implantaat	12	1	6	5	5	6	1
15X	alleen bestraling met 1500 r	12	12	0	0	9	3	0
15XMZ	schijndeviatie	12	6	6	0	12	0	0
15XPTYBSY	gedeveerde zenuw in contact met poot-vormend implantaat	12	5	6	1	10	2	0

De mate van regeneratie van bestraalde pootstompen aan linker en rechter zijde, uitgedrukt in —, ± en +, beoordeeld op de 80e dag na amputatie (—=gladde stomp, epidermisknop of -sliert; ±=epidermissliert met bindweefsel, blastema; +=afgeplat blastema, tenenplaat, poot). De rechter achterpoot is bij de eerste 3 experimenten steeds alleen bestraald met 1000 r, bij de tweede 3 proefreeksen met 1250 r en bij het laatste drietal met 1500 r.

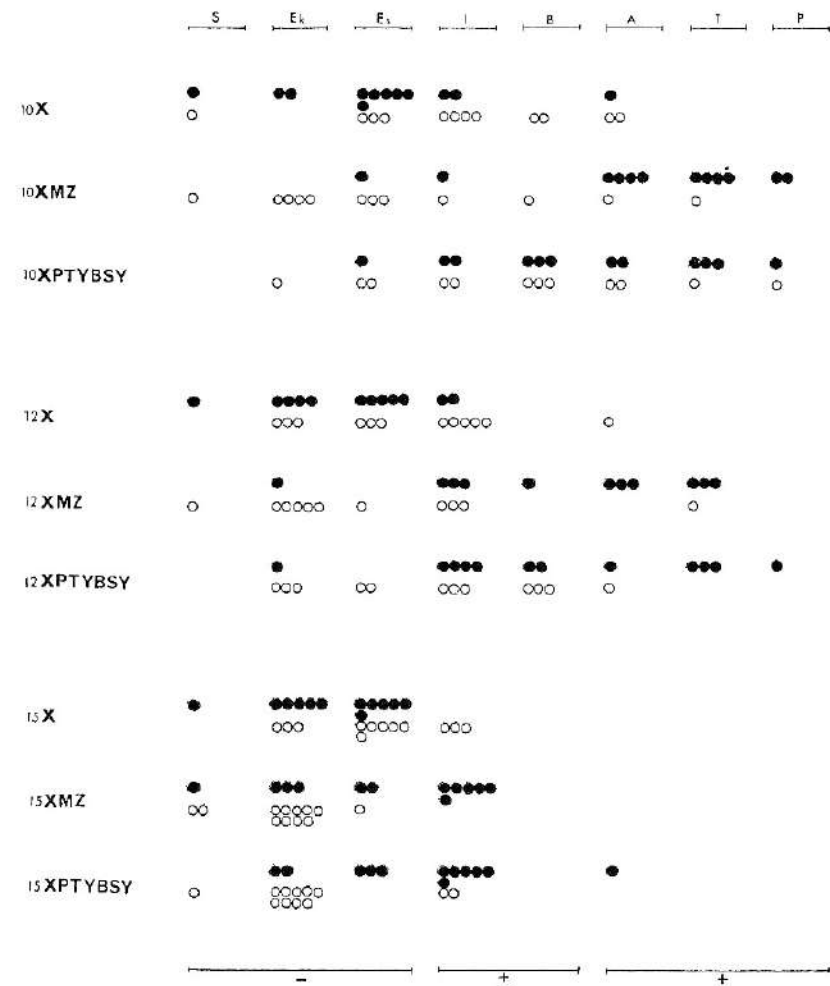
DIAGRAM 15



De lengte van de regeneraten op de 80e dag na de amputatie.

● en ○ staan telkens voor 1 regeneraat resp. aan de linker en aan de rechter zijde. Verticaal zijn de verschillende experimenten vermeld. Horizontaal is de lengte aangegeven in mm. Het aantal proefdieren per experiment is 12; een uitzondering vormt experiment 12XMZ met 11 proefdieren.

DIAGRAM 16



Specificatie van de regeneraten op de 80e dag na de amputatie.

● en ○ staan telkens voor 1 regeneraat resp. aan de linker en aan de rechter zijde. Verticaal zijn de verschillende experimenten vermeld. Horizontaal is de kwaliteit van de regeneraten aangegeven (S=Gladde stomp; Ek=Epidermisknop; Es=Epidermissliert; I=Epidermissliert met bindweefsel; B=Blastema; A=Afgeplat Blastema; T=Tenenplaat; P=Poot). Het aantal proefdieren per experiment is 12; een uitzondering vormt experiment 12XMZ met 11 proefdieren.

verricht, een poot, tenenplaat of afgeplat blastema als regeneraat. In de controle-serie 10X daarentegen bracht maar één pootstomp een afgeplat blastema voort, de overige slechts epidermisslierten, eventueel met bindweefsel.

Een soortgelijk verschil bleek te bestaan tussen de uitkomsten van de overeenkomstige experimenten bij de met 1250 r bestraalde dieren. In serie 12XMZ ontstonden aan de linker zijde 6 als + gekenmerkte regeneraten tegen 0 in serie 12X. De resultaten bij met 1500 r bestraalde dieren van de series 15XMZ en 15X kwamen echter geheel overeen: geen enkel regeneraat werd als + geklasseerd.

De rechtszijdige, uitsluitend geamputeerde poten, gedroegen zich bij de schijndevisatie-experimenten steeds op precies dezelfde wijze als bij de controle-experimenten.

De uitkomsten aan de linker en aan de rechter zijde in de series 10XPTYBSY, 12XPTYBSY en 15XPTYBSY, kwamen grosso modo overeen met die van de serie 10XMZ, 12 XMZ en 15MXZ.

Een overzicht van de resultaten van de series 10XARSX en 10XPTYBSY-t is gegeven in Tabel 11 en de Diagrammen 17 en 18.

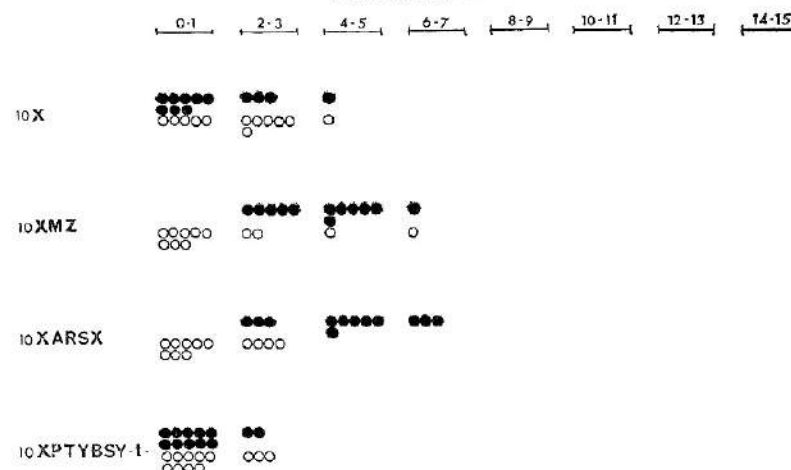
In serie 10XARSX vormden 11 van de 12 linker pootstompen, waarvan de nervus ischiadicus was gedeveïerd en onder bestraalde

TABEL 11

Serie	Experiment (links)	Totaal aantal proefdieren	Resultaat					
			Links			Rechts		
			—	±	+	—	±	+
10X	alleen bestraling met 1000 r	12	9	2	1	4	6	2
10XMZ	schijndevisatie	12	1	1	10	8	2	2
10XARSX	gedeveïerde zenuw in contact met homoplastisch implantaat	12	0	1	11	8	2	2
10XPTYBSY-t	homoplastisch implantaat op afstand	12	11	1	0	10	2	0

De mate van regeneratie van bestraalde pootstompen aan linker en rechter zijde, uitgedrukt in —, ± en +, beoordeeld op de 80e dag na amputatie (—=gladde stomp, epidermisknop of -sliert; ±=epidermissliert met bindweefsel, blastema; +=afgeplat blastema, tenenplaat, poot). De rechter achterpoot is steeds alleen bestraald met 1000 r.

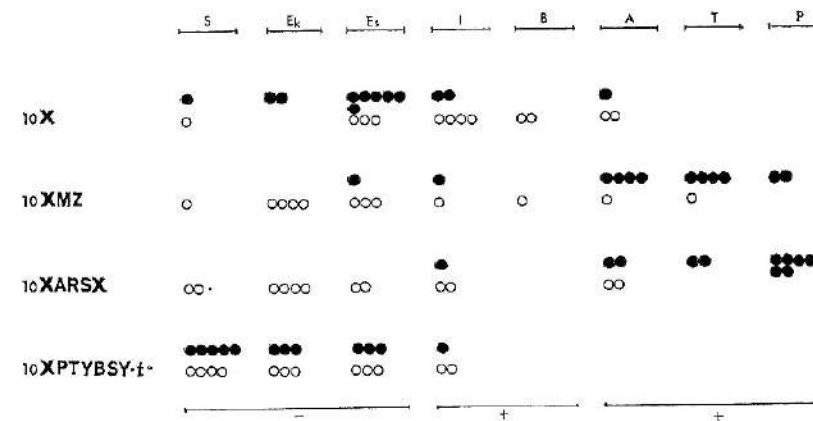
DIAGRAM 17



De lengte van de regeneraten op de 80e dag na de amputatie.

● en ○ staan telkens voor 1 regeneraat resp. aan de linker en aan de rechter zijde. Verticaal zijn de verschillende experimenten vermeld. Horizontaal is de lengte aangegeven in mm. Het aantal proefdieren per experiment is 12.

DIAGRAM 18



Specificatie van de regeneraten op de 80e dag na de amputatie.

● en ○ staan telkens voor 1 regeneraat resp. aan de linker en aan de rechter zijde. Verticaal zijn de verschillende experimenten vermeld. Horizontaal is de kwaliteit van de regeneraten aangegeven (S=Gladde stomp; Ek=Epidermisknop; Es=Epidermissliert; I=Epidermissliert met bindweefsel; B=Blastema; A=Afgeplat Blastema; T=Tenenplaat; P=Poot). Het aantal proefdieren per experiment is 12.

huid van het lumbale gebied eindigde, poten, tenenplaten of afgeplatte blastemata. Aan de rechter zijde werden 2 afgeplatte blastemata waargenomen, voor het overige hoogstens epidermisslierten. De linker en rechter pootstompen in de serie 10XPTYBSY-t toonden eenzelfde beeld: zij waren glad of droegen slierten epidermis.

De als "poot" geklasseerde regeneraten in deze reeks proeven waren over het algemeen klein (3-4 mm) met een enkele uitschieter tot 7 mm. De best gevormde regeneraten imponeerden als voetjes, die vrijwel direct aan het bovenbeen vastzaten. In vele gevallen was het aantal tenen kleiner dan normaal of waren zij abnormaal ten opzichte van elkaar geplaatst.

DISCUSSIE

De pootstompen in de serie 10XPTYBSY-t bleken even weinig of zelfs in nog mindere mate in staat tot regeneratie als die in de controle-serie 10X. Van een homoplastisch implantaat dat een extra poot vormt, gaat dus zeker geen stimulans uit — via eventueel opgewekte afweerreacties — op de regeneratie van bestraalde pootstompen.

De gevolgen van schijndeviatie bleken afhankelijk van de gebruikte dosis röntgenstralen. Na bestraling met 1000 r werd met deze ingreep bereikt, dat 10, in plaats van 1, op de 12 pootstompen poten, tenenplaten of afgeplatte blastemata regeneerden. Bij 1250 r was dit effect minder sterk en bij 1500 r praktisch nihil. Men moet dus concluderen, dat het trauma, waarmee de schijndeviatie gepaard gaat, de regeneratie stimuleert, en het effect van deze stimulans kleiner wordt naarmate de poten tevoren met een hogere dosis zijn bestraald. Na bestraling met 1500 r is de schade klaarblijkelijk te groot, om schijndeviatie nog enig macroscopisch waarneembaar effect te doen sorteren.

In vergelijking met de uitkomsten van het experiment MZ (hoofdstuk V), waarbij dezelfde operatie is uitgevoerd na bestraling op de "oude" wijze, vallen enkele verschillen op. Bij het laatstgenoemde experiment deed schijndeviatie een groter aantal en bovendien forsere, meer tenen-dragende regeneraten ontstaan in plaats van slankere met minder tenen. In de series 10XMZ en 12XMZ werden pootstompen, die anders slechts een epidermissliert zouden hebben voortgebracht, aangezet tot de vorming van voetachtige regeneraten. Ook bleef het effect bij deze laatste proeven duidelijk beperkt tot de geopereerde poot, zonder een aanduiding

zelfs van een stimulering van de regeneraten aan de contra-laterale zijde zoals in de oerdere proeven.

De vrijwel gelijke uitkomsten van de series 10XMZ en 10XARSX laten zien, dat het niets uitmaakt, of de gedeveerde zenuw weer in de poot wordt teruggelegd of onder de bestraalde huid in de flank wordt gedeveerd. Opnieuw is er dus geen reden om aan een contact van de gedeveerde zenuw met een implantaat een specifieke betekenis toe te kennen voor het regeneratievermogen van de bestraalde pootstompen. Hetzelfde werd eerder gesteld (hoofdstuk V) in connex met het experiment van HARREBOMÉE, zij het met enige bedenkingen. Deze hadden betrekking op de verschillen in aard en plaats van de implantaten tussen het laatstgenoemde en de eigen experimenten. Maar zelfs wanneer eenzelfde pootvormend implantaat werd gebruikt en dit op dezelfde plaats werd geïmplanteerd, dan nog bleek het effect op de regeneratie van de bestraalde pootstompen niet groter dan van het enkel vrijprepareren en terugleggen van de zenuw. Dit werd gevonden bij met 1000 r bestraalde dieren (series 10XPTYBSY en 10XMZ) en eveneens na bestraling met 1250 en 1500 r (series 12XPTYBSY, 12XMZ, 15XPTYBSY, 15XMZ). Hiermede is het vroeger gemaakte voorbehoud komen te vervallen en is de conclusie geoorloofd, dat ook de indertijd door HARREBOMÉE waargenomen regeneraten niet geïnterpreteerd mogen worden als gevolgen van een herstel van het regeneratievermogen van de bestraalde poten, berustend op een wisselwerking tussen de gedeveerde zenuw en een pootvormend implantaat in de flank.

Ook bij op de gemodificeerde wijze bestraalde dieren is dus het volgende gebleken:

(1) Een homoplastisch — in dit geval pootvormend — implantaat kan langs humorale weg niet de bestraalde (1000 r) poten tot regeneratie aanzetten.

(2) Het manipuleren met een nervus ischiadicus, zoals dit bij een schijndeviatie gebeurt, stimuleert op zichzelf reeds de regeneratie van de betreffende pootstomp.

(3) Bij de gebruikte doses (minimaal 1000 r) heeft schijndeviatie van de linker nervus ischiadicus geen effect op de regeneratie van de contra-laterale pootstomp.

(4) Bij een herhaling van het experiment van HARREBOMÉE werd geen herstel van het regeneratievermogen geobserveerd, dat

was toe te schrijven aan een contact van de gedeveerde zenuw met het onbestraalde implantaat in de flank.

Hiermee is de veronderstelling, dat bij de proef van HARREBOMÉE de gedeveerde zenuw zich herstelde van het effect van bestraling door contact met bestraald wondepitheel — hetgeen via het ruggemerg en andere zenuwen zou leiden tot een herstel van het regeneratievermogen van de bestraalde poten — overbodig geworden. Het zelfde geldt voor het op deze hypothese geënte denkbeeld, dat wanneer een onbestraald implantaat in de bestraalde poot zelf aanwezig is, de vorming van een regeneraat mogelijk wordt via een soortgelijk herstel van de zenuw (TRAMPUSCH 1964a).

Nu een herstel van de regeneratie-bevorderende (trofische) functie van de bestraalde zenuw in het eigen onderzoek niet bleek te zijn aan te tonen, deed zich de vraag voor, of een verstoring van deze functie van de zenuw door röntgenstralen wel vast stond. In het volgende hoofdstuk zullen de experimentele gegevens, waarop dit gebaseerd was, opnieuw worden gezien en op hun merites getoetst.

HOOFDSTUK VIII

DE INVLOED VAN RÖNTGENSTRALEN OP DE TROFISCHE FUNCTIE VAN DE ZENUW

INLEIDING

Door verscheidene onderzoekers is erop gewezen (zie voor overzichten SINGER 1952, 1965), dat de aanwezigheid van een minimum aantal, met hun perikaryon verbonden, zenuwvezels onontbeerlijk is voor de regeneratie van extremiteiten bij amphibia. VERGROESEN (1958) heeft destijds vermoed, dat röntgenstralen de hier in het geding zijnde trofische functie van de zenuw verstoren en daardoor een verlies van het vermogen tot regeneratie teweegbrengen. Volgens TRAMPUSCH (1964a) bestond er een causaal verband tussen een herstel van het regeneratievermogen van bestraalde poten en een herstel van de trofische functie van de zenuw. De inmiddels verkregen uitkomsten hebben aanleiding gegeven de indertijd daarvoor aangevoerde experimentele resultaten op andere wijze te interpreteren (hoofdstukken V en VII). De aandacht werd daarom vervolgens gericht op de experimenten, waarop het denkbeeld van een verstoring van de trofische functie oorspronkelijk was gebaseerd. Tevens leek het van belang VERGROESEN's resultaten door eigen experimenten te verifiëren.

Bij de twee experimenten van VERGROESEN (1958) was de röntgenbestraling (1440 r) beperkt gebleven tot de vrije rechter en linker, resp. alleen de vrije rechter achterpoot; de romp en de proximale delen van het bovenbeen waren daarbij door een loden koker beschermd. De amputatie geschiedde door de knie. Bij het eerste experiment werd de nervus ischiadicus van de linker achterpoot vóór de bestraling vrijgeprepareerd en onder de romphuid geschoven, waar hij buiten het bereik van de röntgenstralen bleef. Onmiddellijk na de bestraling werd de nog onbestraalde zenuw teruggelegd op zijn vroegere plaats in de nu bestraalde poot. Aan de rechter achterpoot werd dezelfde ingreep verricht, doch met dit verschil, dat de zenuw vóór de bestraling werd teruggelegd. Beide bestraalde achterpoten werden 4 dagen later geamputeerd, met als resultaat aan de linker zijde de vorming van flinke regeneraten, terwijl aan de rechter zijde regeneratie uitbleef.

Bij het tweede experiment werden delen van de nervus ischiadicus uit de onbestraalde linker achterpoot geïmplanteerd in de rechter achterpoot, die wel bestraald was. Omdat deze rechter achterpoot na amputatie ter hoogte van het implantaat, geen regeneraat kon vormen werd geconcludeerd, dat bij het eerste experiment de axonen van de onbestraalde zenuw verantwoordelijk waren voor de aan de linker zijde waargenomen regeneratie. Voorts veronderstelde VERGROESEN dat bij ditzelfde experiment het uitblijven van regeneratie aan de rechter zijde, waar poot en zenuw beide waren bestraald, te wijten was aan een verstoring van de trofische functie van de zenuwen door de röntgenstralen.

Bij deze proeven kunnen enkele kanttekeningen worden gemaakt. Het vrijprepareren van de nervus ischiadicus brengt het risico met zich mee, dat — of door directe mutilatie of door een verstoring van de circulatie — aanzienlijke delen van de poot te gronde gaan. Wanneer nu het proximale deel van het bovenbeen evenals de romp niet bestraald zijn, bestaat de kans, dat deze regressie, ook nog na amputatie, zich zover in proximale richting uitbreidt, dat cellen uit het onbestraalde gebied gelegenheid krijgen een blastema te vormen. Daarmee zouden dus deze onbestraalde cellen uiteindelijk verantwoordelijk zijn voor de regeneratie. Dit potentiële “lek” in de proefopstelling van VERGROESEN zou vermeden kunnen worden door nauwkeurig acht te slaan op de uitbreiding van een regressie en pas tot amputatie over te gaan, als deze zich duidelijk aftekent, dus niet op de vierde dag, zoals VERGROESEN deed, maar later. Tevens verdient het aanbeveling om het niveau van de amputatie door het onderbeen te kiezen, teneinde de afstand tot het onbestraald gebleven gebied te vergroten.

Tegen het gebruik van een aan de rechter achterpoot verrichte ingreep als controle voor een operatie aan de linker achterpoot — zoals bij het eerste experiment — zijn bedenkingen in te brengen. Door links- of rechtshandigheid van de operateur zullen kleine maar toch ongewenste verschillen tussen de uitvoering van de operatie aan linker en rechter zijde optreden, die de vergelijking kunnen vertroebelen. Bovendien was te voren niet nagegaan of een ingreep verricht aan de ene poot geen effect kan hebben op het resultaat bij de contra-laterale poot. Ook zal een eventuele inhomogeniteit in de gebruikte stralenbundel, zich minder doen gelden bij de vergelijking van uitsluitend linker of rechter poten, wanneer de proefdieren tenminste op precies dezelfde wijze zijn bestraald en van

ongeveer gelijke grootte zijn. Bij het eigen onderzoek werden daarom de verschillende experimentele ingrepen verricht bij afzonderlijke groepen proefdieren, steeds aan de linker achterpoot. De behandeling van de rechter achterpoot was in alle experimenten dezelfde: amputatie op een overeenkomstig niveau.

Opdat een eventuele betekenis van de gesignaleerde “lekken” zou kunnen blijken werd de eerste proef van VERGROESEN met de hierboven toegelichte wijzigingen “herhaald” in de experimenten 15XPYZ en 15XPXZ (waarbij 15 staat voor 1500 r, XP: alleen extremiteiten bestraald; YZ en XZ: resp. onbestraalde en bestraalde zenuw).

Een andere opmerking zou nog kunnen zijn, dat VERGROESEN niet het effect getoetst heeft van de combinatie van vrijprepareren van de zenuw en inbrengen van een onbestraald stuk van een andere zenuw. Daarom werd deze combinatie van ingrepen uitgevoerd in het experiment 15XPXZZY.

In de serie 15XPSZ werd onmiddellijk na bestraling van de achterpoten, waarbij de romp en de proximale delen van het bovenbeen waren afgeschermd, de nervus ischiadicus, geheel proximaal en dus nog in onbestraald gebied, doorgesneden (S=doorsnijding). Distaal van de doorsnijding zullen dan de bestraalde axonen degenereren, terwijl vanuit de proximale stomp weer nieuwe vezels ingroeien. Op deze wijze wordt de bestraalde poot gereïnnerveerd door onbestraalde axonen en zou nu evengoed in staat moeten zijn tot regeneratie, als de bovengenoemde bestraalde poot met een onbestraalde zenuw. Aantrekkelijk hierbij is dat de poot behalve door de amputatie niet nog gelaedeerd wordt door het vrijprepareren van de zenuw.

In hoeverre juist traumata bestraalde pootstompen tot regeneratie zouden kunnen aanzetten, werd nagegaan in serie 15XPT (T=trauma).

Tenslotte diende als controle voor alle bovenstaande proeven de serie 15XP, waarin de beide bestraalde achterpoten zonder verdere manipulaties werden geamputeerd.

KORTE BESCHRIJVING VAN DE EXPERIMENTEN

Experiment 15XP; uitsluitend bestraling met 1500 r

- (a) Bestraling van de beide achterpoten met 1500 r, terwijl het lumbo-sacrale gebied en de meest proximale delen van de achterpoten werden beschermd door een loden “broek” (zie hoofdstuk II, blz. 31).

- (b) 7 dagen na bestraling: amputatie van linker en rechter poot door het onderbeen, even distaal van de knie.
- (c) 80 dagen na amputatie: einde van het experiment.

Experiment 15XPYZ; zenuw onbestraald

- (a) De uit de linker achterpoot op de gebruikelijke wijze vrijgeprepareerde nervus ischiadicus werd onder de romphuid geschoven; de beide achterpoten werden met 1500 r bestraald, terwijl het lumbo-sacrale gebied en de aangrenzende pootdelen door een loden "broek" werden beschermd; daarna werd de zenuw, die eveneens beschermd was geweest, weer teruggelegd en werden de wondranden zo goed mogelijk geapplianceerd.
- (b) 7 dagen na bestraling:
 1. Vaststellen van de mate van regressie.
 2. Amputatie van linker en rechter poot even onder de knie, wanneer tenminste de regressie niet was voortgeschreden tot voorbij het beoogde vlak van amputatie; was dit wel het geval, dan werd geen amputatie verricht.
- (c) 80 dagen na amputatie: einde van het experiment.

Experiment 15XPXZ; zenuw bestraald

Dit experiment werd geheel uitgevoerd als het vorige, met uitzondering van de volgorde van handeling in het onderdeel:

- (a) De vrijgeprepareerde nervus ischiadicus werd onder de romphuid geschoven en direct weer teruggelegd in de poot; pas daarna volgde bestraling van de beide achterpoten.

Experiment 15XPXZYZ; zenuw bestraald, implantatie van 2 losse stukken onbestraalde zenuw

De uitvoering van dit experiment is gelijk aan die van het vorige, behalve de volgende uitbreiding van punt:

- (a) Na bestraling van de poot werden 2 losse stukken onbestraalde zenuw geïmplanteerd, reikend van de voet tot aan de pootbasis; het waren delen van de nervus ischiadicus en nervus brachialis van een onbestraalde donor.

Experiment 15XPSZ; nervus ischiadicus proximaal doorgesneden

- (a) Bestraling van beide achterpoten met 1500 r, dieren in loden "broek", doorsnijding van de nervus ischiadicus via een kleine incisie proximaal in de poot ter hoogte van het caput femoris in onbestraald gebied.

- (b) 7 dagen na de bestraling: amputatie van beide achterpoten even distaal van de knie.
- (c) 80 dagen na amputatie: einde van het experiment.

Experiment 15XPT; herhaald trauma

- (a) Bestraling van beide achterpoten met 1500 r, dieren in loden "broek".
- (b) 7 dagen na bestraling: amputatie van de beide achterpoten even distaal van de knie.
- (c) 2e, 3e en 4e dag na amputatie: traumatisatie van de pootstomp door speldeprikken.
- (d) 80 dagen na amputatie: einde van het experiment.

Voor deze experimenten werden grotere dieren gebruikt dan voor de vorige. Hun totale lengte bij het begin van de proeven bedroeg 83-95 mm, hun kop-poot lengte 42-48 mm. Deze keus had tweeërlei redenen. De door VERGROESEN gebruikte dieren hadden ongeveer dezelfde afmetingen, bovendien werd bij deze grotere dieren een relatief kleiner deel van de in de "broek" stekende achterpoten afgeschermd door de 2 mm dikke loodplaat, waaruit de "broek" gemaakt is. Elke serie bestond weer uit 12 proefdieren.

WAARNEMINGEN

Er was geen sterfte onder de dieren; zij bleven tot het einde van de proeven in goede conditie. Hun totale lengte nam toe tot 127-136 mm, hun kop-poot lengte tot 59-65 mm.

De combinatie van bestraling en tijdelijke deviatie van de nervus ischiadicus — en eventueel nog het aanbrengen van een implantaat — werd bij een aanmerkelijk aantal proefdieren gevolgd door het afsterven van distale delen van de poot. De uitbreiding van de op de 7e dag na amputatie duidelijk gedemarkeerde zone van necrose was zeer verschillend. Bij sommige poten was het versterf beperkt gebleven tot enkele tenen; bij andere had de regressie zich uitgebreid tot of nog voorbij het beoogde vlak van amputatie; er werd dan geen amputatie verricht. Dit kwam in de series 15XPYZ, 15XPXZ en 15XPXZYZ resp. 5, 3 en 5 maal voor. In de overige series (15XP, 15XPSZ, 15XPT) is vóór de amputatie nooit enige necrose aan de extremiteiten waargenomen.

Een overzicht van de lengte en de aard van de regeneraten op de 80e dag na amputatie geven Tabel 12 en de Diagrammen 19 en 20.

TABEL 12

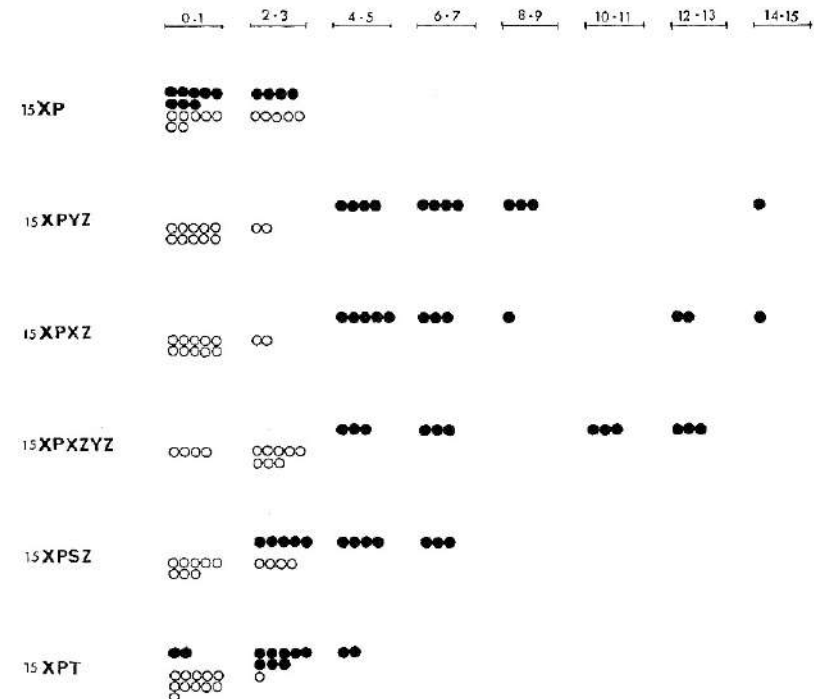
Serie	Experiment (links)	Totaal aantal proefdieren	Resultaat					
			Links			Rechts		
			—	±	+	—	±	+
15XP	alleen bestraling met 1500 r	12	11	1	0	12	0	0
15XPYZ	zenuw onbestraald	12	0	0	12	12	0	0
15XPXZ	zenuw bestraald	12	0	0	12	10	2	0
15XPXZYZ	zenuw bestraald, onbestraalde zenuw geïmplanteerd	12	0	0	12	8	2	2
15XPSZ	nervus ischiadicus door-gesneden	12	0	1	11	11	1	0
15XPT	herhaald trauma	12	2	1	9	12	0	0

De mate van regeneratie van bestraalde pootstompen aan linker en rechter zijde, uitgedrukt in —, ± en +, beoordeeld op de 80e dag na amputatie (— = gladde stomp, epidermisknop of -sliert; ± = epidermissliert met bindweefsel, blastema; + = afgeplat blastema, tenenplaat, poot). De rechter poot is steeds alleen bestraald met 1500 r.

De rechter pootstompen, waaraan behalve de amputatie geen verdere operaties waren verricht boden in de verschillende series een zeer uniform beeld: in de overgrote meerderheid der gevallen waren slechts epidermisslierten ontstaan. Twee afgeplatte blastemata in de serie 15XPXZYZ waren de enige als + genoteerde regeneraten in de gehele reeks. Hetzelfde uniforme beeld leverden de linker achterpoten van de controle-serie 15XP op, die eveneens alleen waren geamputeerd.

In tegenstelling hiermee waren de overigens onderling slechts weinig verschillende resultaten in de series 15XPYZ, 15XPXZ en 15XPXZYZ. Hier hadden alle linkszijdige pootstompen grotere dan wel kleinere, ten dele als poot en ten dele als tenenplaat geklasseerde regeneraten. De onderlinge verschillen die er tussen de regeneraten bestonden, bleken op opvallende wijze samen te hangen met de mate van regressie, die op de 7e dag na de bestraling was vastgesteld (Diagram 21 en 22). Was namelijk op dat tijdstip de regressie verder gevorderd dan het beoogde vlak van amputatie dan waren relatief grote en onveranderlijk als poot geklasseerde regeneraten ontstaan. Wanneer er daarentegen geen of slechts een geringe

DIAGRAM 19



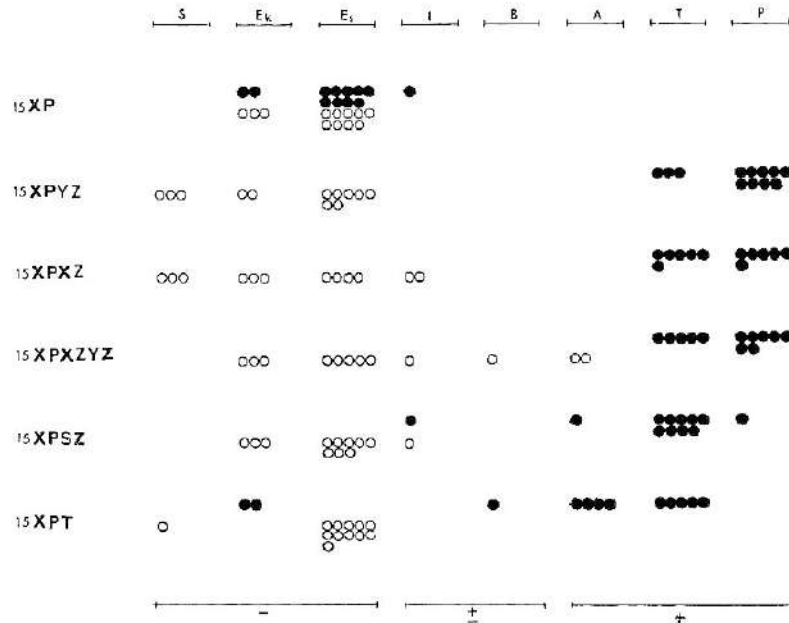
De lengte van de regeneraten op de 80e dag na de amputatie.

● en ○ staan telkens voor 1 regeneraat resp. aan de linker en aan de rechter zijde. Verticaal zijn de verschillende experimenten vermeld. Horizontaal is de lengte aangegeven in mm. Het aantal proefdieren per experiment is 12.

regressie was geweest, zodat een amputatie door het onderbeen kon worden uitgevoerd, dan ontstonden kleinere, meestal als tenenplaat geklasseerde regeneraten. De grote regeneraten, waarin naast voet-elementen ook proximale poot-structuren aanwezig waren, vertoonden een geleidelijke overgang naar de pootstomp; de kleinere regeneraten leken vrijwel alleen uit voet-elementen opgebouwd en waren scherp af te grenzen van de stomp. Het verschil tussen beide categorieën van regeneraten is geïllustreerd in Fig. 3.

De linkszijdige pootstompen van de proefdieren in de serie 15XPSZ, waar alleen de nervus ischiadicus was doorgesneden droegen regeneraten (Fig. 4) die naar grootte en aard geheel overeenkwamen met het hierboven besproken kleinere type.

DIAGRAM 20



Specificatie van de regeneraten op de 80e dag na de amputatie.

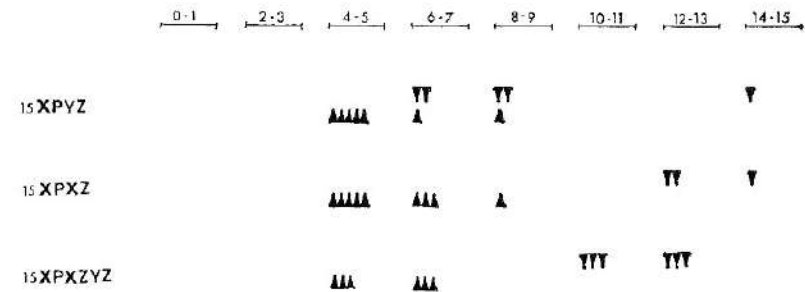
• en ○ staan telkens voor 1 regeneraat resp. aan de linker en aan de rechter zijde. Verticaal zijn de verschillende experimenten vermeld. Horizontaal is de kwaliteit van de regeneraten aangegeven (S=Gladde stomp; Ek=Epidermisknop; Es=Epidermissliert; I=Epidermissliert met bindweefsel; B=Blastema; A=Afgeplat Blastema; T=Tenenplaat; P=Poot). Het aantal proefdieren per experiment is 12.

Bij de serie 15XPT hadden 9 van de 12 pootstompen afgeplatte blastemata of tenenplaten gevormd; van de overige droeg er 1 een blastema en 2 een epidermisknop.

DISCUSSIE

Bestraling met een dosis röntgenstralen van 1500 r, zoals in deze reeks experimenten toegepast, bleek op zich toereikend om regeneratie te verhinderen. Immers, bij de pootstompen, die na bestraling zonder verdere ingrepen waren geamputeerd — dus in alle series de rechtszijdige en in serie 15XP bovendien de linkszijdige — waren nagenoeg alleen maar slierten epidermis ontstaan.

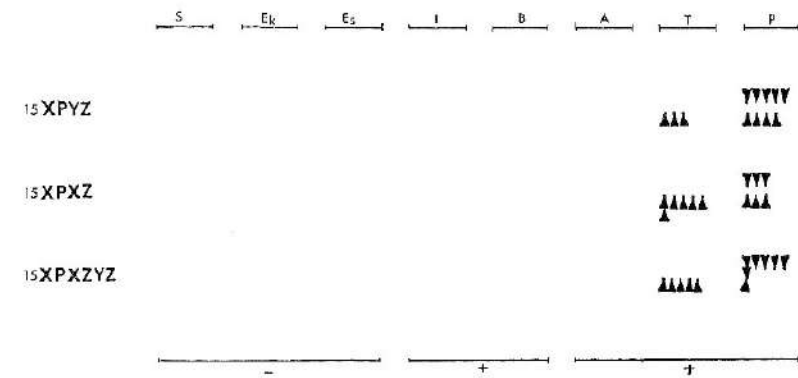
DIAGRAM 21



Verband tussen de lengte van de linkszijdige regeneraten en de mate van regressie, vastgesteld op de 7e dag na de operatie.

▲ en ▼ staan telkens voor 1 regeneraat, voortgekomen uit pootstompen, waarbij resp. een geringe of een sterke mate van regressie was vastgesteld. Verticaal zijn de verschillende experimenten vermeld. Horizontaal is de lengte aangegeven in mm. Het aantal proefdieren per experiment is 12.

DIAGRAM 22



Verband tussen de kwaliteit van de linkszijdige regeneraten en de mate van regressie, vastgesteld op de 7e dag na de operatie.

▲ en ▼ staan telkens voor 1 regeneraat, voortgekomen uit pootstompen, waarbij resp. een geringe of een sterke mate van regressie was vastgesteld. Verticaal zijn de verschillende experimenten vermeld. Horizontaal is de kwaliteit van de regeneraten aangegeven (S=Gladde stomp; Ek=Epidermisknop; Es=Epidermissliert; I=Epidermissliert met bindweefsel; B=Blastema; A=Afgeplat Blastema; T=Tenenplaat; P=Poot). Het aantal proefdieren per experiment is 12.

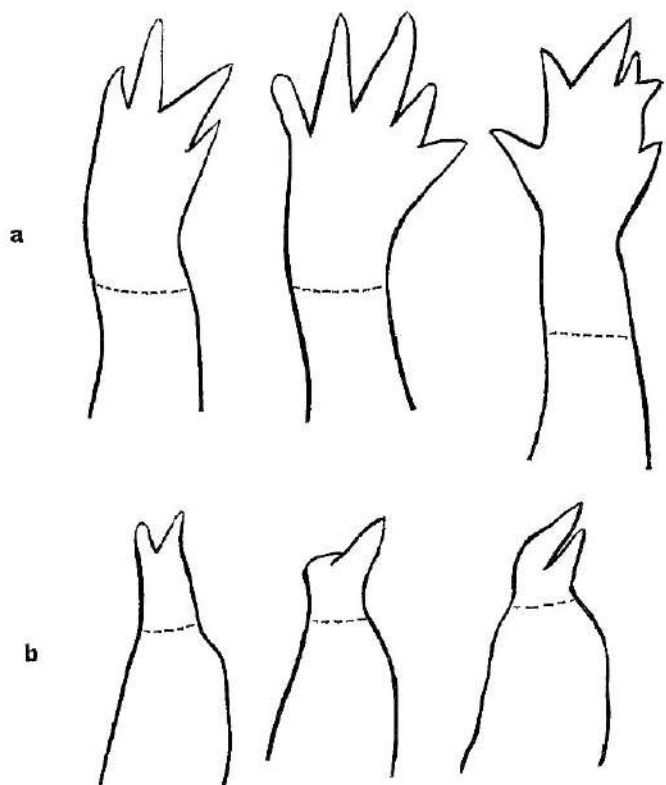


Fig. 3. Twee typen van regeneraten bij het experiment 15XPXZYZ (zie voor beschrijving blz. 98) a. Grotere regeneraten, voortgekomen uit pootstompen, die na bestraling en operatie een zo verregaande regressie hadden ondergaan, dat 1 week later geen amputatie door het onderbeen kon worden verricht. b. Kleinere regeneraten, ontstaan wanneer na bestraling en operatie slechts een geringe regressie was opgetreden, zodat een amputatie door het onderbeen wel mogelijk was.

De vorming van regeneraten uit bestraalde pootstompen, waarvan de nervus ischiadicus onbestraald was (serie 15XPYZ), kwam volledig overeen met de bevindingen van VERGROESEN (1958). Deze auteur beschreef echter ook — het werd hierboven nog gereleveerd — dat regeneratie uitbleef bij controle-poten, waarvan de nervus ischiadicus op dezelfde wijze was behandeld maar tevens bestraald. Bij het controle-experiment 15XPXZ bleken daarentegen bestraalde pootstompen met een bestraalde zenuw even goed in staat

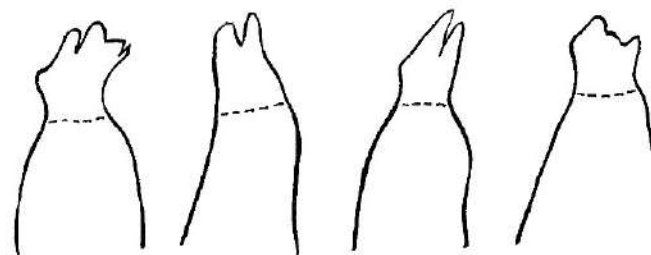


Fig. 4. Regeneraten bij het experiment 15XPSZ (bestraling van uitsluitend de achterpoten; doorsnijding van de nervus ischiadicus proximaal in het bovenbeen; amputatie door het onderbeen); zij tonen een grote overeenkomst met de in Fig. 3b weergegeven regeneraten.

tot regeneratie als die met een onbestraalde zenuw. De resultaten van de series 15XPXZ en 15XPYZ zijn dus geheel niet in overeenstemming met VERGROESEN's denkbeeld omtrent de verstoring van de trofische functie van de zenuw door röntgenstraling, eerder vormen zij een aanwijzing tegen een dergelijke verstoring. Hoe het verschil tussen de resultaten van VERGROESEN en de hier gerapporteerde kan worden uitgelegd, komt later aan de orde.

Het behoeft geen verbazing te wekken, dat ook in de serie 15XPXZYZ, waar losse stukken onbestraalde zenuw werden geïmplanteerd, regeneraten ontstonden. Deze kunnen immers worden toegeschreven aan het vrijprepareren van de zenuw, zoals bij het experiment 15XPXZ; welke rol de ingebrachte onbestraalde cellen hierbij nog vervullen is niet te zeggen. Bij het desbetreffende experiment van VERGROESEN werd geen enkel regeneraat gezien, maar daar was de zenuw ook ongemoeid gelaten en het implantaat bovendien van geringere omvang.

Het is opvallend, dat in de series 15XPXZ, 15XPYZ en 15XPXZYZ de grootste regeneraten voortkwamen uit pootstompen, waarbij de regressie het verst proximaal, dus in de richting van het onbestraalde deel van de poot, was voortgeschreden. Men kan veronderstellen, dat in die gevallen inderdaad cellen afkomstig uit het onbestraalde poot-deel, aan het regeneratieproces hebben deelgenomen. Evenwel hadden ook de pootstompen, waar de regressie gering was, of in ieder geval beperkt was gebleven tot het onderbeen, regeneraten van aanzienlijke omvang. Er moet dus nog een andere oorzaak zijn voor het regenereren van deze bestraalde

pootstompen, en wel één, die voor alle drie experimenten op gelijke wijze geldt. Het ligt voor de hand, deze oorzaak te zoeken in de enige handeling, die bij alle drie experimenten werd uitgevoerd: het vrijprepareren en weer terugleggen van de nervus ischiadicus.

Er zijn diverse argumenten aan te voeren, waarom deze ingreep tot regeneratie zou aanzetten. Allereerst zou het trauma, bij de operaties aan de weefsels van de poot toegebracht, een dergelijk effect kunnen hebben. Immers, de traumatisatie door "speldeprikken" heeft in serie 15XPT ook tot de vorming van regeneraten geleid.

Verder is het mogelijk, dat bij de genezing van de voor het vrijprepareren van de nervus ischiadicus gemaakte wond, reikend van de voet tot aan het onbestraalde gebied van de pootbasis, ook onbestraalde cellen een weg vinden naar distaal en aan het einde van de stomp het regeneraat mede opbouwen.

De uitkomsten van de serie 15XPSZ kunnen echter nog in een andere richting wijzen. Hier bleek alleen al de doorsnijding van de nervus ischiadicus proximaal in onbestraald gebied, 1 week voor de amputatie, later de regeneratie te stimuleren. Verwonding van de pootstomp, anders dan door de amputatie kwam in dit geval niet voor, zodat de beide vorige verklaringen hier niet in aanmerking komen. Wel zou men de volgende veronderstellingen kunnen maken:

(1) Potentiele blastemacellen migreren vanuit het onbestraalde gebied aan de pootbasis naar distaal als begeleiders van de ter reïnnervatie uitgroeïende zenuwvezels en nemen bij een later uitgevoerde amputatie door het onderbeen daar deel aan de vorming van een blastema.

(2) Ten gevolge van de aan de amputatie voorafgaande denervatie en reïnnervatie is de "bereidheid" van de bestraalde weefsels om als reactie op een amputatie blastemacellen te vormen, zo toegenomen dat ondanks de bestraling een regeneraat tot stand komt.

(3) Het trofische effect van de kort tevoren ter reïnnervatie ingegroeide zenuwvezels is groter dan dat van de oorspronkelijke aanwezige innervatie, waardoor ondanks bestraling regeneratie kan plaats vinden.

Bij het alleen maar vrijprepareren van de nervus ischiadicus worden grote delen van de poot van hun innervatie beroofd, zodat ook hier de drie laatst genoemde hypothesen zijn te overwegen. Rest nog het verschil te interpreteren tussen VERGROESEN's

resultaten en de hier beschreven experimenten 15XPXZ en 15XPYZ. Bij de proefdieren van VERGROESEN (1958) trad aan de linker zijde, waar de pootstompen voorzien waren van een onbestraalde zenuw, wel regeneratie op, doch niet aan de rechter zijde, waar de zenuw bestraald was. In het eigen onderzoek bleken linkszijdige bestraalde pootstompen met een bestraalde of onbestraalde nervus ischiadicus even goed tot regeneratie in staat.

Ter verklaring van dit verschil kan aan het onderscheid tussen grotere regeneraten voortgekomen uit pootstompen met een sterke regressie en kleinere regeneraten ontstaan uit pootstompen, die een geringere regressie hadden ondergaan, belang worden toegekend. Het is immers niet uit te sluiten, dat tengevolge van de rechtshandigheid van de operator het trauma van dezelfde ingreep aan de linker zijde systematisch groter was, en daardoor de regressie sterker, zodat hier meer of uitsluitend grotere regeneraten ontstonden. Omdat de kleinere regeneraten zich langzamer ontwikkelden, is het mogelijk dat VERGROESEN zijn proeven heeft kunnen beëindigen voordat zij als zodanig waren te herkennen.

Uit de resultaten van de in dit hoofdstuk beschreven experimenten kunnen tenslotte de volgende conclusies worden getrokken:

(1) De experimentele resultaten, op grond waarvan indertijd tot een invloed van röntgenstralen op de trofische functie van de zenuw werd besloten, konden niet worden bevestigd. Het eigen onderzoek leverde daarentegen zelfs aanwijzingen op, dat een dergelijke invloed niet bestaat.

(2) Uit poten, die onder afscherming van het lumbo-sacrale gebied en de pootbasis bestraald waren met een dosis van 1500 r, komen na amputatie zonder meer geen regeneraten in de zin van poot, tenenplaat, of afgeplat blastema tot ontwikkeling.

(3) Uit op dezelfde wijze bestraalde poten kunnen dergelijke regeneraten wel ontstaan, mits:

- (a) vóór de amputatie de nervus ischiadicus, bestraald of onbestraald, van de voet tot de pootbasis wordt vrijgeprepareerd en weer teruggelegd (schijndeviatie),
- (b) vóór de amputatie de nervus ischiadicus proximaal in onbestraald gebied wordt doorgesneden,
- (c) na de amputatie de pootstomp aan herhaalde traumata (speldeprikken) wordt bloot gesteld.

HOOFDSTUK IX

ALGEMENE DISCUSSIE

Sinds het begin van de jaren dertig is bekend, dat poten van salamanders, die zijn blootgesteld geweest aan röntgenstralen (in een dosering van tenminste 1000 r), niet meer in staat zijn geamputeerde delen door regeneratie te vervangen. Als echter, voorafgaand aan de amputatie, in dergelijke bestraalde poten een stuk huid, skelet of spier, afkomstig van een onbestraalde extremitet is geïmplantéerd, dan komen *wel* regeneraten tot ontwikkeling, wanneer althans het amputatievlak ook door het implantaat heenloopt. De meeste auteurs (UMANSKI 1937; THORNTON 1942; STINSON 1963, 1964a, 1964b, 1964c; SKOWRON en ROGUSKI 1958; LAGAN 1961 en GOSS 1961) menen, dat deze regeneraten alleen zijn opgebouwd uit cellen, afkomstig van het implantaat. Volgens TRAMPUSCH (1951, 1957, 1958a, 1958b en 1964a) echter leveren ook de bestraalde weefsels van de pootstomp daarbij een grote bijdrage, omdat hun vermogen tot regeneratie, als gevolg van de bestraling verloren, door de aanwezigheid van het onbestraalde implantaat weer wordt hersteld.

Op de wijze, waarop dit herstel tot stand zou komen, had de inhoud van een hypothese betrekking, die in 1964 door TRAMPUSCH werd gepubliceerd onder de titel: "Nerves as morphogenetic mediators". Eerder was deze onderzoeker al tot de overtuiging gekomen, dat normaliter een interactie tussen het kort na een amputatie gevormde wondepitheel en de zenuwen in het wondgebied, het regeneratieproces op gang brengt. In een bestraalde pootstomp zou regeneratie nu uitblijven, omdat zowel het atypische wondepitheel als de bestraalde zenuw niet capabel zijn hun bijdrage aan deze interactie te leveren. Dit onvermogen behoeft echter niet blijvend te zijn. Wanneer één van de twee partners maar capabel is, herstelt zich de ander, zodat de interactie weer tot stand komt en de regeneratie daardoor een aanvang kan nemen. Verder kunnen axonen, die alleen in de periferie bestraald zijn, zich herstellen vanuit hun perikarya, mits deze laatste onbestraald zijn. Anderzijds

is ook een herstel mogelijk van bestraalde zenuwcellichamen vanuit bestraalde axonen, die eerder door contact met een capabel wondpitheel waren "genezen".

De in deze hypothese veronderstelde mogelijkheden tot het herstel van het regeneratievermogen van bestraalde poten waren gebaseerd op de volgende drie waarnemingen:

(1) De vorming van regeneraten uit bestraalde pootstompen, waarvan alleen de nervus ischiadicus voor bestraling was gevrijwaard (VERGROESEN 1958) — de onbestraalde axonen zouden hier een herstel van het niet-capabele wondepitheel bewerkstelligen, zodat er een de regeneratie op gang brengende interactie tot stand komt.

(2) De vorming van regeneraten uit bestraalde pootstompen, als de romp onbestraald was gebleven (VERWOERD 1963) — de onbestraalde zenuwcellichamen in ruggemerg en ganglia zouden hier een herstel van de bestraalde axonen in de poot teweegbrengen, waarna op dezelfde wijze als bij (1) het regeneratieproces op gang komt.

(3) De vorming van regeneraten uit pootstompen, gelijktijdig bestraald met het lumbo-sacrale deel van de romp, nadat één (bestraalde) nervus ischiadicus was gedeveerd en in contact gebracht met een onbestraald, poot-vormend implantaat in de flank (HARREBOMÉE, zie TRAMPUSCH 1964a) — door contact met het, in het onbestraalde implantaat gevormde wondepitheel, herstellen zich de bestraalde axonen van de gedeveerde zenuw en via deze ook de bestraalde perikarya in ruggemerg en ganglia, vanwaaruit zoals bij (2) en (1), de zenuwen, die de pootstompen innervieren worden hersteld, waardoor in deze laatste de regeneratie mogelijk wordt.

Het eigen onderzoek sloot aan bij de laatste proef. Het beoogde twee vragen te beantwoorden aangaande het herstel van de gedeveerde zenuw door zijn contact met het onbestraalde implantaat. In de eerste plaats de vraag, welke kwaliteit van het onbestraalde implantaat ten dien aanzien van belang was; immers, het herstel van de normale vermogens van de gedeveerde zenuw in het experiment van HARREBOMÉE zou behalve aan het wondepitheel, ook aan andere delen van het implantaat kunnen zijn ontleend. In de tweede plaats was er de vraag naar de mate van herstel bij een langere of kortere duur van het contact.

Om de boven bedoelde kwaliteit van het implantaat op te sporen werd de regeneratie van bestraalde pootstompen bestudeerd in een negental experimenten, waarbij verschillende typen van implantaten in contact waren gebracht met de gedeveïerde zenuw. HARREBOMÉE's bevindingen als zodanig werden bevestigd; de bestraalde pootstompen vormden regeneraten. Evenwel was de mate van regeneratie in alle experimenten ongeveer gelijk (hoofdstuk III). Dit resultaat was aanvankelijk onbegrijpelijk, maar bij het onderzoek naar de betekenis van de duur van het contact, bleken de regeneraten verkregen, wanneer dit contact korter, dan wel langer duurde of in het geheel niet tot stand was gebracht, overeen te komen met die in de eerste reeks van experimenten (hoofdstuk IV). Het ontstaan van regeneraten in al deze experimenten was dus in feite niet toe te schrijven aan een contact van de gedeveïerde zenuw met het implantaat.

Hoe het ontstaan van deze regeneraten dan wel begrepen moest worden, was alsnog onbekend en vormde het object van verder onderzoek (hoofdstuk V). Daarbij werd het volgende gevonden:

(1) De bestraling met een dosis van 1000 *r*, toegepast op een wijze, die sinds omstreeks 1958 als routine in het laboratorium was gebruikt, was niet toereikend om regeneratie van de achterpoten geheel te onderdrukken.

(2) Onder deze voorwaarde had het vrijprepareren van een nervus ischiadicus (ook wanneer niet gevolgd door deviatie) tot gevolg, dat een groter aantal bestraalde pootstompen regeneraten vormden, die bovendien een forsere bouw en meer tenen hadden.

(3) Nadat de nervus ischiadicus alleen was vrijgeprepareerd en weer teruggelegd in de bestraalde poot werd dezelfde mate van regeneratie en werden dezelfde typen van regeneraten geobserveerd, als wanneer de nervus ischiadicus was vrijgeprepareerd en daarna gedeveïerd en in contact gebracht met een implantaat in de flank.

De regeneraten in de eerste reeks van experimenten, konden dus worden toegeschreven aan een onvoldoende mate van bestraling en aan een de regeneratie bevorderend effect van het manipuleren met de nervus ischiadicus bij de deviatie. Verder werd geconcludeerd, ondermeer na een herhaling van het desbetreffende experiment, dat ook het ontstaan van de door HARREBOMÉE waargenomen regeneraten op deze wijze moest worden geïnterpreteerd (hoofdstuk VII).

Hiermee viel de grond weg, waarop indertijd de opvatting was gebaseerd, volgens welke bestraalde axonen door contact met een capabel wondepitheel, gevormd door onbestraalde huid, zich konden herstellen (TRAMPUSCH 1964a). Dit betekende echter ook, dat de oorspronkelijke probleemstelling van het onderzoek, die betrekking had op de aard van dit herstel niet meer relevant was.

De aan het licht gekomen misvatting over de gevolgen van een dosis röntgentralen van 1000 *r* voor het regeneratievermogen kon achteraf wel worden begrepen. De "zekerheid", dat deze dosis regeneratie volledig onderdrukte, berustte op de resultaten van experimenten van vroegere datum (TRAMPUSCH 1951, 1957, 1959a), waarbij de proefdieren afzonderlijk en in buikligging — gedeeltelijk met de ook bij het eigen onderzoek gebruikte bestralingsapparatuur — waren bestraald. Dezelfde ervaring werd opnieuw opgedaan, toen gebruik gemaakt werd van een gemodificeerde wijze van bestralen (hoofdstuk VI); zelfs een dosis van 875 *r* bleek bij proefdieren van de gebruikelijke grootte al toereikend. Maar, toegediend op de sinds 1958 gebruikelijke wijze was zelfs een dosis van 1000 *r* nog insufficient. De gesignaleerde misvatting is voortgekomen uit het feit, dat men beide wijzen van bestralen — van vóór en van na 1958 — voor equivalent heeft gehouden.

In TRAMPUSCH's hypothese aangaande het herstel van het regeneratievermogen van bestraalde poten, zouden bestraalde axonen behalve door contact met een capabel wondepitheel, zich nog kunnen herstellen vanuit onbestraalde zenuwcellichamen. Tot steun van deze opvatting werd aangevoerd, dat wanneer de bestraling uitsluitend beperkt was tot de poten, terwijl de romp (waarin ruggemerg en ganglia) geheel was beschermd, enige tijd na amputatie toch regeneraten ontstonden. (VERWOERD 1963). Uit de protocollen (daterend uit 1959) kon worden opgemaakt, dat de betreffende proefdieren reeds op de in dit onderzoek niet feilloos gebleken wijze waren bestraald. Deze regeneraten dienen dus in werkelijkheid eerder gezien te worden als een manifestatie van een onvolledig onderdrukt, dan van een hersteld vermogen tot regeneratie.

Vervolgens werd de verstoring van de regeneratie-bevorderende (trofische) functie van de zenuw door röntgenstralen, zoals aan-

genomen in TRAMPUSCH's conceptie, opnieuw getoetst (hoofdstuk VIII).

De opvatting, dat zulk een verstoring zou bestaan, was gebaseerd op conclusies van VERGROESEN (1958). Deze schreef aan onbestraalde axonen — waarvan de perikarya ook onbestraald waren — het vermogen toe, de regeneratie van een voor het overige geheel bestraalde pootstomp mogelijk te maken. Verder veronderstelde hij, dat röntgenstralen het regeneratie-bevorderend (trofisch) effect van de axonen teniet deden, daar hij bij controle-poten, waarvan de axonen bestraald waren, geen regeneratie waarnam. Bij VERGROESEN's experiment waren de linker poten van één serie proefdieren voorzien van een onbestraalde, en de rechter poten van een bestraalde nervus ischiadicus. In het eigen onderzoek werden linkszijdige poten met onbestraalde en eveneens linkszijdige met bestraalde nervi ischiadici van verschillende series proefdieren met elkaar vergeleken.

De uitkomsten bleken *nu* weinig of niet te verschillen. Alle linkszijdige stompvormen als poot of tenenplaat te karakteriseren regeneraten, die in beide series waren te verdelen in twee typen. Ten eerste, grotere en beter ontwikkelde regeneraten, die vooral voorkwamen aan pootstompen, waar de bij de bestraling uitgevoerde operaties voor een eventuele bescherming van de nervus ischiadicus een vergaande regressie had teweeg gebracht. Ten tweede, kleinere en minder goed ontwikkelde regeneraten, die ontstonden uit pootstompen, waarin geen of slechts een geringe regressie was opgetreden. Deze observatie deed een verklaring voor het verschil van VERGROESEN's resultaten vermoeden. Wanneer door dexteriteit van de operateur eenzelfde ingreep bij linkszijdige poten systematisch met een grotere mutilatie gepaard gaat dan bij rechtszijdige, zal bij de eerste na een verder gaande regressie het grotere type van regeneraat tot ontwikkeling komen en bij de laatste na een geringere regressie het kleinere. Als nu bovendien de waarnemingen zich over een kortere duur uitstrekken dan in het eigen onderzoek en daardoor de proeven beëindigd worden op een moment, waarop de kleinere en trager tot ontwikkeling komende regeneraten aan de rechter kant nog niet als zodanig kunnen worden herkend, is VERGROESEN's waarneming te begrijpen.

In tegenstelling tot hetgeen VERGROESEN beweerde, komt dus uit het eigen onderzoek naar voren, dat bestraalde axonen, wat betreft hun regeneratie-bevorderende vermogen, niet inferieur zijn

aan onbestraalde en dat röntgenstralen dit vermogen van de zenuw dus niet verstoren.

Samenvattend, kan men vaststellen, dat de argumenten waarop TRAMPUSCH's hypothese aangaande een herstel van het regeneratievermogen was gebaseerd, bij nader onderzoek niet konden worden bevestigd, omdat zij berustten op interpretaties van experimentele uitkomsten, die in dit onderzoek ingrijpend moesten worden herzien. Hiermee is echter de mogelijkheid tot een herstel van het regeneratievermogen als zodanig niet ontkend.

Als vóór de amputatie huid, skelet of spieren van een bestraalde poot waren vervangen door soortgelijke delen van een onbestraalde extremititeit, dan ontstond een regeneraat, als het vlak van amputatie ook door het implantaat heenliep. Tot een herstel van de vermogens van de bestraalde weefsels in de pootstomp werd indertijd besloten op grond van hun bijdrage aan de opbouw van dit regeneraat. De argumenten voor deze bijdrage waren:

(1) dat, wanneer het implantaat uitsluitend uit onbestraalde huid bestond, niet aangenomen kon worden, dat het ook de spieren (en andere mesodermale componenten) van het regeneraat zou vormen: "...that bone or muscle could be derived from skin epithelium would suppose such a remodelling of the structures that this is hardly conceivable" (TRAMPUSCH 1958b) en

(2) dat, wanneer een onbestraald implantaat aanwezig was, de regeneratie histologisch leek te verlopen, alsof de poot nooit was bestraald (TRAMPUSCH 1959a).

Ten aanzien van deze argumenten is het volgende op te merken:

Ad (1). De mesodermale componenten van het regeneraat zouden kunnen voortkomen uit de dermis van de getransplanteerde huidlap. Dit is ook de mening van UMANSKI (1937, 1946), die soortgelijke proeven gedaan heeft bij ruim 1 jaar oude axolotls. Bij de jongere dieren, die door TRAMPUSCH zijn gebruikt, is de dermis wel veel dunner, maar toch kan deze (HARREBOMÉE, nog ongepubliceerd) hoogstwaarschijnlijk een aanzienlijk aantal blastemacellen leveren.

Ad (2). De histologische gegevens over de regeneratie van een bestraalde pootstomp met een onbestraald implantaat lieten toen en laten nog steeds vele lacunes open, die duidelijker zijn te onderkennen, naarmate de kennis omtrent de histologische verschijnselen in de onbestraalde pootstomp toeneemt (TRAMPUSCH en HARRE-

BOMÉE 1965a). Zij wettigen echter wel de veronderstelling, dat de bestraalde weefsels aan het proces van de regeneratie deel nemen, doch geven stellig geen uitsluitel of dit op dezelfde wijze gebeurt als in een onbestraalde pootstomp.

In een beschouwing over de regeneratie vergelijkt TRAMPUSCH (1959a) het verloop daarvan met een keten van reacties, waarvan elke schakel door een uitwendige ingreep onklaar kan geraken. Als een bestraalde pootstomp dan niet regeneert, wordt dit aan een breuk van een dergelijke — misschien de eerste, de gangmakende — schakel geweten. Is de schakel geheeld, dan verloopt de regeneratie, inclusief de bijdrage van de bestraalde weefsels, weer "als ware de poot nooit bestraald".

Een eerste bezwaar tegen dit denkbeeld is, dat het veronderstelde normale verloop van de regeneratie na heling van de schakel, niet voldoende is geargumenteed.

Een tweede bedenking kan ontleend worden aan het eigen onderzoek (hoofdstuk VI). Het is kenmerkend voor een keten, dat hij wel of niet functioneert. Als röntgenstralen een schakel onklaar zouden maken, zou een toegediende dosis of de regeneratie in het geheel niet belemmeren of volledig blokkeren. De uitkomsten laten echter anders zien. Een dosis van 375 r (proefserie 3X) resulteerde in een te geringe lengte van de proximale delen van het regeneraat, terwijl de distale delen, de voeten, dezelfde afmeting hadden als in regeneraten, ontstaan uit onbestraalde pootstompen. Bij met 500 r bestraalde dieren (proefserie 5X) waren de regeneraten in hun geheel veel kleiner; ook de voeten waren te klein en meestal abnormaal gevormd. Bestraling met 625 r (proefserie 6X) liet hoogstens de vorming van zeer kleine regeneraten toe, waarvan het pootkarakter slechts aan enkele deficiënte tenen te herkennen viel. Na bestraling met 750 r of meer werden na amputatie vrijwel alleen epidermisslierten gevormd.

Kortom er blijkt geen drempel-dosis te bestaan, waarboven regeneratie uitblijft en waaronder deze ongestoord verloopt. De resultaten passen dus niet in het eerder geschetste beeld van de schakel, die door röntgenstralen gebroken wordt, maar wijzen veeleer in andere richting.

Naarmate een hogere dosis is toegepast zijn de regeneraten kleiner en minder goed ontwikkeld. Blijkbaar komen er bij toenemende doses steeds minder blastemacellen beschikbaar om het regeneraat op te bouwen. De uitkomsten geven geen directe aanwijzing, of dit

geweten moet worden aan een te geringe proliferatie van eenmaal gevormde blastemacellen of aan een onvermogen van de cellen in de weefsels om tot blastemacellen te veranderen (dedifferentiatie).

Toch lijkt de eerste mogelijkheid op voorhand minder waarschijnlijk. Aangenomen, dat een blastemacel per definitie in staat is tot deling, zou een geringere frequentie van mitoses moeten worden toegeschreven aan het milieu. De enige factor, die in dit milieu als stimulus voor celdeling bekend staat, is de zenuw (SINGER 1952). Als namelijk langs experimentele weg het aantal zenuwvezels en daarmee de invloed van de zenuw in de pootstomp geleidelijk wordt verminderd, blijkt er een minimaal noodzakelijke dichtheid van vezels te bestaan, waarboven regeneratie geheel ongestoord verloopt en waaronder deze geheel uitblijft (SINGER 1946, 1947a, 1947b). Als röntgenstralen deze invloed van de zenuw zouden aantasten, was ook een alles-of-niets reactie te verwachten. Bovendien brengt een bestraalde poot, waarin een onbestraald weefsel is geïmplant, na amputatie ook een blastema voort, dat zelfs een zeer omvangrijk regeneraat kan vormen. In dit geval moet de zenuw, alhoewel bestraald, zijn regeneratie-bevorderende actie toch ook hebben vervuld. Verder bleken regeneraten, gevormd door bestraalde pootstompen, die slechts verschilden in het al of niet bestraald zijn van de nervus ischiadicus, volledig overeen te komen (hoofdstuk VIII).

Aannemelijker is de tweede mogelijkheid. Het ten gevolge van de amputatie gewijzigde milieu wordt tot een prikkel voor de cellen in de weefsels, grenzend aan het amputatievlak, om tot dedifferentiatie over te gaan. Dit zal op zich zelf weer een prikkel voor naburige cellen zijn, zodat een "golf" van dedifferentiatie optreedt, die zich in de regel niet verder uitstrekt dan tot $\frac{1}{2}$ à 1 mm van het amputatievlak (ANTON 1961, HAY en FISHMAN 1961). Het areaal, waaruit de blastemacellen voortkomen is dus beperkt. Als röntgenstralen in cellen veranderingen teweegbrengen, die de ingrijpende verbouwing tot blastemacel onmogelijk maken, is te verwachten, dat bij lagere doses een relatief klein aantal cellen niet meer en een groter aantal nog wel tot dedifferentiatie in staat is. Bij hogere doses zal deze verhouding omkeren. In het blastemavormende areaal zullen bij toenemende doses steeds minder cellen, die aan een prikkel tot dedifferentiatie worden blootgesteld, daarop ook kunnen reageren, zodat de golf van dedifferentiatie steeds beperkter blijft en minder blastemacellen gevormd worden. Met dit

laatste zijn, zoals eerder opgemerkt (hoofdstuk VI), de afnemende grootten van, en de verschillen in proporties tussen de uit onbestraalde en met 375 en 500 r bestraalde pootstompen voortgekomen regeneraten geheel in overeenstemming.

Bij 750 r zouden zelfs zo weinig cellen in het door amputatie geprikkelde gebied nog tot dedifferentiatie in staat zijn, dat de golf van dedifferentiatie uitblijft en vrijwel alleen epidermisslierten worden gevormd.

Het is mogelijk, dat de initieel door de amputatie uitgelokte reactie van de verwonde weefsels een zeker minimum — een drempel — moet overschrijden, om méér te doen gebeuren dan een eenvoudige sluiting van de wond. SINGER (1946, 1947a, 1947b) heeft al 20 jaren geleden voorgesteld, dat voor het op gang komen van de regeneratie aan bepaalde minimale condities moest worden voldaan. Hij onderscheidde toen een minimaal noodzakelijke dichtheid van de zenuwvezels in het amputatievlak om daar een drempel-hoeveelheid van het "trophic agent for regeneration" aan te voeren. Later (SINGER 1965) zal hij deze hypothese amenderen door de herkomst van het "trophic agent" ook tot andere soorten van cellen uit te breiden; hij handhaaft echter het idee van de drempelwaarde als zodanig. Ook de door TRAMPUSCH en HARREBOMÉE (1965a) waargenomen verbinding tussen zenuw en wondepitheel zou bij deze minimale condities een rol kunnen spelen.

Door BRUNST (1950) en — met minder klem — door BUTLER (1933) is de mening naar voren gebracht, dat een verlies van het vermogen tot celdeling de voornaamste hinderpaal zou zijn voor de regeneratie van bestraalde pootstompen. Dit lijkt op het eerste gezicht in tegenspraak met de hierboven voorgestane opvatting. Volgens recente onderzoekingen (TRAMPUSCH en HARREBOMÉE 1965a) komt echter celdeling niet uitsluitend voor in de phase van proliferatie van het blastema — zoals vroeger altijd gedacht — maar vormt het ook een obligate stap in het proces van dedifferentiatie. De mogelijkheid bestaat, dat de dedifferentiatie juist geblokkeerd is, doordat de door röntgenstralen aangetaste cellen deze mitose niet kunnen volbrengen.

Wat gebeurt er nu volgens de hierboven geschetste zienswijze bij amputatie van een bestraalde poot met een implantaat, afkomstig van een onbestraalde extremitéit? De cellen van het implantaat zullen reageren met dedifferentiatie — aan eventueel

minimaal noodzakelijke condities is voldaan — en een blastema vormen. Door het trauma van de implantatie, de amputatie en vooral de "beroering", die de opbouw van het blastema en het regeneraat met zich meebrengt, geprikkeld, zullen de cellen in de bestraalde weefsels, die het vermogen tot dedifferentiatie niet verloren hebben, deelnemen aan het regeneratieproces.

Deze interpretatie is duidelijk minder "optimistisch" dan die van TRAMPUSCH. Laatstgenoemde meende, dat als door het implantaat de bij de bestraling onklaar geraakte schakel was geheeld, de bestraalde weefsels weer volledig in staat waren hun bijdrage tot de regeneratie te leveren. Dit impliceert, dat de cellen van de bestraalde weefsels niet zelf waren aangetast resp. een eventuele beschadiging reversibel was. De na bestraling met 375 of 500 r verkregen regeneraten zijn hier niet mee in overeenstemming. Hier kwam immers de regeneratie wel op gang, maar resulteerde in, vergeleken bij onbestraalde pootstompen, (zeer) inferieure regeneraten.

Naarmate de pootstomp met een hogere dosis is bestraald, wordt de potentiële bijdrage van de bestraalde weefsels kleiner tot zelfs nihil. Dit kan wellicht een tot nu toe onverklaard verschil tussen de bevindingen van TRAMPUSCH (1959a) en UMANSKI (1946) begrijpelijk maken. Beide onderzoekers bestudeerden regeneraten, voortgekomen uit bestraalde pootstompen, waarin onbestraalde poothuid was geïmplanteerd. De eerste, die bestraalde met 1000 r, vond in regeneraten wel spieren; de tweede, die een veel hogere dosis (7000 r) toepaste, nam geregenereerde poten waar met een normaal skelet, maar vrijwel zonder spieren. De regeneraten in het laatste geval kunnen uitsluitend opgebouwd zijn geweest uit blastemacellen, voortgekomen uit de dermis van de geïmplanteerde huid, die volgens UMANSKI (1946) de potentie miste om spieren te vormen; in het eerste geval zouden dan de spieren in het regeneraat toegeschreven kunnen worden aan een bijdrage van de spieren in de bestraalde stomp.

De verschillen van inzicht omtrent de herkomst van regeneraten, ontstaan uit bestraalde pootstompen met een onbestraald implantaat, zijn nu wel te begrijpen. De bijdrage van de weefsels van de bestraalde stomp is afhankelijk van de mate, waarin deze zijn aangetast door de bestraling. SKOWRON en ROGUSKI (1958) LAGAN (1961) en STINSON (1964a, 1964b, 1964c) kunnen ten volle gelijk hebben, wanneer zij de oorsprong van de regeneraten bij hun

experimenten beperkt achten tot het onbestraalde implantaat. Toch kan een regeneraat onder andere experimentele voorwaarden, zoals bij de experimenten van TRAMPUSCH (1951, 1958*b*, 1958*c*, 1959*a*, 1959*b*) even goed een aanzienlijke bijdrage uit de weefsels van de bestraalde stomp ontvangen hebben.

In het eigen onderzoek zijn enkele situaties gebleken, waarbij poten ondanks bestraling met 1000 *r* of meer — dus voldoende om regeneratie alléén bij amputatie te voorkomen — een regeneraat vormden, zonder dat overigens een onbestraald implantaat was aangebracht:

(1) Herhaalde traumatisatie (speldeprikken) van de weefsels in de bodem van de amputatiewond deed met 1500 *r* bestraalde pootstompen regeneraten vormen (proefserie 15XPT, hoofdstuk VIII).

(2) Werd na bestraling van een achterpoot de nervus ischiadicus in het onbestraald gebleven heupgebied doorgesneden, dan ontstond na amputatie een klein regeneraat (proefserie 15XPSZ, hoofdstuk VIII).

(3) Werd voorafgaand aan de amputatie de nervus ischiadicus vrijgeprepareerd en onmiddellijk daarna teruggelegd óf naar de flank gedevieerd (proefserie 10XMZ, 12XMZ, 10XRSX, hoofdstuk VII), dan waren de desbetreffende pootstompen meestal in staat tot de vorming van kleine als poot of tenenplaat te karakteriseren regeneraten.

Ter verklaring van het ontstaan van deze regeneraten, ondanks de vooraf aan de amputatie uitgevoerde bestraling, is het volgende te overwegen:

De door een ingreep veroorzaakte mutilatie, zou mogelijk belangrijk méér cellen van de pootstomp aan de prikkel tot differentiatie blootstellen, dan alleen een amputatie. Bleef bij deze het aantal door dedifferentiatie ontstane blastemacellen te klein om een regeneraat te vormen, de uitbreiding van het gelaedeerde gebied zou hun aantal zodanig kunnen doen toenemen, dat een regeneraat tot stand komt. Een dergelijk effect van een suppletoir trauma kan zich voorgedaan hebben in de experimenten, waarbij een herhaalde traumatisatie was toegepast (situatie 1) of de nervus ischiadicus uit de poot was vrijgeprepareerd (situatie 3). Dat éénzelfde ingreep bij poten, bestraald met 1000 en 1250 *r* (10XMZ, 12XMZ), wél regeneratie tot gevolg heeft, maar niet na bestraling

met 1500 *r* (15XMZ), past volledig in deze gedachtengang: het aantal nog tot dedifferentiatie in staat zijnde cellen is dan zo gering geworden, dat ook uit een vergroot areaal niet genoeg blastemacellen voortkomen.

Ook is de mogelijkheid te overwegen aan denervatie een verstoring van het weefsel-evenwicht te wijten, die de aldaar aanwezige cellen gevoeliger maakt voor veranderingen in hun omstandigheden, teweeggebracht door een amputatie. Dit kan tot gevolg hebben, dat meer cellen tot dedifferentiatie overgaan, waardoor het aantal blastemacellen dienovereenkomstig toeneemt en regeneratie — na reïnnervatie — optreedt. Een onderbreking van de innervatie vindt plaats in de situatie 2 (doorsnijding van de nervus ischiadicus) en de situatie 3 (vrijprepareren van de nervus ischiadicus).

Een andere overweging, eveneens van toepassing op de situaties 2 en 3 is, dat de ter reïnnervatie van het gedenerveerde pootdeel ingegroeide zenuwvezels, het ontstaan van de regeneraten hebben bevorderd. Door een grotere dichtheid van de vezels in de weefsels van de pootstomp zou hun invloed zich sterker kunnen doen gelden dan in een poot, waarvan de innervatie niet was verstoord. Ook de als gevolg van de proximale doorsnijding van de axonen opgewekte extra groei van de neuronen zou in de periferie kunnen leiden tot een bevordering van de regeneratie.

Tenslotte zij de mogelijkheid niet uit het oog verloren, dat potentiële blastemacellen vanuit het heupgebied naar distaal migreren via de voor een deviatie gemaakte incisie (situatie 3) of als begeleiders van de na een proximale doorsnijding van de zenuw opnieuw ingroeiende zenuwvezels (situatie 2). Apicaal aangekomen, zouden deze cellen uit het onbestraalde (situatie 2) óf door de dikte van het lichaam mogelijk minder sterk door de bestraling getroffen heupgebied (situatie 3) het blastema kunnen opbouwen.

Het is dus mogelijk gebleken, een bestraalde pootstomp, die uit zich zelf niet tot regeneratie in staat is, door middel van ingrepen opnieuw te doen regenereren. Men kan in dit gebeuren een herstel zien van een voordien verloren vermogen, hetgeen echter géén herstel van de door bestraling aangetaste cellen hoeft in te houden.

Verder onderzoek zal een nauwkeuriger omschrijving moeten opleveren van de gevolgen van röntgenstralen voor het regeneratievermogen; pas daarna zal een beter inzicht in een herstel van het regeneratievermogen zijn te verwerven.

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 gedisproportioneerd; 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 extremitet 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 begrijpen:

- (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

always showed the same degree of regeneration. Accordingly, the nature of the implant was of no importance.

At first, this result could not be understood. However, the next series of experiments, described in chapter IV, showed that the duration of the contact between the deviated nerve and the implant was of no importance either. Even if this contact had not been established at all, regeneration occurred in the same degree. These combined results clearly demonstrated that the regeneration of the irradiated hindlimb stumps, at least in our experiments, could not be attributed to a recovery of their regeneration capacity, originating from the implant and spreading towards the limb stumps along the nerves.

As a result, it had now to be traced which would be the actual cause of the regeneration phenomena observed (chapter V). From these investigations the importance of two facts became evident. In the first place, the routine method of X-irradiation used since 1958, proved to be inadequate to subdue fully the regeneration capacity of the limbs. In addition, some results indicated that manipulating the sciatic nerve as such, exerted a stimulating effect on the regeneration processes.

Since HARREBOMÉE, in her experiment, used the same type of routine irradiation and also performed a deviation of the sciatic nerve, it is highly probable that the regeneration of the irradiated hindlimb stumps she observed, must be attributed as well to an insufficient dose of X-rays and, simultaneously, to the manipulation with the nerve. The misconception about the effect of the routine irradiation on the regeneration capacity of the limbs, clearly demonstrated here, could be attributed to an insufficiently controlled change in the method of irradiation introduced in 1958.

The investigations were continued, using a modified method of irradiation. Firstly, the effects of increasing doses of X-rays on the regeneration capacity were studied (chapter VI). The application of a dose of 375 *r*, one week before the amputation through the stylopodium, resulted in the regeneration of limbs which, however, were characterized by the proximal parts of the limbs being shorter than normal. After a dose of 500 *r* only small anomalous feet developed, connected directly to the stumps. When doses of 625 and 750 *r* were applied, still some regenerates with toes developed, but usually only flattened blastemata or epidermal outgrowths occurred. Limb stumps which had been treated with doses of 875

till 1500 *r* never developed regenerates exceeding epidermal outgrowths.

Manipulating the sciatic nerve proved to stimulate the regeneration of limb stumps also in cases which had been adequately irradiated in the modified way (chapter VII). The effect of the manipulation proved to be dependent on the dose of X-rays applied. Following the application of 1000 and 1250 *r*, regenerates were formed, instead of epidermal outgrowths, the former to be characterized as limbs or toeplates. After the application of a dose of 1500 *r*, manipulations with the sciatic nerve did not result in the development of regenerates other than epidermal outgrowths. The same results could be observed, if the sciatic nerve was deviated to a limb-forming implant in the side. This confirms our above explanation concerning the observation of HARREBOMÉE.

Since the conclusion could now be made that there is no longer any reason to believe that the regeneration phenomena observed are due to the presence of a recovery promoting influence, originating from elsewhere and reaching the irradiated limb stumps by nervous pathways, the original questions underlying the present study can no longer be considered as relevant.

In 1958 VERGROESEN developed the view that X-rays might well disturb the trophic function of the nerves which is indispensable to the normal regeneration of limbs. According to this author, irradiated left limb stumps were capable of regeneration, if their sciatic nerve had been protected from irradiation, unlike the contra-lateral stumps, the sciatic nerve of which had been treated in the same way, but also irradiated.

In our experiments (chapter VIII) the operative procedure itself was shown to be responsible for the regeneration of irradiated stumps, whether or not the sciatic nerve had been exposed to irradiation. An explanation for VERGROESEN's results might well be that the trauma of the operation on the left side was constantly more extensive than that on the right. Due to this fact, larger regenerates may have developed on the left side, whereas—at the end of the experiment—the regenerates on the right side may still have been too poorly developed to be recognized. The conclusion drawn here, must be that there is no disturbance of some trophic function of the nerves, due to irradiation. As a result, the supposition that the trophic function of irradiated axones would recover (VERWOERD 1963) was, in fact, incorrect. It was based on the

observation of regenerates in instances which actually show phenomena of regeneration, the occurrence of which can be fully explained from the use of an insufficient method of routine irradiation.

In addition, it was shown that repeated traumatisation of the site of amputation or intersection of the sciatic nerve at the level of the non-irradiated lumbosacral region, one week prior to amputation, allowed irradiated stumps to develop major regenerates.

The new data obtained, lead to the following conclusions:

(1) TRAMPUSCH's hypothesis, according to which the nerves might play an important intervening role in the recovery of the regeneration capacity of irradiated limbs, was based on the results of experiments of HARREBOMÉE, VERGROESEN and VERWOERD, the interpretation of which must now be changed in such a way that they can no longer be considered as supporting this hypothesis.

(2) The results presented here are in accordance with the view that the application of increasing doses of X-rays is associated directly with a decreasing number of cells in the limb stump capable of participating in the process of regeneration. In addition, the results suggest that X-rays affect the capacity of the cells in the stumps to dedifferentiate into blastemal cells, from which a regenerate can develop. Beyond a certain dose of X-rays, the number of irradiated cells which are still capable of dedifferentiation, will probably be so small that only epidermal outgrowths can develop.

(3) If non-irradiated limb tissues have been implanted into an irradiated limb and the amputation is performed through the level of the implant, a limblike regenerate will be formed. According to TRAMPUSCH, the irradiated cells in this case, make a major contribution to this regenerate; these cells would have regained their regeneration capacity. STINSON a.o. deny the possibility that cells originating from the irradiated tissues are able to participate, i.e. they deny the possibility of recovery. This disagreement may be understood when the fact is taken into account that the degree of participation of irradiated cells may be greatly dependent on the dose of X-rays applied.

(4) The development of regenerates from irradiated limb stumps in cases where, prior to amputation, the sciatic nerve has been dissected from the foot to the non-irradiated lumbosacral region, or has been intersected at the base of the limb, or where the

amputation wound has been repeatedly traumatised, may be explained in the following ways:

- (a) The larger injuries produced here, may have resulted in more blastemal cells coming available than is the case after an amputation only.
 - (b) The "tendency" of the tissues to produce potential blastema cells may be increased by the temporary state of denervation.
 - (c) The re-innervation, occurring after the denervation, may have a regeneration promoting influence; this might be due to either a greater density of the new nerve-fibers or to an increased metabolism of the neurones.
 - (d) Potential blastemal cells may migrate from the non-irradiated lumbosacral region towards the apex of the stump, either through the longitudinal wound or guided by the growing nerve-fibers.
- (5) So far there has been no immediate evidence that cells in the limb stump, if damaged by X-rays, are actually able to recover.

Finally it should be stated that there are still many precise data concerning the effects of X-irradiation on the regeneration capacity to be gathered, before the investigations in the field of the recovery of this capacity can be fruitfully continued.

LIJST VAN GERAADPEGDE LITERATUUR

- ANTON, H. J., Zur Frage der Aktivierung der Gewebe im Extremitätenstumpf bei Urodelen vor der Blastembildung, *Roux Arch. Entw. Mech.*, 153 (1961) 363-369.
- BALINSKY, B. I., *An Introduction to Embryology*, Saunders, London, 1965, pp. 587-616.
- BARDEEN, C. R., en BAETJER, F. H., The inhibitive action of the Roentgen rays on regeneration in planarians, *J. Exp. Zool.*, 1 (1904) 191-195.
- BOTH, N. J. DE, Enhancement of the self-differentiation capacity of the early limb blastema by various experimental procedures. In V. KIORTSIS en H. A. L. TRAMPUSCH (Eds.), *Regeneration in Animals and Related Problems*, North-Holland Publ., Amsterdam, 1965, pp. 420-426.
- BRUNST, V. V., Influence of X-rays on limb regeneration in urodele Amphibians, *Quart. Rev. Biol.*, 25 (1950) 1-29.
- BRUNST, V. V., en SCHEREMETJEWA, E. A., Untersuchung des Einflusses von Röntgenstrahlen auf die Regeneration der Extremitäten beim Triton. I. Beobachtungen der Regeneration der Extremitäten beim Triton nach Bestrahlung mit verschiedenen Dosen von Röntgenstrahlen, *Roux Arch. Entw. Mech.*, 128 (1933) 181-215.
- BUTLER, E. G., X-radiation and regeneration in Amblystoma, *Science*, 74 (1931) 100-101.
- BUTLER, E. G., The effects of X-radiation on the regeneration of the fore limb of Amblystoma larvae, *J. Exp. Zool.*, 65 (1933) 271-316.
- BUTLER, E. G., Studies on limb regeneration in X-rayed Amblystoma larvae, *Anat. Rec.*, 62 (1935) 295-307.
- BUTLER, E. G., en PUCKETT, W. O., Studies on cellular interaction during limb regeneration in Amblystoma, *J. Exp. Zool.*, 84 (1940) 223-239.
- BUTLER, E. G., en SCHOTTÉ, O. E., Histological alterations in denervated non-regenerating limbs of urodele larvae, *J. Exp. Zool.*, 88 (1941) 307-341.
- BUTLER, E. G., en O'BRIEN, J. P., Effects of localized X-radiation on regeneration of the urodele limb, *Anat. Rec.*, 84 (1942) 407-413.
- CHALKLEY, D. T., A quantitative histological analysis of forelimb regeneration in *Triturus viridescens*, *J. Morph.*, 94 (1954) 21-70.
- CURTIS, W. C., Effects of X-rays and radium upon regeneration. In B. M. SUGGAR (Ed.), *Biological Effects of Radiation*, Graw Hill Book, New York, 1936, pp. 441-457.
- FABER, J., Autonomous morphogenetic activities of the amphibian regeneration blastema. In V. KIORTSIS en H. A. L. TRAMPUSCH (Eds.), *Regeneration in Animals and Related Problems*, North-Holland Publ., Amsterdam, 1965, pp. 404-419.
- GODLEWSKI, E., Untersuchungen über Auslösung und Hemmung der Regeneration beim Axolotl, *Roux Arch. Entw. Mech.*, 114 (1929) 108-143.
- Goss, R. J., The effect of partial irradiation on the morphogenesis of limb regenerates, *J. Morph.*, 101 (1957) 131-148.
- Goss, R. J., Regeneration of Vertebrate Appendages. In M. ABERCROMBIE en J. BRACHET (Eds.), *Advances in Morphogenesis vol. 1*, Academic Press, New York, 1961, pp. 103-152.
- GUYÉNOT, E., en VALLETTE, M., Régénération du nez et de la machoire supérieure chez les Urodèles, *C. R. Soc. Biol.*, 93 (1925) 1276-1278.
- GUYÉNOT, E., en PONSE, K., Territoires de régénération et transplantations, *Bull. Biol.*, 64 (1930) 251-287.
- HADORN, E., en CHEN, P. S., Beobachtungen über die Wanderung der Leydigischen Drüsenzellen bei Regenerationsvorgängen in der Larvenhaut von Triton alpestris, *Roux Arch. Entw. Mech.*, 146 (1953) 515-536.
- HALL, A. B., en SCHOTTÉ, O. E., Effects of hypophysectomies upon the initiation of regenerative processes in the limb of *Triturus viridescens*, *J. Exp. Zool.*, 118 (1951) 363-387.
- HAY, E. D., en FISCHMAN, D. A., Origin of the blastema in regenerating limbs of the newt *Triturus viridescens*. An autoradiographic study using Tritiated Thymidine to follow cell proliferation and migration, *Develop. Biol.*, 3 (1961) 26-59.
- HAY, E. D., Cytological studies of dedifferentiation and differentiation in regenerating amphibian limbs. In D. RUDNICK (Ed.), *Regeneration Symp. of the Soc. for the Study of Develop and Growth*, Ronald Press, New York, 1962, pp. 177-210.
- HORN, E. C., An analysis of neutron and X-ray effects on regeneration of the fore limb of larval Amblystoma, *J. Morph.*, 71 (1942) 185-220.
- KIORTSIS, V., Discussion, LAZARD, 1965. In V. KIORTSIS en H. A. L. TRAMPUSCH (Eds.), *Regeneration in Animals and Related Problems*, North-Holland Publ., Amsterdam, 1965, p. 403.
- KIORTSIS, V., en TRAMPUSCH, H. A. L., *Regeneration in Animals and Related Problems*, North-Holland Publ., Amsterdam, 1965.
- LAGAN, M., Regeneration from implanted dissociated cells. II. Regenerates produced by dissociated cells derived from different organs, *Folia Biol.*, 9 (1961) 3-26.
- LAZARD, L., Influence des greffes homologues et hétérologues sur la morphologie des régénérats de membres chez Amblystoma punctatum, *C. R. Acad. Sci.*, 249 (1959) 468-469.
- LAZARD, L., Régénération de membres chez l'axolotl à partir de greffes embryonnaires. In V. KIORTSIS en H. A. L. TRAMPUSCH (Eds.), *Regeneration in Animals and Related Problems*, North-Holland Publ., Amsterdam, 1965, pp. 396-403.
- LITSCHKO, E. J., Beobachtungen über die Regeneration der Extremitäten beim Axolotl nach Einwirkung von Röntgenstrahlen (russ.), *Doklady Akad. Nank. U.S.S.R.*, 1930, uitvoerig gerefereerd in: BRUNST en SCHEREMETJEWA, 1933.
- LOCATELLI, P., Der Einfluss des Nervensystems auf die Regeneration, *Roux Arch. Entw. Mech.*, 114 (1929) 686-770.
- NEEDHAM, A. E., *Regeneration and Wound-Healing*, Methuen, London, 1952.

- POLEZHAEV, L. W., On the mode of restauration of regeneration power in the limb of tailed amphibians, *C. R. Acad. Sci. U.S.S.R.*, 22 (1939) 648-652.
- POLEZHAEV, L. W., en FAWORINA, W. N., Über die Rolle des Epithels in dem Anfänglichen Entwicklungsstadien einer Regenerationsanlage der Extremität beim Axolotl, *Roux Arch. Entw. Mech.*, 133 (1935) 701-727.
- POLITZER, G., titel onbekend, *Radiol. Austriaca*, 5 (1952) 147, geciteerd in Goss, 1961.
- PUCKETT, W. O., The effects of X-radiation on limb development in Amblystoma, *Anat. Rec.*, 58 suppl. (1934) 32-33.
- PUCKETT, W. O., The effects of X-radiation on limb development and regeneration in Amblystoma, *J. Morph.*, 59 (1936) 173-214.
- RICHARDSON, D., Thyroid and pituitary hormones in relation to regeneration. II. Regeneration of the hind leg of the newt, *Triturus viridescens*, with different combinations of thyroid and pituitary hormones, *J. Exp. Zool.*, 100 (1945) 417-429.
- ROSE, S. M., The role of nerves in amphibian limb regeneration, *Ann. New York Acad. Sci.*, 49 (1948) 818-833.
- ROSE, S. M., Regeneration. In J. A. MOORE (Ed.), *Physiology of the Amphibia*, Academic Press, New York, 1964, pp. 545-606.
- SCHAPER, A., Experimentelle Untersuchungen über den Einfluss der Radiumstrahlen und der Radiumemanation auf embryonale und regenerative Entwicklungsvorgänge, *Anat. Anz.*, 25 (1904) 298-314 en 328-337.
- SCHEREMETJEWA, E. A., en BRUNST, V. V., Untersuchung des Einflusses von Röntgenstrahlen auf die Regeneration des Schwanzes bei den Kaulquappen von *Pelobates fuscus*, *Roux Arch. Entw. Mech.*, 130 (1933) 771-791.
- SCHEREMETJEWA, E. A., en BRUNST, V. V., Preservation of the regeneration capacity in the middle part of the limb of newt and its simultaneous-loss in the distal and proximal parts of the same limb, *Bull. Biol. Med. Exp. (Moscow)*, 6 (1938) 723-724, geciteerd in BRUNST, 1950.
- SCHOTTÉ, O. E., Systeme nerveux et régénération chez le Triton, *Revue Suisse Zool.*, 33 (1926) 1-211.
- SCHOTTÉ, O. E., The origin and morphogenetic potencies of regenerates, *Growth*, suppl. (1939) 59-76.
- SCHOTTÉ, O. E., en BUTLER, E. G., Morphological effects of denervation and amputations of limbs in urodele larvae, *J. Exp. Zool.*, 87 (1941) 279-322.
- SINGER, M., The Nervous System and Regeneration of the Forelimb of adult *Triturus*. V. The influence of number of nerve fibers, including a quantitative study of limb innervation, *J. Exp. Zool.*, 101 (1946) 299-338.
- SINGER, M., The Nervous System and Regeneration of the Forelimb of adult *Triturus*. VI. A further study of the importance of nerve number,

- including quantitative measurements of limb innervation per mm², *J. Exp. Zool.*, 104 (1947a) 233-250.
- SINGER, M., The Nervous System and Regeneration of the Forelimb of adult *Triturus*. VII. The relation between number of nerve fibers and surface area of amputation, *J. Exp. Zool.*, 104 (1947b) 251-265.
- SINGER, M., The influence of the nerve in regeneration of the amphibian extremity, *Quart. Rev. Biol.*, 27 (1952) 169-200.
- SINGER, M., The trophic quality of the neuron: some theoretical considerations. In M. SINGER en J. P. SCHADÉ (Eds.), *Progress in Brain Research Vol. 13*, Elsevier, Amsterdam, 1964, pp. 228-232.
- SINGER, M., A theory of the trophic nervous control of amphibian limb regeneration, including a re-evaluation of quantitative nerve requirements. In V. KIORTSIS en H. A. L. TRAMPUSCH (Eds.), *Regeneration in Animals and Related Problems*, North-Holland Publ., Amsterdam, 1965, pp. 20-32.
- SINGER, M., RAY, E. K., en PEADON, A., Regional growth differences in the early regenerate of the adult newt, *Triturus viridescens*, correlated with the position of the larger nerves, *Folia Biol.*, 12 (1964) 347-362.
- SKOWRON, S., en ROGUSKI, H., Regeneration from implanted dissociated cells. I. Regenerative potentialities of limb- and tail cells, *Folia Biol.*, 6 (1958) 163-173.
- SPALLANZANI, L., *Prodomo di un' opera da imprimeresi sopra la riproduzione animali*, Modena, 1768.
- STEEN, T. P., en THORNTON, C. S., Tissue interaction in amputated aneurogenic limbs of *Ambystoma* larvae, *J. Exp. Zool.*, 154 (1963) 207-221.
- STINSON, B. D., The response of X-irradiated limbs of adult urodeles to normal tissue grafts. I. Effects of autografts of sixty day fore-arm regenerates, *J. Exp. Zool.*, 153 (1963) 37-52.
- STINSON, B. D., The response of X-irradiated limbs of adult urodeles to normal tissue grafts. II. Effects of autografts of anterior or posterior halves of sixty days fore-arm regenerates, *J. Exp. Zool.*, 155 (1964a) 1-24.
- STINSON, B. D., The response of X-irradiated limbs of adult urodeles to normal tissue grafts. III. Comparative effects of autografts of complete fore-arm regenerates and longitudinal half fore-arm regenerates, *J. Exp. Zool.*, 156 (1964b) 1-18.
- STINSON, B. D., The response of X-irradiated limbs of adult urodeles to normal tissue grafts. IV. Comparative effects of autografts and homografts of complete fore-arm regenerates, *J. Exp. Zool.*, 157 (1964c) 159-178.
- THORNTON, C. S., Studies on the origin of the regeneration blastema in *Triturus viridescens*, *J. Exp. Zool.*, 89 (1942) 375-390.
- THORNTON, C. S., The relation of epidermal innervation to limb regeneration in *Amblystoma* larvae, *J. Exp. Zool.*, 127 (1954) 577-601.
- THORNTON, C. S., Influence of an eccentric epidermal cap on limb regeneration in *Amblystoma* larvae, *Devel. Biol.*, 2 (1960) 551-569.

- THORNTON, C. S., en STEEN, T. P., Eccentric blastema formation in aneurogenic limbs of Ambystoma larvae following epidermal cap deviation, *Devel. Biol.*, 5 (1962) 328-343.
- THORNTON, C. S., Influence of the woundskin on blastemal cell aggregation. In V. KIORTSIS en H. A. L. TRAMPUSCH (Eds.), *Regeneration in Animals and Related Problems*, North-Holland Publ., Amsterdam, 1965, pp. 333-340.
- TRAMPUSCH, H. A. L., Regeneration inhibited by X-rays and its recovery, *Proc. Kon. Ned. Acad. Wet., ser. C*, 54 (1951) 3-15.
- TRAMPUSCH, H. A. L., Het effect van röntgenstralen op het regeneratievermogen, *Ned. T. v. Geneesk.*, 101 (1957) 605.
- TRAMPUSCH, H. A. L., Het effect van röntgenstralen op het morphogenetisch veld, *Ned. T. v. Geneesk.*, 102 (1958a) 1624.
- TRAMPUSCH, H. A. L., The action of X-rays on the morphogenetic field. I. Heterotopic grafts on irradiated limbs, *Proc. Kon. Ned. Acad. Wet., ser. C*, 61 (1958b) 417-430.
- TRAMPUSCH, H. A. L., The action of X-rays on the morphogenetic field. II. Heterotopic skin on irradiated tails, *Proc. Kon. Ned. Acad. Wet., ser. C*, 61 (1958c) 530-545.
- TRAMPUSCH, H. A. L., The effect of X-rays on regenerative capacity. In C. S. THORNTON (Ed.), *Regeneration in Vertebrates*, Univ. Chicago Press, Chicago, 1959a, pp. 83-98.
- TRAMPUSCH, H. A. L., Nieuwe proeven omtrent het effect van röntgenstralen op het morphogenetisch veld, *Ned. T. v. Geneesk.*, 103 (1959b) 695.
- TRAMPUSCH, H. A. L., The morphogenetic field during regeneration, *Arch. Neerl. de Zool.*, 15 (1963) 361-362.
- TRAMPUSCH, H. A. L., Nerves as morphogenetic mediators in regeneration. In M. SINGER en J. P. SCHADÉ (Eds.), *Progress in Brain Research Vol. 13*, Elsevier, Amsterdam, 1964a, pp. 214-227.
- TRAMPUSCH, H. A. L., Effect of irradiation on peripheral nerves, *Int. J. Rad. Biol.*, 9 (1965) 593.
- TRAMPUSCH, H. A. L., The skin-nerve interaction as a "pace-maker" of regeneration, *Acta Morph. Neerl. Skand.*, 6 (1966) 101.
- TRAMPUSCH, H. A. L., en HARREBOMÉE, A. E., Dedifferentiation a prerequisite of regeneration. In V. KIORTSIS en H. A. L. TRAMPUSCH (Eds.), *Regeneration in Animals and Related Problems*, North-Holland Publ., Amsterdam, 1965a, pp. 341-376.
- TRAMPUSCH, H. A. L., en HARREBOMÉE, A. E., Wat belemmert de regeneratie van bestraalde extremiteiten?, *Ned. T. v. Geneesk.*, 109 (1965b) 1849.
- TRAMPUSCH, H. A. L., HARREBOMÉE, A. E., en VERWOERD, C. D. A., Morphogenetische interrelatie tijdens de regeneratie, *Ned. T. v. Geneesk.*, 107 (1963) 2258.
- UMANSKI, E., Untersuchung des Regenerationsvorganges bei Amphibien mittels Ausschaltung der einzelnen Gewebe durch Röntgenstrahlen (russ.), *Biologicheskyy Zhurnal*, 6 (1937) 739-756, duitse samenvatting: 757-758.

- UMANSKI, E., Regenerative potencies of the skin of limb and tail in Ambystoma, *C. R. de l'Acad. des Sciences de l'USSR*, 51 (1946) 475-476.
- VERGROESEN, A. J., Het aandeel van de zenuwen tijdens de regeneratie van bestraalde ledematen bij Amphibia, *Ned. T. v. Geneesk.*, 102 (1958) 1624.
- VERWOERD, C. D. A., Regeneration dependent on nerves, *Arch. Neerl. de Zool.*, 15 (1963) 364-365.
- WEISS, P., *Principles of development*, Holt, New York, 1939.
- YNTEMA, C. L., Regeneration in sparsely innervated and aneurogenic forelimbs of Ambystoma larvae, *J. Exp. Zool.*, 140 (1959) 101-124.

STELLINGEN

I

De groei-anomaliën van de schedel, die bij kaak- en gehemelte-spleten voorkomen, zijn secundair van aard.

II

Bij een geleidings-hardhorendheid op jeugdige leeftijd dient de aangezichtsschedel nauwkeurig te worden onderzocht.

III

Bij een tomografisch onderzoek van tumoren in de neusholte is het aangewezen tevoren de slijmvliezen van de neus af te slinken.

IV

De mogelijkheden tot locale proteïne-synthese worden bij onderzoeken over het voorkomen van eiwitten in axonen te weinig onderkend.

R. LASEK, *Brain Research*, 7 (1968) 360-377.

V

De cellen van de membrana synovialis produceren het hyaluron-zuur in de synovia.

VI

Myoblasten zijn, ook na begonnen differentiatie van myofibrillen, nog tot mitose in staat.

VII

Aangezien er tussen twee cyclische processen met gelijke periode-duur altijd een correlatie bestaat, mag aan deze correlatie slechts in speciale gevallen een functionele betekenis worden toegekend.

B. K. S. DIJKSTRA, *J. Nat. Canc. Inst.*, 31 (1963) 511-519.

VIII

Veranderingen van de hoeveelheid aan nucleair desoxyribonucleïnezuur gebonden kleurstof, gemeten met behulp van de fotometrische methode van LISON, mogen niet zonder meer worden toegeschreven aan kwantitatieve veranderingen van het desoxyribonucleïnezuur.

IX

Een integratie van de verschillende opleidingen in E.H.B.O. zal het onderricht hierin en ook de vrije tijd van de arts-docenten ten goede komen.