

TRANSPLANTATIE
VAN PERIFERE ZENUWEN

Een onderzoek naar de immunogeniciteit
van perifeer zenuwweefsel

Het werk beschreven in dit proefschrift werd uitgevoerd in het Radiobiologisch Instituut TNO te Rijswijk, in samenwerking met de afdeling Neurochirurgie van het Academisch Ziekenhuis Leiden en de afdeling Heelkunde van het Academisch Ziekenhuis Rotterdam.

TRANSPLANTATIE VAN PERIFERE ZENUWEN

EEN ONDERZOEK NAAR DE IMMUNOGENICITEIT
VAN PERIFEER ZENUWWEEFSEL

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR
IN DE GENEESKUNDE AAN DE ERASMUS UNIVERSI-
TEIT TE ROTTERDAM OP GEZAG VAN DE RECTOR
MAGNIFICUS PROF. DR. B. LEIJNSE EN VOLGENS
BESLUIT VAN HET COLLEGE VAN DEKANEN. DE
OPENBARE VERDEDIGING ZAL PLAATS VINDEN OP
VRIJDAG 23 JUNI 1978 DES NAMIDDAGS TE 4.15 UUR
PRECIES

DOOR

BERTUS DIRK VERHOOG

geboren te 's-Gravenhage

1978

W.D. MEINEMA B.V. – DELFT

PROMOTOR: PROF. DR. D.W. VAN BEKKUM
CO-REFERENTEN: PROF. DR. S.A. DE LANGE
PROF. DR. C.F. HOLLANDER

Aan mijn ouders
Aan Ietje en Clarine

INHOUD

HOOFDSTUK I	Inleiding	9
	1.1. Uitgangspunten van het onderzoek	9
	1.2. Literatuuronderzoek en overzicht van de huidige stand van zaken	9
	1.2.1. Indeling in tijdperken	9
HOOFDSTUK II	Synopsis van anatomie, regeneratie en zenuwhechting	15
	2.1. Anatomie	15
	2.1.1. Inleiding	15
	2.1.2. Het neuron	15
	2.1.3. De neuromusculaire synaps	18
	2.1.4. De sensibele eindlichaampjes	18
	2.1.5. De vascularisatie	18
	2.2. Regeneratie	19
	2.2.1. Inleiding	19
	2.2.2. Het cellichaam en de kern van het neuron	19
	2.2.3. De proximale stomp van het axon	20
	2.2.4. De distale stomp en het distale deel van de zenuw	20
	2.2.5. De eindlichaampjes	21
	2.3. De zenuwhechting	22
	2.3.1. Inleiding	22
	2.3.2. Doorsnijding	22
	2.3.3. Hechtmateriaal	22
	2.3.4. Operatiemicroscop	22
	2.3.5. Perineurale hechting	22
	2.3.6. Omhulling	22
HOOFDSTUK III	Transplantatie immunologie	25
	3.1. Inleiding	25
	3.2. Het Major Histocompatibility Complex	25
	3.3. Transplantatieantigenen	26
	3.4. Human Leukocyte Antigens	27
	3.4.1. Het SD determinanten systeem	27
	3.4.2. Het LD determinanten systeem	27
	3.5. De transplantatiereactie	28
	3.5.1. De cellulaire afstoting	29
	3.5.2. De humorale afstoting	30
	3.6. Immunosuppressie	30
	3.6.1. Inleiding	30
	3.6.2. De farmacologische immunosuppressie	30

	3.6.3. De biologische immunosuppressie door antilymfocytenglobuline (ALG)	32
	3.7. Kanker als complicatie van klinische transplantatie	32
HOOFDSTUK IV	Immunologische experimenten	35
	4.1. Probleemstelling	35
	4.2. Materiaal en methoden	36
	4.2.1. Proefdieren	36
	4.2.2. Het prepareren van het transplantaat en de implantatie onder het nierkapsel	36
	4.2.3. Beoordeling	37
	4.2.4. Resultaten	37
	4.2.5. Conclusie	39
	4.3. Immunisatie experimenten	39
	4.3.1. Probleemstelling	39
	4.3.2. Methode van onderzoek bij de immunisatie studies	40
	4.3.3. Resultaten van de immunisatieexperimenten	41
	4.3.4. Conclusies	45
	4.4. Antilichaamvorming na immunisatie met perifere zenuwstelsel	45
	4.4.1. Probleemstelling	45
	4.4.2. Materiaal en methoden	45
	4.4.3. Resultaten en conclusies	45
	4.5. Het effect van immunosuppressiva op de overleving van zenuwtransplantaten	46
	4.5.1. Probleemstelling	46
	4.5.2. Materiaal en methoden	46
	4.5.3. Resultaten	48
	4.5.4. Conclusies	49
HOOFDSTUK V	Conserveringsexperimenten met perifere zenuwtransplantaten	53
	5.1. Probleemstelling	53
	5.1.1. Cryopreservatie	53
	5.1.2. Radioactieve bestraling	54
	5.1.3. Conservering met cialit	54
	5.1.4. Lyophilisatie	54
	5.2. Methoden van onderzoek	55
	5.2.1. Methode van onderzoek bij de experimenten met conserveringsvloeistoffen, bij verschillende conserveringstemperaturen en met radioactieve bestraling	55

5.2.2.	Methodie van onderzoek bij de experimenten met gelyophiliseerde allogene zenuwtransplantaten	56
5.3.	Resultaten	56
5.3.1.	Beoordelingscriteria	56
5.3.2.	Cryopreservatie	57
5.4.	Conclusies	60
HOOFDSTUK VI	Orthotope zenuwtransplantatie bij de rat	63
6.1.	Probleemstelling	63
6.2.	Materiaal en methoden	63
6.3.	Experimenten	65
6.4.	Resultaten	65
6.5.	Conclusies	66
HOOFDSTUK VII	Zenuwtransplantatie bij de aap	69
7.1.	Probleemstelling	69
7.2.	Materiaal en methoden	69
7.3.	Electrofysiologisch onderzoek	70
7.3.1.	Apparatuur	70
7.3.2.	Aanbrengen van elektroden	70
7.3.3.	De geleidingssnelheidsmetingen	72
7.3.4.	Beoordelingscriteria	72
7.4.	Resultaten van de orthotope zenuwtransplantatie bij apen	72
7.4.1.	Electrofysiologisch onderzoek	72
7.4.2.	Histologisch onderzoek	73
7.4.3.	Beschrijving van de histologische preparaten	73
7.5.	Bespreking van resultaten	76
7.6.	Conclusies	77
HOOFDSTUK VIII	Algemene discussie	79
SAMENVATTING		83
SUMMARY		85
DANKBETUIGINGEN		87
LITERATUURLIJST		89
CURRICULUM VITAE		96

HOOFDSTUK I

INLEIDING

1.1. Uitgangspunten van het onderzoek

Indien gebruik kan worden gemaakt van autotransplantaten zijn de technische mogelijkheden voor het overbruggen van defecten in perifere zenuwen goed te noemen, met name sinds de introductie van de microchirurgie. Indien autotransplantaten onvoldoende beschikbaar zijn, moet uitgezien worden naar een bruikbaar substituuut, zoals allotransplantaten, xenotransplantaten en eventueel kunststoftransplantaten. Hoewel perifeer zenuwweefsel algemeen als zwak-, of geheel niet-immunogeen wordt beschouwd, mislukken allotransplantaten allemaal, zeer waarschijnlijk door afstoting van het transplantaat (Davis en Ruge, 1950; Seddon, 1969). Dit is de reden waarom in dit proefschrift een onderzoek wordt ingesteld naar de immunogeniciteit van perifeer zenuwweefsel. Dit kon worden getest met vrije transplantaten van perifere zenuwen en daaruit bleek inderdaad dat perifere zenuwen immunogeen zijn. Uit deze experimenten vloeide een onderzoek naar het verminderen of te niet doen van de immunogeniciteit voort. Dergelijke bewerkingen maken het veelal nodig om het transplantaat enige tijd te bewaren. Om die reden werd ook een onderzoek naar conserveermethoden voor perifere zenuwtransplantaten ingesteld. De gegevens die uit de resultaten van deze experimenten verzameld werden, konden worden getoetst in orthotope transplantaties bij ratten en apen. In de algemene discussie worden de verkregen resultaten van commentaar voorzien en vergeleken met opvattingen van anderen. Hiermee wordt het experimentele gedeelte afgesloten.

Aan dit experimentele gedeelte gaat een aantal inleidingen vooraf; een literatuuroverzicht, een synopsis betreffende de anatomie en regeneratie van perifere zenuwen, een beschrijving van de orthotope zenuwtransplantatietechniek en de terminologie van enkele begrippen uit de transplantatieimmunologie.

1.2. Literatuuronderzoek en overzicht van de huidige stand van zaken

1.2.1. Indeling in tijdperken

In de literatuur betreffende perifere zenuwtransplantaties zijn twee tijdperken te onderscheiden, namelijk de perioden voor en na de bewustwording van de immunologische verschillen tussen auto- en allotransplantaten. De grens tussen deze tijdperken wordt gevormd door het artikel van Seddon en Holmes (1944) en het artikel van Barnes in 1946. Deze auteurs realiseerden zich dat het verschil tussen het slagen en falen van het transplantaat niet alleen veroorzaakt wordt door het verschil in bloedgroepen tussen donor en ontvanger, maar door iets dat zij, in navolging van Medawar (1944), een actieve verworven immuniteit noemden, hetgeen nu bekend is als de transplantatiereactie.

1.2.1.a HET TIJDPERK VAN 1870 TOT 1946

Phillipeaux en Vulpian probeerden in 1870 een deel van het centrale zenuwstelsel van de hond, namelijk de nervus opticus als zenuwautotransplantaat te gebruiken. Deze pogingen mislukten maar de autotransplantaties van de nervus lingualis naar de nervus hypoglossus slaagden. Van deze eerste succesvolle autotransplantatie van perifere zenuwen gaven zij een beschrijving. De eerste autotransplantaties van een kabelzenuw bij de hond werden in 1920 door Huber beschreven. Hij transplanteerde delen van de dunne nervus cutaneus radialis op de plaats van een defect in de nervus ischiadicus bij 17 honden en constateerde functioneel en histologisch herstel. Hij merkte op dat er verschil was in de structuurveranderingen die optraden tussen auto-, allo- en xenotransplantaten (maar dat 'hij zich daar toen niet mee bezig wilde houden'). Eveneens in 1920 adviseerde de Engelse Medical Research Council: 'nerve grafts should only be adopted as a substitute for end to end suture in those very rare instances where it is absolutely impossible to bring about direct approximation' (citaat in Barnes, 1946). Barnes bevestigde dit in 1946 bij acht patiënten met een perifere zenuwlotransplantaat. Het was in alle acht gevallen een totale mislukking. De onderzoeker zag in deze mislukkingen twee uitdagingen. Ten eerste, de uitdaging om meer bewijsmateriaal te vinden om het gebruik van perifere zenuwlotransplantaten af te raden. Ten tweede, kennis te verzamelen welke zou helpen de onvermijdelijke mislukking te begrijpen. Dit is een noodzakelijke aanloop om de factoren die voor het mislukken verantwoordelijk zijn te neutraliseren of uit de weg te ruimen. Bovendien merkte Barnes op dat het waarschijnlijk is dat het zenuwlotransplantaat, evenals het huidallotransplantaat, een 'ontstekingsreactie' uitlokte. Hiermee werd een nieuw tijdperk ingeleid.

1.2.1b HET TIJDPERK NA 1946

Sinds het onderkennen van de transplantatiereactie is men hiermee bij het verdere onderzoek rekening gaan houden. Ter onderdrukking van deze reactie kan de ontvanger met immunosuppressieve middelen worden behandeld. Deze behandeling is nogal ingrijpend omdat de patiënt tevens een verlaagde weerstand krijgt tegen bacteriële en virale besmetting. Bovendien toonde Penn (1977) aan dat bij niertransplantatiepatiënten, welke met immunosuppressieve middelen werden behandeld, de kans op het tot ontwikkeling komen van maligne tumoren 100 maal groter was dan in een vergelijkbare bevolkingsgroep. Eén groep van de meest toegepaste immunosuppressiva, de corticosteroïden, brengt als bijwerking geestelijke en lichamelijke veranderingen teweeg. Deze bijwerking kennen wij als het syndroom van Cushing. Omdat uitval van één of meer perifere zenuwen minder erg is dan de bijwerkingen van de immunosuppressieve middelen, is deze vorm van ontvangerbehandeling niet aanvaardbaar voor klinische toepassing. Andere mogelijkheden om de transplantatiereactie na perifere zenuwtransplantatie te beperken zijn o.m.:

A. Het omhullen van de zenuwnaden en van het transplantaat

Campbell dacht in 1964 de cellulaire afstotingsreactie te kunnen beperken door gebruik te maken van millipore, een poreus materiaal met porieën van 0,45 micron. Hierdoor konden cellen het transplantaat niet bereiken, de extracellulaire vloeistof wel, zodat goede voedingsomstandigheden werden gewaarborgd. Later werd deze methode verlaten omdat bleek dat millipore na transplantatie binnen enige maanden in het weefsel verbrokkelt. Om toch een effectieve en niet-antigene omhulling te verkrijgen gebruikten Hirasawa en Marmor in 1967 autogene vene, met het doel de afstoting van xenotransplantaten te beperken. Zij gaven toe dat de barrière incompleet was en de eventuele verbetering aan de ondersteuning van de hechtplaats toegeschreven moest worden, zodat de argumenten voor omhulling niet overtuigen. Dit was evenmin het geval met de argumenten in het artikel van Gye en medewerkers in 1972, waarin deze auteurs een gunstige werking toeschreven aan omhulling met autogene vene van allotransplantaten bij de mens. Het objectieve criterium voor het aantonen van het herstel van de functie, de electromyografie, bleef negatief. De subjectieve bepaling van de sensibiliteit die door deze auteurs werd gehanteerd, is een onvoldoende nauwkeurige evaluatiemethode. Concluderend kan worden gezegd dat omhulling van het transplantaat geen navolging verdient; hoewel in enkele dierexperimenten verbetering van de resultaten werd waargenomen, konden de klinische ervaringen dit niet bevestigen.

B. Voorbehandeling van het transplantaat met ioniserende straling

In 1963 meldde Campbell dat de verminderde afstotingsreactie welke hij constateerde na het omhullen van een bestraald transplantaat, aan de omhulling moest worden toegeschreven. Marmor merkte echter in de discussie terecht op dat hij zonder omhulling bij soortgelijke experimenten met ioniserende straling behandelde transplantaten, ook geen afstoting constateerde, en dat dus de bestraling effectief de afstotingsreactie verminderde en niet de omhulling. Dit gegeven werd verder uitgewerkt, zodat in 1967 Marmor goede resultaten met allotransplantatie van bestraalde perifere zenuwen bij rat en hond kon melden. De resultaten bij proefdieren waren dus veelbelovend maar toch beschreef Marmor in 1969 slechts mislukkingen bij menselijke toepassing van bestraalde perifere zenuwtransplantaten. Deze pogingen en ook de ervaringen van Campbell uit 1964 en Hirasawa uit 1967 toonden aan dat transplantatiemethoden, welke bij dieren goede resultaten gaven, bij klinische toepassing kunnen mislukken. Ducker and Hayes trachtten in 1969 de phylogenetische afstand zo klein mogelijk te maken door de chimpansee als proefdier te gebruiken. Door deze experimenten toonden ze bij de chimpansee aan dat bestraalde allotransplantaten tot een lengte van 40 mm redelijk succesvol kunnen zijn. Ollard en medewerkers probeerden in 1973 enige verklaring te geven voor het verschil in doorgroeimogelijkheid door autogene en allogene bestraalde zenuwtransplantaten. Ze constateerden dat hoewel de immunogeniciteit sterk gereduceerd was, er toch belemmeringen waren voor de ingroei vanuit de proximale stomp. Deze belemmeringen werden mogelijk veroor-

zaakt door het moeilijk verlopen van de phagocytose van het door bestraling gedetermineerde weefsel uit de neurolemnabuis. De door Comtet in 1972 uitgevoerde humane zenuwtransplantaties met 50 mm lange bestraalde transplantaten werden electrofysiologisch beoordeeld. De resultaten waren zo slecht dat hij bestraalde perifere zenuwallotransplantaten afraadde voor menselijk gebruik.

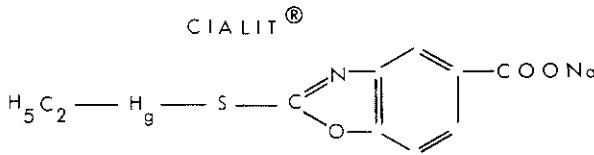
C. Behandeling van het implantaat met lyophilisatie en bestraling (Lyonerv^R)

Nadat Weiss in 1945 aannemelijk had gemaakt dat de regeneratie van perifere zenuwweefsel langs daartoe geschikte oppervlakken kon verlopen, heeft men lang naar geschikte geleidematerialen gezocht. Dit geleidemateriaal mocht niet antigeen zijn. Door ervaringen opgedaan met Lyodura, gelyophiliseerd menselijk dura mater, (Abbott, 1970) verwachtte de fabrikant dat met eenzelfde procédé van perifere zenuwen een niet-antigene matrix gemaakt kon worden. Dit procédé werd door Schnell in 1972 als volgt beschreven: het implantaat wordt direct na het uitnemen in een 15% NaCl oplossing bewaard. In deze oplossing wordt het naar een laboratorium gestuurd, waar het met behulp van oplosmiddelen en oxidantia wordt bewerkt. De precieze behandeling is fabrieksgeheim en deze gegevens werden ons niet ter beschikking gesteld. Vervolgens wordt het implantaat gelyophiliseerd en bestraald met 2,5 megarad gammastraling. Het aldus behandelde implantaat wordt Lyonerv genoemd. Met Lyonerv verrichtte Jacoby in 1970 twee transplantaties in de onderarm. Defecten in de nervus ulnaris en de nervus medianus werden met transplantaten van helaas niet vermelde lengte overbrugd. De resultaten werden goed genoemd. Het electromyogram (E.M.G.) toonde een goed herstel van de motoriek van de nervus ulnaris aan, terwijl de ninhydrine test volgens Moberg (1958), die het herstel van de innervatie van de zweetklieren aantoont door verkleuring van ninhydrine onder invloed van aminozuren welke in transpiratie aanwezig zijn, herstel van het sympathisch zenuwstelsel te zien gaf. De nervus medianus toonde ook klinisch en electromyografisch goed herstel. In 1972 werd door dezelfde groep chirurgen de resultaten van 57 transplantaties met Lyonerv beschreven (Mackert, 1972; Wilhelm, 1972). Deze resultaten waren goed, 80% van de patiënten toonden een verbetering van de motorische en sensibele functies. Hierdoor werd de Duitse vereniging voor neurochirurgie argwanend en stelde een onafhankelijke onderzoekscommissie in. Deze commissie onderzocht acht patiënten, waarbij door de behandelde chirurgen een bruikbare terugkeer van de zenuwfunctie was beschreven. De chirurgen verstonden hieronder minimaal de combinatie M₃ + S₃ in het Hight-schema. M₃ = actieve bewegingen tegen de zwaartekracht zijn mogelijk, en S₃ = diepe sensibiliteit, pijn en oppervlakkige sensibiliteit zijn teruggekeerd. De commissie onderzocht de motoriek met behulp van electromyografie en de sensibiliteit met behulp van de tweepunts discriminatie test en de munten-opraaptest. Geen van deze door de commissie onderzochte acht patiënten toonden echter anderhalf jaar na de operatie enig teken van herstel (Kuhlendahl, 1972), zodat Lyonerv transplantaten onbruikbaar werden verklaard. Dit was ook de mening van Bushe (1974) en Fischler

(1974) na hun weinig succesvolle pogingen Lyonerv te gebruiken bij de mens. Echter, de scherpe kritiek op Jacoby lijkt toch niet geheel gerechtvaardigd omdat ook Singh en de Lange (1975) bij 4 van de 13 met Lyonerv getransplanteerde patiënten tekenen van regeneratie konden aantonen.

D. Incubatie van het tranplantaat in cialit^R

Afanassieff (1967) gebruikte het bactericide en fungicide cialit^R als conserveermiddel voor perifere zenuwtransplantaten. Zo verkreeg hij een zenuw, die minder antigeen bleek te zijn en een redelijke structuur had.



2-(ethylmercurimercapto)-benzoxazol-5-natrium carboxylaat

Afnassieff gebruikte transplantaten welke drie weken tot negen maanden geconserveerd waren. Het aantal transplantaten was 20 en de gemiddelde lengte bedroeg 45 mm. Hij vervolgde 16 patiënten en constateerde bij 10 van hen een goed functioneel resultaat. Echter, de door hem gebruikte evaluatiemethoden, zoals de ninhydrine test en werkhervatting geven onvoldoende waarborg tot objectiviteit. Seiffert (1972) vond de cialit conservering een goede methode, hoewel slechts drie van 13 patiënten enige terugkeer van de motoriek toonden. Deze drie patiënten geven onvoldoende steun aan de conclusie dat conservering met cialit een bruikbare methode voor klinisch gebruik is. Comtet (1972) realiseert zich de grote discrepantie die bestaat tussen de resultaten van de klinische beoordeling en de electrofysiologische en histologische beoordeling en komt eveneens tot de conclusie dat cialit conservering van perifere zenuwtransplantaten af te raden is voor klinische toepassing.

HOOFDSTUK II

SYNOPSIS VAN ANATOMIE, REGENERATIE EN ZENUWHECHTING

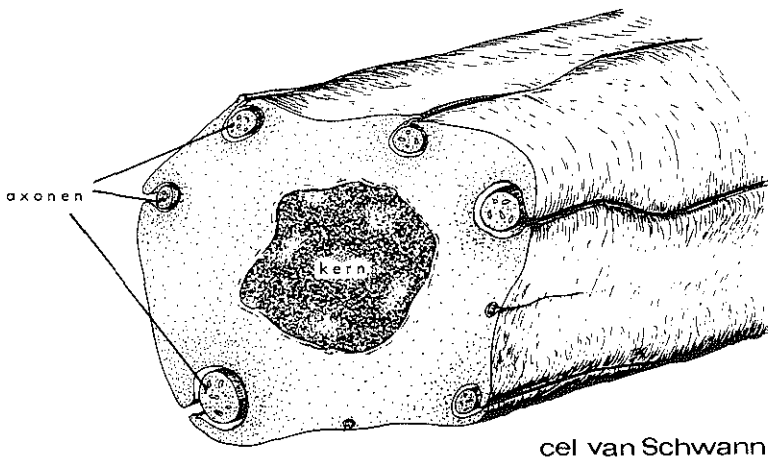
2.1. Anatomie

2.1.1. Inleiding

Het deel van het zenuwstelsel waarvan de axonen worden omgeven door cellen van Schwann wordt als perifeer zenuwstelsel beschouwd. Dit in tegenstelling tot het centraal zenuwstelsel, waar de axonen door gliacellen worden omgeven. Tot het perifere zenuwstelsel worden de hersenzenuwen gerekend, met uitzondering van de N. olfactorius en N. opticus. De ruggemergzenuwen, de dorsale wortels en het autonome zenuwstelsel worden ook tot het perifere zenuwstelsel gerekend.

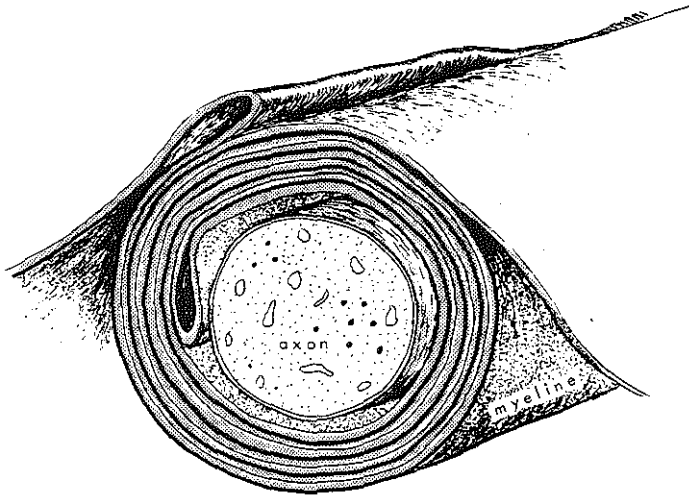
2.1.2. Het neuron

De eenheid van het perifere en centrale zenuwstelsel is het neuron. Dit is de zenuwcel met bijbehorende uitlopers. Een aantal relatief korte en vertakte uitlopers worden dendrieten genoemd. Zij dienen voor geleiding van afferente impulsen. Een lange uitloper, het axon, dient voor geleiding van efferente en soms afferente impulsen. Het cellichaam bevindt zich in de voorhoorn van het centrale zenuwstelsel of in een ganglion in de intervertebrale ruimte. Het bevat een kern, neurofibrillen en cytoplasmatische ribonucleoproteïnen. Het axon spruit van de axonheuvel als een



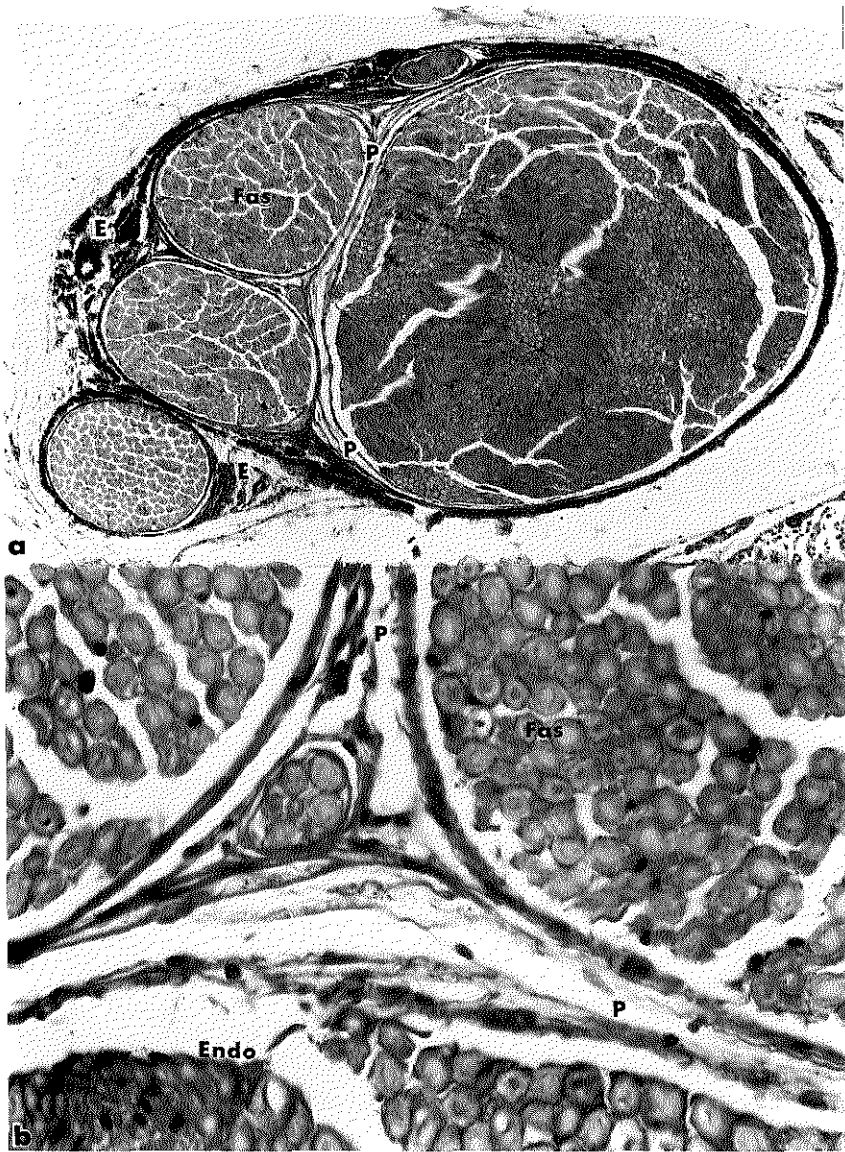
Figuur 2.1.2.1.

Ongemyeïniseerde axonen: een schematische weergave van een cel van Schwann waarin enkele axonen zijn gebod.



Figuur 2.1.2.2.
Gemyeliniseerd axon: een schematische weergave van de myeline dubbelmembraan die horloge-
veervormig rond het axon is gewikkeld.

voortzetting van het celprotoplasma. Het axon bevat mitochondriëën, axoplasma-
blaasjes, neurofilamenten en neurotubuli. Het axon wordt omgeven door cellen van
Schwann. Dit kan op twee manieren gebeuren. Bij de zogenaamd niet gemyelini-
seerde axonen is het axon samen met vele andere in een cel van Schwann gebed
(Fig. 2.1.2.1.). Bij de zogenaamde gemyeliniseerde axonen heeft de cel van
Schwann een deel van het axon in een dubbelbladige horlogeveervormige uitloper
gekruld (Fig. 2.1.2.2.). Deze wordt wegens zijn samenstelling het myeline genoemd.
De onderbreking tussen twee cellen van Schwann wordt door zijn speciale vorm de
knoop van Ranvier genoemd. Hier vormen twee cellen van Schwann met pseudo-
podieën een voor ionen doorlaatbaar vlechtwerk (Kuczynski, 1974). De knopen
hebben een functie bij de spronggewijze prikkelgeleiding. In de myelineschede
komen regelmatig verlopende ophelderingen voor. Deze ophelderingen hebben een
kegelvorm en worden Schmidt-Lantermann incisuren genoemd. Het blijken bij elec-
tronenmicroscopisch onderzoek protoplasma ophopingen te zijn die tussen de
myeline dubbelbladen liggen. De cellen van Schwann worden omgeven door een
basaalmembraan welke continu van cel op cel verloopt. Deze basaalmembraan
wordt het neurolemma genoemd. De axonen en hun omhulling worden gebundeld
door een buisvormig vlechtwerk van bindweefsel, het endoneurium met collageen
(Fig. 2.1.2.3.). Groepen axonen met cellen van Schwann en endoneurium worden
door het perineurium tot fasciculi gebundeld. Het perineurium is een buisvormige
structuur bestaande uit concentrische lagen perineurale cellen met collageen en
elastische vezels. De perineurale cellen hebben een basaalmembraan en dit onder-
scheidt hen van fibrocyten. De taak van het perineurium is tweedelig, het dient als
bundeling, maar ook als ionenbarrière. Hierdoor wordt rond de omhulde axonen



Figuur 2.1.2.3.
Dwarsdoorsnede van een perifere zenuw (n. ischiadicus van een konijn).
a (vergroting 90x); Fas: fasciculus; E: epineurium; P: perineurium.
b (vergroting 510x); Endo: endoneurium.

een eigen intern milieu behouden. Dit is electronenmicroscopisch aangetoond door Schröder en Seifert (1970) en Lassmann en Ammerer (1974).

2.1.3. De neuromusculaire synaps

De overgang van zenuw naar spierweefsel heeft tot taak de impuls van het zenuwuiteinde over te brengen op de spiervezel zodat deze zich contraheert. Daartoe dient een ingewikkelde, maar functionele structuur. De motorische gemyeliniseerde axonen verdelen zich vlak bij de spiervezels in een groot aantal eindvertakkingen. Deze eindvertakkingen verbreden zich en vergroten door rimpeling het oppervlak dat in contact is met het sarcolemma van de spiervezel. De prikkeloverdracht vanuit het axon wordt verzorgd door met acetylcholine gevulde blaasjes. Deze overdracht zal niet beschreven worden. Wel zullen drie interessante aspecten van de synaps besproken worden, aspecten die belangrijk zijn voor herstel van de functie na een laesie van het perifere zenuwstelsel: 1) het is mogelijk dat een axonuiteinde op een andere plaats dan de oorspronkelijke een nieuwe synaps vormt; 2) bij uitval van neuronen kan één neuron door vertakking de taak van vele andere overnemen; 3) na uitval van motorische neuronen wordt het sarcolemma van een spiervezel gevoeliger voor neuromusculaire contacten. Door deze mogelijkheden kan één neuron een grote motorische eenheid vormen (een motorische eenheid is één neuron met de door dit neuron geïnnerde spiervezels). Hierdoor is het mogelijk dat een beperkt aantal geregenereerde neuronen een goed herstel van de motorische functie kunnen verzorgen.

2.1.4. De sensibele eindlichaampjes

De sensibele eindlichaampjes zijn gemodificeerde en zeer gespecialiseerde uiteinden van sensibele zenuwen. Zij zijn eerder beschreven door Ruffini, Vater Pacini, Meissner en Golgi Mazzoni, details vallen buiten het kader van onze beschrijving en zijn te vinden bij Bloom en Fawcett (1968).

2.1.5. De vascularisatie

A. Bloedvaten

Lange tijd werd gedacht dat een perifere zenuw voornamelijk van proximaal uit werd gevasculariseerd. Daarom werd ook verondersteld dat een zenuw zonder belemmering van de functie over een groot traject gemobiliseerd kon worden. Smith (1966) heeft echter het bestaan aangetoond van een dubbelbladige bindweefsellaag waarin alle bloedvaten gelegen zijn, die de vascularisatie van een zenuw verzorgen. De vaten ontspringen op regelmatige afstanden uit de arterie en vene, die in de vaat-zenuwbundel samenlopen. Hij vergeleek deze laag met het mesenterium en noemde hem daarom ook het mesoneurium. Hij toonde aan dat het mesoneurium dient voor het waarborgen van de vascularisatie van de zenuw met behoud van de mobiliteit bij bewegingen van de extremiteiten zoals flexie, extensie en pro-

supinatie. Nobel (1974) publiceerde een fraaie afbeelding van het mesoneurium van de nervus ischiadicus van een konijn, waarvan het vaatstelsel met een gekleurd contrastmiddel was opgespoten. Vanuit de in het mesoneurium liggende arcaden vertakken zich vaten die onder een schuine hoek het epi- en perineurium binnendringen. Deze vaten staan in verbinding met de longitudinaal verlopende arteriolen welke meestal aan de oppervlakte van een zenuw zichtbaar zijn. De arteriolen staan in verbinding met intraneurale arteriolen welke longitudinaal verlopen en veel vertakkingen hebben. Deze vertakkingen zijn de bron van veel precapillairen en capillairen die een aaneensluitend intraneuraal vaatbed vormen. Het vaatbed breidt zich door de hele zenuw uit. Het mesoneurium moet volgens Smith en Nobel bij operaties waarbij perifere zenuwen vrijgeprepareerd worden zoveel mogelijk worden gespaard.

B. Lymfvaten

Volgens Sunderland (1969) heeft de perifere zenuw alleen een lymfvaatstelsel in het epineurium. Wel bestaan perineurale en endoneurale weefselspleten, maar deze staan niet in verbinding met het lymfvaatstelsel; mogelijk wel met de subarachnoidale ruimte. Voor deze verbinding bestaan sterke aanwijzingen, maar geen bewijzen (Haller, 1971).

2.2. Regeneratie

2.2.1. Inleiding

Na doorsnijding van een perifere zenuw spelen zich tegelijkertijd op verschillende plaatsen aaneenschakelingen van processen af. Voor de overzichtelijkheid zullen deze processen op iedere localisatie afzonderlijk worden besproken en wel op de volgende niveaus.

2.2.2. Het cellichaam en de kern van het neuron.

2.2.3. De proximale stomp van de zenuw.

2.2.4. De distale stomp en het distale deel van de zenuw.

2.2.5. De eindlichaampjes.

2.2.2. Het cellichaam en de kern van het neuron

De aanvankelijk veronderstelde retrograde degeneratie welke met het lichtmicroscop werd geconstateerd (Ducker, 1969) blijkt bij electronenmicroscopisch onderzoek een functionele hypertrophie te zijn. Het RNA (ribo nucleïne zuur) gaat van grote in veel kleinere deeltjes over en dit geeft het beeld van de chromatolyse. Deze vorm van het RNA is een hyperactieve vorm, nodig voor de verhoogde eiwitsynthese. Het geproduceerde eiwit wordt vervolgens naar de proximale stomp getransporteerd (Thomas, 1966; 1970). Ook Droz en La Blond (1963) konden dit met behulp van met Tritium gemerkt leucine aantonen. Weiss en Hiscoe (1948) en

Grafstein (1971) noemden dit de axonstroom. Door de axonstroom worden de eiwitten, welke in het protoplasma van het cellichaam worden gesynthetiseerd naar de proximale stomp getransporteerd. De overgang naar de hyperactieve eiwitsynthese begint op de vierde dag na doorsnijding en is na twintig dagen maximaal. Deze verhoogde eiwitsynthese kan bij de mens wel jaren aanhouden, waaruit blijkt dat het regeneratie vermogen langdurig behouden blijft, getuige ook het feit dat stompneuromen langdurig aanwezig blijven.

2.2.3. De proximale stomp van het axon

Na doorsnijding reageren axon, cellen van Schwann, basaalmembraan, steunweefsel en vaatweefsel tegelijkertijd en op eigen manier. Aan het uiteinde van de stomp ontstaat een zwelling welke vijftien millimeter lang kan worden. De zwelling kan binnen één week een omvang hebben aangenomen van drie tot viermaal de oorspronkelijke diameter van de stomp. Tot de laatste intacte knoop van Ranvier treedt nu retrograde degeneratie op. Bij deze degeneratie splijten de myeline dubbelmembranen en krijgen op doorsnede een onordelijk geribbeld uiterlijk. De cellen van Schwann verliezen hun myeline (Morris, 1972) en fagocyteren het gedegeneerde myeline; hierna prolifereren ze en vormen kolommen van cellen van Schwann omgeven door een basaalmembraan, deze kolommen beginnen de ontstane leemte te overbruggen. De axonstompen gaan uitgroeien en de uitspruitende axonen vormen uitlopers met knopvormige uiteinden (Lampert, 1967). Het axonplasma van deze groeikegels blijkt bij electronenmicroscopisch onderzoek blaasjes, buisjes, filamenten, mitochondrieën en membraneuze lichaampjes te bevatten. Deze uiteinden zijn zelden dikker dan 600μ in diameter en stulpen uit als pseudopodieën. Zij maken gebruik van contactgeleiding (Weiss, 1945) en groeien langs een glad oppervlak uit. Dit gladde oppervlak kan een kolom cellen van Schwann zijn maar ook andere gladde oppervlakken kunnen voldoen. Het aantal overstekende axonen is meestal groter dan het oorspronkelijke aantal axonen van de proximale stomp. Dit werd door Shaw (1954) en Causey (1960) waargenomen en wordt veroorzaakt door het ontspruiten van diverse regeneratieve axonen uit één axon. Hun aantal varieert van één tot negentien, maar is gemiddeld vier tot vijf. Het peri- en endoneurium groeit uit en omhult de uitgroeiende axonen en kolommen van Schwannse cellen.

2.2.4. De distale stomp en het distale deel van de zenuw

Aan de stomp beginnen cellen van Schwann te prolifereren en zij worden omhuld door een basaalmembraan. Deze omhulde prolifererende cellen worden door Thomas (1966) buizen van Schwann genoemd. Vanuit het centrum van de stomp begint uitgroei van deze buizen en van een los onregelmatig netwerk van collageenvezels, gevormd door fibroblasten. De uitgroei verloopt enkele millimeters in een bolvorm en is dan afhankelijk van geleidevlakken. Indien geen geleidevlak wordt gevonden ontaardt de uitgroei in een chaotische wirwar van buizen van Schwann, die men wel een Schwannoom noemt (Hubbard, 1972). Van hieruit ontspruiten

fibroblasten-kluwens die later een endotheel bekleding krijgen en capillairen worden. De centrale fibroblasten en het collageen stammen uit het endoneurale weefsel en, aan de periferie, uit het perineurale weefsel. Dit laatste is herkenbaar aan de grovere diameter van de collageen vezels, terwijl ook elastische vezels voorkomen. De buizen van Schwann en het steunweefsel van de distale stomp dragen meer bij aan het overbruggen van het defect dan dezelfde structuren van de proximale stomp. De omhullingen van in groepen samengevoegde buizen van Schwann vormen lamellen en een basaalmembraan. Hierdoor krijgen ze steeds meer het aspect van perineuraal weefsel en lijkt de overbrugging uit vele fasciculi te bestaan.

Distaal van de stomp degenerereert een perifere zenuw op een typische manier die men Wallerse degeneratie noemt. Het van zijn cellichaam gescheiden axon toont reeds 24 tot 36 uur na doorsnijding degeneratieve afwijkingen, zoals opeenhopingen van mitochondrieën, blaasvormige en lamellaire lichaampjes. Deze lichaampjes zijn waarschijnlijk secundaire lysosomen (Ballin, 1969). Bij de knopen van Ranvier hopen zich kleine blaasjes en buisjes op. De neurofilamenten en neurotubuli verliezen hun continuïteit, vallen in stukken uiteen en vormen klompjes. Dat er een functionele relatie bestaat tussen het neuron en de cellen van Schwann blijkt reeds tussen 24 en 72 uur na doorsnijding. Dan begint na de bovengenoemde verschijnselen in het axon, het myeline te desintegreren (Kreutzberg, 1971) en wordt het door de prolifererende cellen van Schwann gefagocyteerd. De totale desintegratie van het axon onder invloed van de secundaire lysosomen vindt na twee tot drie weken plaats; het axolemma desintegreert en de overblijfselen worden gefagocyteerd door macrofagen (Liu, 1974). De basaalmembraan en het steunweefsel blijven redelijk intact, hoewel de diameter van de door het basaalmembraan gevormde buis afneemt (Gaster, 1971). Als een ingroeiende axon later de buis weer vult kan de diameter van de buis weer toenemen tot maximaal 80% van de oorspronkelijke diameter. Het verschil in diameter wordt veroorzaakt door de minder dikke myelineschede. Het axon kan zelfs dikker zijn dan oorspronkelijk (Schröder, 1972).

2.2.5. De eindlichaampjes

Saito (1969) en Sorbie (1969) bestudeerden met behulp van de electronenmicroscop de de- en reïnnervatie van de motorische eindplaat van de muis. Na twee tot drie weken wordt de primaire kloof van de motorische eindplaat plat in plaats van gerimpeld en de secundaire kloof wordt breed en kort. Het axon wordt niet meer aangetroffen. Vier weken na de reïnnervatie verschijnen de eerste regenererende axonenspruiten. Deze axon-spruiten groeien langs de buizen van Schwann naar de eindplaat. Indien zij in de buurt van de eindplaat aankomen, neemt de smalle eindplaat zijn oude vorm weer aan. Dit proces duurt zes tot dertig weken. Indien de reïnnervatie niet onmiddellijk plaats vindt, verdikt de spiervezelmembraan zich, waardoor reïnnervatie moeilijker wordt. Ducker (1969) meent dat bij dieren de spiervezels na 12 tot 16 weken degenereren, maar bij de mens zeer lang latent aanwezig blijven en pas na 10 jaar desintegreren.

2.3. De zenuwhechting

2.3.1. Inleiding

In de literatuur wordt veel aandacht besteed aan de zenuwhechting. Omdat bij zenuwtransplantatie een optimale hechttechniek noodzakelijk is zal aan dit onderwerp aandacht worden besteed.

2.3.2. Doorsnijding

Voor een goede approximatie van 2 zenuwuiteinden is het belangrijk dat de zenuw zonder beschadiging loodrecht op de zenuwas wordt doorgesneden. Edshage (1964) vergeleek doorsnijden en doorknippen en kreeg betere resultaten na doorsnijden met een scheermes. Inmiddels zijn microchirurgische diamantmesjes ontwikkeld en heeft Millesi een schaarje met kartelprofiel geïntroduceerd, waardoor de resultaten verbeterd worden.

2.3.3. Hechtmateriaal

Edshage (1964; 1968) vergeleek enige hechtmaterialen en formuleerde de eisen waaraan ze moeten voldoen. Het materiaal moet inert zijn, voldoende dun en goed hanteerbaar. Roestvrij staal en nylon voldeden beide aan deze eisen. Edshage gaf zelf de voorkeur aan roestvrij staal, maar momenteel voldoen de dunne nylon soorten, zoals 10-0 Ethicon, het best. Enkele hechttechnieken die werden ontworpen vóór de microchirurgie werd ingevoerd, zullen voor de volledigheid worden beschreven. In 1940 beschreven Young en Medawar de plasmastolsel hechting. Het stolsel werd rond twee geapproximeerde zenuwuiteinden gegoten. Het werd bereid door aan plasma fibrinogeen toe te voegen, de fibrinevorming werd geactiveerd door weefselextract. De cyanoacrylaat hechtstoffen werden door Bromley (1964) gebruikt om zenuwuiteinden te verbinden, maar Faul (1965) en Lehman (1967) waarschuwden voor de sterke weefselreactie en neurotoxiciteit. Enige verbetering werd geconstateerd door Pollard (1971) die gebruik maakte van alfa-ethylcyanoacrylaten, samen met autogene venen.

2.3.4. Operatiemicroscoop

De hechtstoffen zijn verlaten na introductie van microchirurgie en het operatiemicroscoop. Het gebruik van het microscoop wordt door Campbell (1963; 1964), Edshage (1968), Smith (1966), Millesi (1967; 1976), Owen (1970), Van Duinen (1974) en Singh (1977) noodzakelijk geacht voor het behalen van optimale resultaten. De voordelen van het gebruik van microchirurgische methoden zijn een betere subtiele manipulatie van de weefsels, een nauwkeurige approximatie en betere hecht- en knooptechniek.

2.3.5. Perineurale hechting

Tot 1967 werd meestal de epineurale hechting gebruikt. Bora (1967) toonde

echter aan dat het hechten van het perineurium van de fasciculi betere resultaten gaf. Door zijn stuggere structuur en geringere verschuifbaarheid is de approximatie beter en langduriger. De epineurale hechting veroorzaakt ook meer littekenvorming. De voorkeur gaat dus uit naar de perineurale hechting.

2.3.6. Omhulling

Omhulling werd aanvankelijk voornamelijk gebruikt voor een betere oriëntatie van de axonen. Weiss (1944) gebruikte in navolging van Spurling tantalum, maar dit metaal brak en provoceerde fibrosering. Campbell (1957) gebruikte Millipore. Deze inerte kunststoffilter met poriën van 0.45 micron is doorlaatbaar voor extracellulaire vloeistoffen, maar niet voor cellen. Hij dacht hiermee fibrosering te voorkomen en veronderstelde zelfs de cellulaire afstotingsreactie te kunnen belemmeren, maar millipore verbrokkelde en provoceerde juist een intensieve fibrosering.

Ook de in 1964 door Campbell geïntroduceerde silastic (een siliconen rubber) omhulling bleek geen succes (Hirasawa, 1967). Alleen Pollard (1971) houdt vol dat het gebruik van autogene vene als omhulling verbetering van de resultaten geeft in dierproeven.

Uit de literatuurgegevens kunnen de volgende konklusies getrokken worden.

1. Het is noodzakelijk de zenuwuiteinden nauwkeurig voor te bereiden met behulp van een zeer scherp mes (Gillette platinum plus of geslepen diamant) of het schaartje van Millesi.
2. Voor het afsnijden, behandelen en hechten van perifere zenuwen is een operatiemicroscop onontbeerlijk.
3. De perineurale zenuwnaad is beter dan de epineurale zenuwnaad.
4. Het gebruik van dun hechtmateriaal zoals 10-0 nylon met fijne naald verdient de voorkeur, in combinatie met microchirurgisch instrumentarium en microchirurgische methoden.
5. Spanning op de zenuwnaad dient vermeden te worden.

TRANSPLANTATIE IMMUNOLOGIE

3.1. Inleiding

Voor een goed begrip van de immunogeniciteit van perifere zenuwtransplantaten is enige kennis van de transplantatieimmunologie noodzakelijk. Om deze reden zal een kort overzicht van de recent verworven kennis van de transplantatieimmunologie worden gegeven. Medawar, die in 1944 over de afstotingsreactie publiceerde, concludeerde dat het een volgorde betrof van aanvankelijk accepteren, het vormen van een specifieke afweer en daarna afstoten. In snel tempo werd hierna ontdekt dat iedere levende cel individu-specifieke transplantatie antigenen aan het oppervlak draagt en dat ieder individu in staat is om met behulp van voornamelijk lymfocyten op deze antigenen een passende afstotingsreactie te ontwerpen en uit te voeren. Zowel de antigene eigenschappen als de afstotingsreactie zijn genetisch bepaald en wel door een specifiek deel van het chromosoom materiaal. Dit deel, althans het belangrijkste, wordt het 'Major Histocompatibility Complex' of MHC genoemd. Transplantatie antigenen kunnen serologisch worden gedetermineerd aan leukocyten en in kaart worden gebracht zoals in het 'Human Leukocyte Antigen System' of HLA. Tegelijkertijd met het onderzoek van het MHC werd specifiek onderzoek verricht omtrent de humorale en cellulaire componenten van de afstotingsreactie. Reeds lang voordat hierin enig inzicht was verkregen werd aandacht besteed aan het onderdrukken van de afstotingsreactie. Twee mechanismen van specifieke immunosuppressie werden ontdekt, n.l. immunologische tolerantie en enhancement. Praktische resultaten werden aanvankelijk alleen met farmacologische immunosuppressiva verkregen, later ook met biologische immunosuppressiva. Gestimuleerd door deze ontwikkelingen groeide de belangstelling voor de immunologie en immunogenetica, vooral door de relaties welke gelegd konden worden tussen het MHC en diverse ziekten, waaronder kanker. De hierbovengenoemde facetten zullen nu afzonderlijk besproken worden in de volgende paragrafen.

3.2. Het Major Histocompatibility Complex (MHC)

De voornaamste transplantieantigenen worden als één eenheid overgeërfd. Deze eenheid is genetisch deelbaar in een aantal subgroepen welke de belangrijkste antigene determinanten op celoppervlakken bepalen. Er zijn waarschijnlijk vele histocompatibiliteitsloci, maar daarvan is het major histocompatibiliteits complex veruit de belangrijkste. Het MHC speelt ook een centrale rol bij de reactie van de gastheer op lichaamsvreemde antigenen en is bovendien betrokken bij een groot aantal membraanfuncties. Hierdoor is het MHC het belangrijkste controlecentrum voor de immunologische afweermechanismen.

3.3. Transplantatieantigenen

Onder transplantatieantigenen of immunogenen worden eiwitstructuren verstaan die zich meestal aan een celoppervlak bevinden en gevormd worden volgens een strikt individuele code, verkregen uit het MHC. Solheim (1974) heeft iets van deze structuur kunnen ontrafelen. Het is een twee-eenheid van een zware eiwitketen, verbonden met een lichtere keten welke bestaat uit het β 2-microglobuline. Door van Rood (1956) en Dausset (1956) werd aangetoond dat de meeste transplantatieantigenen zich ook aan het oppervlak van leukocyten bevinden en dat deze antigenen serologisch getypeerd kunnen worden. Het 'Human Leukocyte Antigen' (HLA) systeem kon worden gedetermineerd. Naast deze serologische determinanten werd een andere, voor de afstoting zeer belangrijke, groep determinanten ontdekt. Deze laatste determinanten spelen een belangrijke rol bij de proliferatie in de gemengde lymfocytenkweek en worden LD (lymphocyte determined) determinanten genoemd, ze staan ook onder controle van het MHC. Aan deze determinanten zal bij bespreking van de cellulaire afstoting aandacht besteed worden. De transplantatiereactie is strikt individu-specifiek. Bij de evolutie kan transplantatie geen rol gespeeld hebben. Dit dwingt ons tot de vraag waarom dit systeem dan wel ontwikkeld is. Medawar stelde deze vraag in 1953 als volgt: 'Although there are no factual grounds for supposing that antigenic diversity is anything but an unfortunate consequence of constitutional differences between individuals of a species, yet one is under some obligation to rack one's brain for evidence of any good it might conceivably do. Only thus can antigenic polymorphism be made genetically respectable'.

Op deze vraag van Medawar meent Susumo Ohno (1977) een aanvaardbaar antwoord te kunnen geven. Hij ontwikkelde een interessante theorie, waarin ook de 'altered self' theorie van Zinkernagel en Doherty (1974) past. In de evolutie hebben de gewervelde dieren een afweersysteem moeten ontwikkelen tegen een anders noodlottige eigenschap van virussen. Virussen kunnen namelijk van de dimeren van het β 2-microglobuline en MHC producten gebruik maken. De dimeren kunnen als contactplaatsen dienen voor alle regulerende plasmamembraaneiwitten die de organogenese en celdifferentiatie besturen. Indien deze contactplaatsen een verandering ondergaan kunnen zij een inwendig differentiatie signaal vormen en de gastheercel beïnvloeden. Virussen ontwikkelden in de evolutie een mogelijkheid om de cel op deze manier tot een voor hen gunstige pathologische differentiatie te dwingen. Nadat de virussen op deze manier de weg tot effectief veranderen van de gastheercelmechanismen hadden gevonden, restte de gewervelde dieren alleen nog de mogelijkheid om een ontdekkingsmechanisme te ontwikkelen dat de geringe veranderingen van deze contactplaatsen door vreemde eiwitten kon ontmaskeren. Door natuurlijke selectie is het aantal genen uitgebreid en een grote veelvormigheid ontstaan. Deze veelvormigheid is voor een populatie van groot belang om de kwetsbaarheid te verminderen. Ohno kwam tot de konklusie dat de allotransplantatie-afstoting in de evolutiebetekenis een puur incidenteel gevolg is van de functionele eisen,

welke aan de MHC antigenen gesteld worden. Het cellulaire immuunresponsysteem heeft als doel iedere verandering van zijn eigen MHC antigenen aan te vallen. Omdat op populatieniveau de MHC antigenen zeer veelvormig zijn, is het geen wonder dat het gastheerimmuunsysteem heftig reageert als het niet-eigen allelische variaties van MHC producten ontmoet.

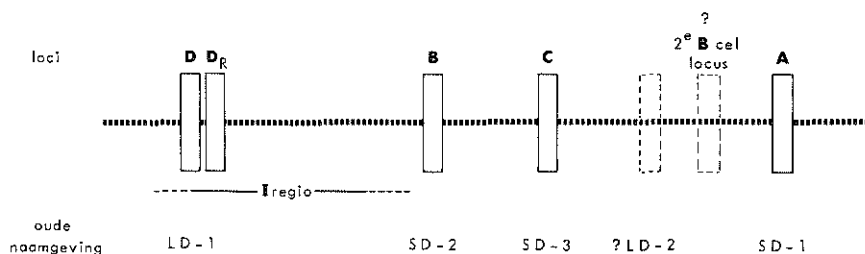
3.4. Human Leukocyte Antigens – het HLA systeem

3.4.1. Het SD determinanten systeem

Het antigeen-complex van de menselijke leukocyt kan door middel van serologisch testen in kaart worden gebracht en, gerelateerd aan de plaats op het chromosoom kunnen 3 loci (A, B en C) geïdentificeerd worden, zoals in figuur 3.4.1 is weergegeven (Balner, 1975, Bach 1976). Het HLA systeem is betrokken bij zeer veel processen in het menselijk lichaam en er worden steeds meer relaties gelegd met andere terreinen dan transplantatie. Zo bestaat er op het ogenblik veel belangstelling voor het verhoogd voorkomen van groepen ziekten bij patiënten met een bepaald HLA patroon. De afstotingsreactie staat gedeeltelijk onder invloed van het HLA systeem. Terasaki en Starzl (1968) en Van Rood (1969) toonden aan dat na typen van het HLA systeem donor-gastheer combinaties gevonden konden worden waarbinnen een kadaverniertransplantatie een grote kans van slagen heeft (matches voor HLA), groter dan wanneer alleen met de conventionele bloedgroepen rekening werd gehouden. Starzl (1977) vond in de Verenigde Staten ook een positieve correlatie tussen matches voor HLA en de overleving van nieren afkomstig van levende donoren, maar deze invloed was minder positief bij het gebruik van kadavernieren. Starzl en Van Rood postuleren dat de meer heterogene samenstelling van de Amerikaanse bevolking de reden van deze discrepantie is.

3.4.2. Het LD determinanten systeem

De LD of D-determinanten worden eveneens gecodeerd door het MHC. Zij komen tot uiting bij de 'mixed leukocyte reaction' en zijn voor de transplantatiereactie waarschijnlijk belangrijker dan de bovenvermelde serologische determinanten.



Figuur 3.4.1.

Schematische weergave van het 'Major Histocompatibility Complex' (MHC) bij de mens.

Beide determinanten zullen bij de transplantatiereactie besproken worden. De recente bevinding dat serologisch herkenbare Ia (of B-cel) antigenen een sterke associatie vormen met LD determinanten maakt de onderverdeling in cellulair en serologisch herkenbare transplantatieantigenen enigszins obsoleet.

3.5. De transplantatiereactie

Het is reeds lang bekend dat na het aanbieden van lichaamsvreemde transplantatieantigenen in de regionale lymfklier een vergroting en proliferatie van kleine lymfocyten optreedt. Deze lymfocyten migreren naar het transplantaat en zijn in staat het te desintegreren. Aanvankelijk werd aangenomen dat er twee afzonderlijke manieren van afstoting bestonden. Een humorale afstotingsreactie veroorzaakt door circulerende antilichamen en voornamelijk gericht tegen losse cellen, en een cellulaire afstotingsreactie voor de destructie van weefsels en organen. De afstoting van vrije transplantaten, dit zijn niet gevasculariseerde transplantaten zoals huid en perifere zenuw, wordt voornamelijk door de cellulaire wijze van afstoting verzorgd. De afstoting van gevasculariseerde transplantaten zoals nier en hart wordt voornamelijk door de humorale wijze van afstoting teweeg gebracht. Op het ogenblik bestaat de overtuiging dat gewoonlijk beide manieren samenwerken en dat alleen extremen exclusief door één van beide verzorgd worden. De Graft-versus-Host (GvH) reactie kan als voorbeeld van een uitsluitend cellulaire afstoting dienen, de hyperacute afstoting als voorbeeld voor een uitsluitend humorale reactie. De GvH reactie ontstaat als een transplantaat van immunocompetente cellen bij een immunologisch niet-actieve ontvanger tot proliferatie overgaat. Dit leidt tot een agressief ziektebeeld dat meestal de dood tot gevolg heeft. Bij de hyperacute afstoting wordt een transplantaat binnen aanzienlijk kortere tijd dan normaal afgestoten. Dit komt doordat circulerende antilichamen die gevormd zijn bij een voorafgaand contact met het antigeen snel een antigeen-antilichaam complex vormen op het vaatendotheel van gevasculariseerde organen. Deze complexvorming leidt tot een stollingsreactie waardoor de functie van het orgaan ernstig wordt belemmerd. Milgrom (1977) beschrijft hoe de hyperacute afstoting van een menselijk niertransplantaat zich binnen 20 minuten voltrekt.

Beide manieren van afstoting zijn nu beter bekend, evenals de rol die de lymfocyten hierbij spelen. Vooral de artikelen van Bach (1976), Tin Han (1976) en Terasaki (1977) over de functie bij de cellulaire afstoting geven een beter inzicht in de rol van de lymfocyten. Het blijkt dat er subpopulaties van lymfocyten bestaan, namelijk B en T lymfocyten. Bij vogels vindt de differentiatie van een bepaalde populatie lymfocyten plaats onder invloed van de bursa van Fabricius (B-lymfocyten). Deze B-lymfocyten ontstaan bij zoogdieren uit het beenmerg; waar de factoren worden gemaakt die hun functie beheersen is niet met zekerheid bekend. De voorloper cellen van de thymus afhankelijke lymfocyten of T-lymfocyten ontstaan ook in het beenmerg, maar prolifereren in de thymus en differentiëren onder invloed van door de thymus gemaakte factoren. De T lymfocyten verzorgen het

cellulaire aspect van de afstoting en de B lymfocyten verzorgen het humorale deel. Beide manieren van afstoting worden in de volgende paragrafen besproken.

3.5.1. De cellulaire afstoting

Het huidige concept over de cellulaire afstoting is opgebouwd uit kennis die is verworven bij de bestudering van de histologie van transplantaten bij proefdieren, uit longitudinale studies waarbij de transplantaten in een serie achtereenvolgens werden verwijderd, uit biopten van transplantaten en uit de bestudering van afgestoten orgaantransplantaten van patiënten. De geïsoleerde reacties *in vitro* hebben inzicht gegeven in enkele specifieke patronen van de cellulaire afstoting. De T lymfocyten worden door het antigeen in het transplantaat of door een oplosbaar antigeen in de regionale lymfklier gesensibiliseerd; de lymfocyt begint te prolifereren. De nieuw gevormde T lymfocyten migreren naar het transplantaat en liseren de cellen. De goed uitgevoerde experimenten van Bach (1976) en Tin Han (1976) hebben aangetoond dat in de 'mixed lymphocyte culture' of MLC (welke aange-merkt kan worden als een *in vitro* correlaat van de *in vivo* optredende herkennings-reactie) de responder T lymfocyten door B lymfocyten tot proliferatie gestimuleerd worden. De MLC wordt als volgt uitgevoerd. De stimulerende groep lymfocyten worden bestraald of met mitomycine-C behandeld. Indien deze behandelde lymfocyten nu tezamen met de lymfocyten van een ander individu (de responder cellen) gedurende 4-7 dagen worden gekweekt, dan kan met behulp van incorporatie van met tritium gemerkt thymidine de mate van proliferatie worden gemeten. Deze stimulatie gebeurt door B lymfocyten (Tin Han, 1977) en wel door determinanten die LD determinant of D determinant wordt genoemd en een sterke associatie vertonen met Ia (immune associated) antigenen welke sinds kort ook wel D_r of D-related antigenen worden genoemd. De Ia-regio van het MHC codeert voor antigenen welke voornamelijk voorkomen aan het oppervlak van de B lymfocyt evenals aan het oppervlak van de vaatendotheel cel, de spermatozoë en de epidermale cel. Indien de responder cellen geprolifereerd zijn en men incubeeft hen met target cellen (de target cellen zijn cellen van dezelfde donor als de stimulerende B lymfocyten) dan worden de target cellen gelyseerd. De lysis kan gemeten worden aan de hand van het vrijkomen van tevoren geïncorporeerd radioactief gemerkt Natriumchromaat (⁵¹Cr). Bij deze acties voltrekt zich een samenspel van twee subpopulaties van de T lymfocyt. De serologische gedefinieerde (SD) determinanten zijn aanwezig aan het oppervlak van alle cellen. Onder invloed van de SD determinant proliferereert de T lymfocyt en onder invloed van de LD determinant de helper cel (Gowans, 1977). Beide stimuli werken samen om actieve cytotoxische T lymfocyten of 'killer' cellen te vormen. Deze cel lyseert de target cel in de CML (cell-mediated-lymphocytotoxicity). Verondersteld wordt dat dit proces *in vivo* een soortgelijk be-
loop heeft.

3.5.2. De humorale afstoting

Bij de humorale afstoting staat de productie van antilichamen centraal. De indruk bestaat dat de eerste fase van de productie door speciale cellen gebeurt. Deze cellen, macrofagen en speciale reticulumcellen, fagocyteren het antigeen. Zij zijn in staat deze antigene code aan het oppervlak te uiten en mede te delen aan de B lymfocyten. De B lymfocyten kunnen nu aan hun oppervlak een complementaire code ontwikkelen. De gecodeerde B lymfocyt gaat prolifereren en transformeert tot plasmablast. De plasmablast wordt tot rijpe plasmacel. Deze rijpe plasmacel is in staat om antilichamen te vormen, die specifiek zijn voor het aangeboden antigeen. Deze gehele ontwikkeling vindt plaats in lymfoïde weefsels zoals milt, lymfklier en lymfklierweefsel in de darm. De structuur van de antilichamen is bekend, het zijn immunoglobulinen. Antilichamen spelen niet alleen een belangrijke rol in de hyperacute afstoting zoals Andres in het artikel van Milgrom (1977) aangetoond heeft, maar ook bij de normale en vertraagde afstoting. De hyperacute afstoting en de 'white graft rejection' zijn zeer waarschijnlijk uitingen van afstoting door gepreformeerde antilichamen. Milgrom (1977) was in staat circulerende antilichamen aan te tonen bij patiënten welke daarna hyperacute afstoting van een niertransplantaat vertoonden. De 'white graft rejection' is een bijzondere vorm van de 'second-set rejection'. Indien een huid-allotransplantaat is afgestoten en 10 dagen daarna een tweede transplantaat van dezelfde donor wordt aangebracht, wordt dit versneld in 4 tot 7 dagen afgestoten. Dit noemt men de second-set-rejection. Maar indien binnen 7 dagen na afstoting van de first set het tweede transplantaat wordt getransplanterd, dan wordt deze niet gevasculariseerd en als 'white graft' afgestoten.

3.6. Immunosuppressie

3.6.1. Inleiding

De immunosuppressieve middelen worden in twee groepen ingedeeld: de farmacologische en de biologische. Beide groepen zullen achtereenvolgens besproken worden.

3.6.2. De farmacologische immunosuppressie

Om transplantatie klinisch mogelijk te maken is lang gezocht naar middelen tot vermindering van de afstoting. Het doel is door behandeling van de ontvanger de gewenste aspecten van de immunologische reactie te behouden, in casu de weerstand tegen infecties, maar de afstotingsreactie zodanig te onderdrukken dat het transplantaat functioneel blijft. Het ideaal zou zijn om een specifieke immunologische 'unresponsiveness' te introduceren, dus uitsluitend uitschakeling van de immunologische afstotingsreactie ten opzichte van de antigenen in het transplantaat. Maar daarvoor ontbreekt op dit ogenblik de gedetailleerde kennis omtrent de werking van immunosuppressiva en van de exacte totstandkoming van de immunologische afstotingsreactie. Eén van de mogelijkheden is het selectief verwijderan van

de voor afstoting verantwoordelijke lymfocyten, dit is echter een moeilijke procedure. De farmacologische methode van immunosuppressie, waarbij het gehele immuunapparaat niet selectief wordt onderdrukt, wordt al sinds vele jaren met wisselend succes toegepast. De gebruikte farmaca kunnen als volgt worden ingedeeld: 1) steroïden, o.a. prednisolon; 2) antimetaboliëten, o.a. methotrexaat; 3) purine analogen, zoals 6-mercaptopurine (6-MP) en azathioprine (Imuran); 4) pyrimidine analogen, zoals cytosine-arabinoside; 5) alkylerende stoffen, o.a. cyclofosfamide en 6) antibiotica, zoals actinomycine. De klinisch meest toegepaste farmaca zijn de corticosteroiden en Imuran (Zukoski, 1977).

De werking van de steroïden is nog onbekend (Elion, 1977). Het meest waarschijnlijk is dat zij hun gunstige werking uitoefenen door onderdrukking van de ontstekingsreactie. Omdat van de werking van de thiopurinen iets meer bekend is zullen we deze bespreken. Het tijdstip van toedienen is bij gebruik van de thiopurinen zeer belangrijk. De werking is optimaal bij toediening kort na de antigene stimulus, het van te voren toedienen of te laat geeft geen of geringe suppressie. Dit in tegenstelling tot de steroïden die een betere suppressie geven indien vóór de transplantatie met toediening wordt begonnen. De dosis antigeen geleverd door het transplantaat is ook belangrijk: Imuran, toegediend na de antigene stimulus, is meer suppressief indien de dosis antigeen hoog is. Dit weer in tegenstelling tot de steroïden die meer suppressief zijn bij lage doses antigeen. Doordat omtrent de rol van de lymfocyten subpopulaties meer inzicht is verkregen, is ook meer bekend geworden over de werking van de immunosuppressiva. Bach (1975) postuleerde dat azathioprine waarschijnlijk actiever is tegen T lymfocyten dan tegen B lymfocyten. Het azathioprine wordt onder invloed van sulfhydryl bevattende groepen afgebroken en valt dan uiteen in 6-MP en bijproducten (Chalmers, 1967; Elion, 1968; de Miranda., 1973). Toch is azathioprine in vele opzichten effectiever dan 6-MP. Dit kan zijn oorzaak hebben in een reactie van het azathioprine met specifieke receptoren op lymfocyten, waardoor de reactie met antigeen wordt geblokkeerd (Elion, 1977). Een andere mogelijkheid is dat *in vivo* een gunstige concentratie ontstaat van de effectieve afbraakproducten van Imuran, aangezien deze geleidelijker vrijkomen. Dit is een farmacodynamisch voordeel naast het voordeel dat Imuran oraal kan worden toegediend. De werking van immunosuppressiva kan zeer selectief zijn ten aanzien van het type transplantatie (gevasculariseerd versus vrij), zoals Alexandre (1963) en Murray (1964) aantoonde bij honden. Overlevingstijden van niertransplantaten werden wel verlengd door azathioprine, terwijl huidtransplantaten in de normale tijd werden afgestoten. Het zal nog wel enige tijd duren voordat de exacte werkingsmechanismen van de immunosuppressiva bekend zijn, zodat mogelijk met behulp van deze kennis een specifieke immunologische 'unresponsiveness' kan worden geïnduceerd. Dit zou zeer welkom zijn omdat de meeste immunosuppressiva toxisch zijn en ook lymfocyten-depletie door antilymfocytenserum nog niet ideaal is, zoals in de volgende paragraaf beschreven wordt.

3.6.3. De biologische immunosuppressie door antilymfocytenglobuline (ALG)

Lymfocyten spelen een zeer belangrijke rol bij zowel de cellulaire als humorale component van de afstotingsreactie. De aandacht werd daarom al bij de aanvang van het onderzoek gevestigd op het specifiek uitschakelen van lymfocyten als methode van immunosuppressie. Aanvankelijk werden chirurgische en fysische methoden, zoals *ductus thoracicus* drainage en extracorporale bestraling gebruikt, gevolgd door een meer immunologische methode; het toedienen van een serum gericht tegen lymfocyten (antilymfocyten serum: ALS). Dit serum wordt bereid door het injiceren van proefdieren met lymfocyten uit de milt en het bloed van een bepaalde species. Gewoonlijk worden ook antilichamen opgewekt tegen erythrocyten en bloedplaatjes. Lymfocyten die verkregen worden uit de *ductus thoracicus* geven aanleiding tot goede sera maar zij zijn moeilijk verkrijgbaar. Tegenwoordig worden thymocyten of gekweekte lymfoblasten gebruikt als bronnen van antigeen. De productiedieren zijn meestal paard, geit, konijn en koe, dit is een pragmatische keuze. Het is noodzakelijk om diverse diersoorten te gebruiken, omdat patiënten na injectie van het ALS gesensibiliseerd kunnen worden voor de immuunglobulines van één diersoort. In plaats van serum wordt tegenwoordig gebruik gemaakt van de sterk gezuiverde IgG fractie van ALS (Betel, 1970). De immunosuppressieve werking van ALG wordt toegeschreven aan de selectieve verwijdering van circulerende T lymfocyten. Dat de T cellen zo selectief worden uitgedund kan komen omdat zij: zeer gevoelig zijn, zich traag vermeerderen of omdat het ALG specifiek tegen de T lymfocyt is gericht. Vooral voor de laatste mogelijkheid wordt steun gevonden. Een groot probleem bij de klinische toepassing van het ALG is de variabiliteit van de immunosuppressieve potentie. *In vitro* systemen om deze potentie te bepalen zijn nog in ontwikkeling maar aan *in vivo* systemen, zoals de test bij apen, mag veel betekenis worden toegekend, zoals Thomas in 1977 beschreef. ALG is met succes toegepast bij klinische transplantaties van nier, hart en beenmerg (Elion, 1977). De toekomstige toepassingen kunnen zich uitstrekken tot autoimmuunziekten en mogelijk bij de voorbereiding voor de inductie van 'allogeneic unresponsiveness'.

3.7. Kanker als complicatie van klinische transplantatie

De frekwentie van het voorkomen van bepaalde maligne tumoren is sinds de aanvang van klinische niertransplantaties toegenomen. Penn (1977) heeft in Denver een informele centrale registratie ontwikkeld en onze gegevens zijn hieraan ontleend. Transplantatiepatiënten lopen volgens zijn berekeningen een risico van 5 à 6% in 10 registratiejaren om een maligniteit te ontwikkelen. Dit is 100 x groter dan het risico van een vergelijkbare leeftijdsgroep. Hierbij zijn opvallend veel huidcarcinomen (182 van de 453) en solide lymfomen (103 van de 453). De gemiddelde leeftijd was laag, 36,7 jaar voor de lymfomagroep en 40,5 voor de andere tumoren. Dit is veel jonger dan men mag verwachten voor carcinoom patiënten. De gemiddelde tijdsduur tussen het begin van de 'oncogene stimulus' en de diagnose van een

maligniteit was 36 maanden. Dit is zeer kort vergeleken met de tijdsduur die gemiddeld ligt tussen b.v. bestraling en het ontstaan van schildkliercarcinoom, deze is namelijk 15 à 20 jaar. Het is mogelijk dat ook de uraemie voorafgaand aan transplantatie een immunosuppressief en ook oncogeen effect heeft. Penn gebruikte voor het verklaren van het grote aantal maligniteiten de hypothese van de 'immunosurveillance' (Burnet, 1957). De hypothese veronderstelt het bestaan van een immunocompetent systeem dat elke verandering van cellen herkent, ook een maligne ont-aarding. Deze veranderde cellen worden dan vernietigd. Dit surveillance systeem zou niet optimaal meer functioneren bij gebruik van immunosuppressiva, zodat maligniteiten de kans krijgen om zich te ontwikkelen. Als een verzwakking voor deze hypothese wordt wel aangevoerd dat indien om een andere reden immuundeficiëntie bestaat, bijvoorbeeld bij lepra of sarcoïdose de kans op maligne ont-aarding niet vergroot is. Ook nude muizen hebben geen verhoogde kans op maligne ont-aarding. Beide typen van immuundeficiëntie berusten op T-cel insufficiëntie. Van Bekkum (1975, 1978) veronderstelt dat niet T-cel deficiëntie maar B- of K-celinsufficiëntie de oorzaak is voor het verhoogd voorkomen van maligne ont-aarding. Dit laatste past bij de observatie van Penn dat immunosuppressie door Imuran tot verhoogde kans op maligne ont-aarding leidt. De immuunstimulatie is een andere hypothese. Door een zwakke immuunreactie worden sommige systemen tot prolifereren gestimuleerd, dit zou ook voor maligne cellen het geval kunnen zijn. Een derde hypothese is die van de verstoorde immunoregulatie; door het ontbreken van een terugkoppelingsmechanisme wordt de groei van maligne mutanten bevorderd.

Enkele andere oorzaken die wel genoemd worden, zijn: een verminderde weerstand tegen oncogene virussen, een specifiek oncogene werking van immunosuppressiva en fotosensibilisatie van de huid waardoor onder invloed van ultraviolette stralen carcinomen kunnen ontstaan. Nu is aangetoond dat voor met immunosuppressiva behandelde patiënten een sterk verhoogde kans op de ontwikkeling van kwaadaardige tumoren bestaat, dient dit risico in de overwegingen voor het toepassen van immunosuppressiva bij behandeling van niet-levensbedreigende aandoeningen te worden betrokken.

HOOFDSTUK IV

IMMUNOLOGISCHE EXPERIMENTEN

4.1. Probleemstelling

De resultaten van transplantaties met autogene perifere zenuwen zijn over het algemeen goed (Millesi 1968), terwijl die met allogene zenuwen sterk uiteenlopen, nl. van goed in het hondenmodel (Marmor 1967) tot onmogelijk bij klinische toepassing (Comtet 1972). De algemene opvatting is dat allogene transplantaten slechts dienen als matrijs en dat een transplantaat niet vitaal behoeft te zijn.

Uit de literatuur blijkt niet duidelijk dat de slechte resultaten van de allotransplantaties het gevolg zijn van een immunologische afstotingsreactie (Marmor, 1967). Echter, alles wijst er op dat het genoemde verschil te maken heeft met de transplantatiereactie die ook bij andere transplantaten optreedt, maar het is niet duidelijk welke component van het perifere zenuwtransplantaat die reactie teweeg brengt en of gede vitaliseerde allotransplantaten nog immunogene eigenschappen zouden bezitten. De literatuur laat veel twijfel bestaan over de vraag of vitaal en niet-vitaal zenuwweefsel sterk of zwak immunogeen is vergeleken met andere weefseltransplantaten. De verwarring werd mede veroorzaakt door de goede resultaten die bereikt werden met bestraalde allogene en xenogene bottransplantaten. Dit bestraalde bot was gede vitaliseerd en had alleen een functie als steunweefsel. Dit is de reden dat orthopaedisch chirurgen waaronder met name Campbell, Marmor en Hirasawa veel onderzoek over perifere zenuwtransplantaties verricht hebben.

In dit proefschrift werd nagegaan of de immunogene eigenschappen van zenuwweefsel op de aanwezigheid van transplantatieantigenen berust. Er werd een systematisch onderzoek naar de immunogeniciteit ingesteld, waarbij gebruik gemaakt van de volgende immunologische regels.

1. Een antigeen allotransplantaat kan bij een onbehandelde ontvanger een typische afstotingsreactie opwekken.
2. Een allotransplantaat met identieke weefselantigenen als een voorafgaand transplantaat zal gewoonlijk versneld worden afgestoten, (de zogenaamde 'second set' afstoting).
3. Na transplantatie met vreemde weefselantigenen kan antilichaamvorming bij de ontvanger aangetoond worden.
4. De afstotingsreactie welke veroorzaakt wordt door weefselantigenen zal onderdrukt moeten kunnen worden door behandeling van de ontvanger met immunosuppressiva.

Deze basale experimenten werden bij ratten verricht in donor-gastheer combinaties waarvan reeds veel transplantatie-immunologische gegevens bekend waren. De experimenten werden zodanig ontworpen dat vergelijking van grote groepen gedurende langere tijd met reproduceerbare resultaten mogelijk was. De rat is voor deze studies een ideaal proefdier, in de eerste plaats omdat ingeteelde stammen in vol-

doende mate voorhanden zijn en de huisvesting van grote aantallen ratten weinig ruimte vergt en op de tweede plaats omdat orthotope zenuwtransplantatie bij ratten technisch mogelijk is. Voor de bovenvermelde basisstudies werd een heterotope transplantatieopstelling gebruikt, waarbij stukjes zenuwweefsel onder het nierkapsel werden getransplanteerd. De nier werd boven andere plaatsen verkozen, omdat was aangetoond dat veel weefsels daar uitstekend groeien en dat de immunologische afweerreactie van de gastheer op die plaats normaal verloopt (Metcaif, 1965). De techniek is eenvoudig en niet-lederend; bovendien is de plaats van het implantaat zelfs na een aantal maanden nog duidelijk herkenbaar. Dit laatste in tegenstelling tot bijvoorbeeld de subcutane zenuwtransplantatie zoals beschreven door Marmor (1967, 1968).

4.2. Materiaal en methoden

4.2.1. Proefdieren

Als proefdieren werden twee ingeteelde rattenstammen gebruikt, de WAG/Rij en de BN/Bi, (In het navolgende BN genoemd). De ratten werden gefokt onder specifiek pathogeen-vrije omstandigheden en waren vrij van PPLO (pleura-pneumonia-like organisms) en andere endemische infecties. Als ontvangers fungeerden mannelijke WAG/Rij ratten van 250-350 gram. Als donoren werden mannelijke WAG/Rij en BN ratten van 200-250 gram gebruikt. De genetische homogeniteit van beide rattenstammen is bevestigd door de permanente overleving van huidtransplantaten binnen de stam. BN-huid wordt altijd binnen 11 dagen na transplantatie door WAG/Rij ontvangers afgestoten. De rattenstammen werden door Dr. O. Stark en medewerkers van de Karel Universiteit van Praag getypeerd. De BN-stam bleek het H-1ⁿ (Ag-B³) allele van het belangrijkste histocompatibiliteitssysteem (H-1) (Ag-B) te dragen, terwijl de WAG/Rij stam het H-1^w (Ag-B²) allele bevat.

4.2.2. Het prepareren van het implantaat en de implantatie onder het nierkapsel

De donor werd door middel van ether gedood en beide nervi-ischiadici werden over een afstand van ± 30 mm vrijgeprepareerd en uitgenomen. Met behulp van een scheermes werden stukjes n-ischiadicus van ± 4 mm afgesneden, welke werden bewaard in Tissue Culture Medium 199 (TCM 199, Difco) bij een temperatuur van 4° C. [De voorkeur werd gegeven aan TCM 199 omdat fysiologisch zout bij histochemisch onderzoek toxisch was gebleken (Betty Pinner citaat in Campbell, 1964).] Onmiddellijk hierna werden de stukjes zenuw onder het nierkapsel getransplanteerd. Op verschillende dagen na transplantatie werden 3 ontvangers door middel van ether gedood en de nier vrijgeprepareerd. Het implantaat was steeds duidelijk zichtbaar en hoewel het macroscopische aspect reeds een zekere indruk gaf omtrent de toestand van het implantaat, werd dit niet in de uiteindelijke beoordeling betrokken wegens de onnauwkeurigheid van deze methode. Een stukje nier met

transplantaat werd gefixeerd in een gebufferde formalineoplossing van 4%, vervolgens histologisch verwerkt en gekleurd met een haematoxyline-phloxine-saffraan kleuring.

4.2.3. Beoordeling

De preparaten werden microscopisch beoordeeld bij een vergroting van 450 x.

4.2.4. Resultaten

Histologische beschrijving van de transplantaten

Isogene transplantaten

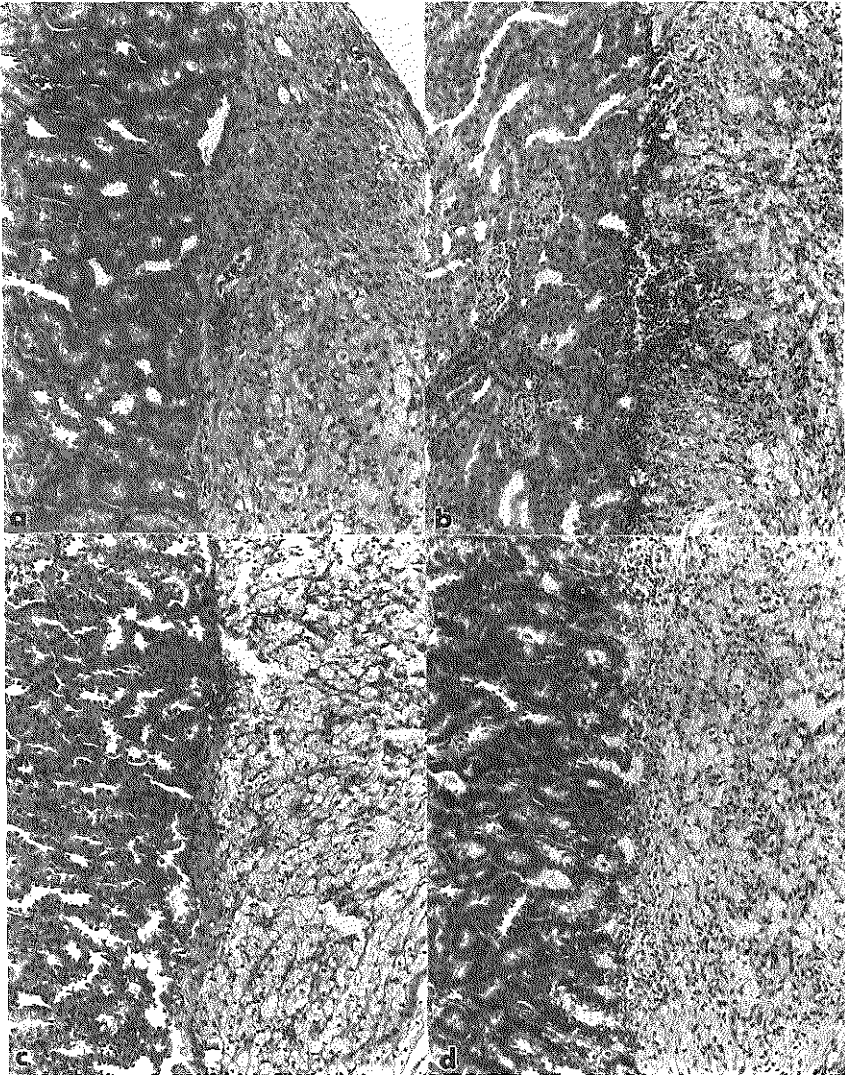
Op dag 3, 7, 9, 11, 14, 30 en 110 na transplantatie werden telkens 3 ratten gedood en de transplantaten histologisch verwerkt.

- Dag 3 Spaarzaam lymfocytair infiltraat, ingroeiende bloedvaten en beginnende uitgroei van cellen van Schwann en endo- en peri-neurale cellen.
- Dag 7 Geen infiltraat, nog duidelijker ingroei van bloedvaten en uitgroei van cellen van Schwann en endo- en perineurium. Alle cellen van de zenuw maken een vitale indruk.
- Dag 9 De grens tussen nier en transplantaat vervaagt. Duidelijke doorgroei van vaten uit de nier in het transplantaat. Uitgroeiende fibroblasten infiltreren tussen de niertubuli.
- Dag 11 De grens tussen nier en transplantaat vervaagt steeds meer, bloedvaten zijn overvloedig aanwezig in het transplantaat. Er is geen infiltraat. De zenuwcellen desintegreren en verliezen veel van hun myeline.
- Dag 14 Als dag 11, echter er is uitgroei van de cellen van Schwann. (Fig. 4.2.4a)
- Dag 30 De cellen van Schwann zijn vervangen door collageen bindweefsel in het verloop van de vroegere axonen. Bloedvaten en macrofagen bevinden zich overal in het transplantaat.
- Dag 110 Het transplantaat is vervangen door collageen bindweefsel. Het aantal vitale cellen is minimaal.

Allogene transplantaten

Op dag 3, 7, 9, 11, 14, en 20 na transplantatie werden telkens drie ratten gedood en de transplantaten histologisch bewerkt.

- Dag 3 Op het grensvlak van nier en transplantaat bevinden zich veel lymfocyten, vooral aan de snijvlakken van het transplantaat. Er bevinden zich veel lymfocyten tussen de niertubuli. Alle cellen van de zenuw maken een vitale indruk, het myeline begint te desintegreren.
- Dag 7 Het infiltraat breidt zich verder uit, het bevindt zich ook in de zenuw, vooral rond de ingegroeide bloedvaten. De cellen van de zenuw maken een vitale indruk; groeien echter uit.
- Dag 9 De ingroei van bloedvaten wordt sterker, terwijl zich rond de bloedvaten veel infiltraat ophoopt. Het nierkapsel is verdikt en er bevindt zich veel



Figuur 4.2.4. (a-d)

Histologische preparaten van onder het nierkapsel getransplanteerde stukjes perifeer zenuwweefsel, 14 dagen na transplantatie (vergroting 135 \times).

Het transplantaat bevindt zich rechts.

- a Isogeen transplantaat (WAG/Rij \rightarrow WAG/Rij). Uitgroeide cellen van Schwann en afwezigheid van infiltraat.
- b Allogeen transplantaat (BN \rightarrow WAG/Rij). Duidelijk infiltratie.
- c Diepgevroren, bestraald (2.5 Mrad) allotransplantaat. Geen infiltratie en afwezigheid van vitaliteit (tabel 5.3.2.d).
- d Allogeen transplantaat. De ontvanger werd behandeld met ALG (tabel 4.5.3.), er is opvallend weinig infiltraat en duidelijke uitgroei van de cellen van Schwann.

- adherent vetweefsel. Het aantal vitale cellen van de zenuw neemt af.
- Dag 11 Het transplantaat is overladen met lymfocytair infiltraat; aan het grensvlak bevinden zich massale infiltraten. De zenuwcellen zijn nog als schimmen aanwezig en er begint structuurverlies van het endoneurium op te treden.
- Dag 14 De lymfocyttaire infiltratie is massaal. Alle zenuwcellen zijn gedesintegreerd en vertonen kernfragmentatie, macrofagen komen in groten getale voor en aan de grenzen bevinden zich reuscellen. De endoneurale tussenschotten zijn op veel plaatsen verbroken. Het nierkapsel is sterk verdikt en bevat veel bloedvaten. Het transplantaat kan als afgestoten worden beschouwd, de oprui-reactie is begonnen. (Fig. 4.2.4b)
- Dag 20 De infiltratie is nog massaal, er worden veel plasmacellen, lymfocyten en macrofagen in het transplantaat aangetroffen. Dicht bij het grensvlak is het transplantaat geheel gefagocyteerd. Tussen epi- en perineurium bevindt zich veel infiltraat.

Uit de vergelijking van allogene transplantaten met isogene transplantaten kunnen de hieronder gegeven conclusies worden getrokken betreffende de afstotingsreactie. Bovendien konden de diverse stadia van de afstoting bepaald worden, terwijl tot een kwantificering van infiltraat en destructie van het zenuwweefsel kon worden gekomen. Deze kwantificering werd gebruikt als referentiekader bij de beschrijving van de hierna volgende experimenten.

4.2.5. Conclusie

De afstoting van een allogene zenuw verloopt volgens eenzelfde patroon en in hetzelfde tijdsbestek als de afstoting van huid. De plaats van het infiltraat en van de ingroei van bloedvaten is voornamelijk het snijvlak van de zenuw en niet het epi- en perineurium. Deze bevindingen wijzen er op dat het weefsel van de perifere zenuw antigene eigenschappen heeft. Deze antigeniciteit komt het duidelijkst tot uiting aan het neuron.

4.3. Immunisatie experimenten

4.3.1. Probleemstelling

Indien weefsel met dezelfde transplantatie-antigenen als een voorafgaand transplantaat wordt getransplanteerd bij dezelfde ontvanger, dan wordt dit weefsel versneld afgestoten. Men noemt deze versnelde afstoting de 'second set' reactie.

Een weefsel dat transplantatieantigenen bevat zal dus een second set reactie moeten kunnen uitlokken en bovendien versneld worden afgestoten na voorafgaande transplantatie van een huidtransplantaat met dezelfde antigenen. De eerste transplantatie sensibiliseert de ontvanger voor de tweede transplantatie.

Optreden van de second set reactie, (sensibilisatie na transplantatie van perifeerzenuwweefsel) steunt de opvatting dat dit weefsel antigene eigenschappen heeft.

Daarom werd een reeks experimenten ontworpen om na te gaan of zenuwweefsel sensibiliserend zou zijn voor huid of voor een tweede zenuwtransplantaat en of primaire huidallotransplantatie sensibiliserend zou zijn voor een daaropvolgende transplantatie van zenuwweefsel.

4.3.2. Methode van onderzoek bij de immunisatie studies

A. Bereiding van het zenuwhomogenaat

Bij de proeven waarbij met perifeer zenuwweefsel werd gesensibiliseerd werd gebruik gemaakt van een homogenaat, waarmee beoogd werd een betere expositie van de antigenen te verkrijgen. Bovendien laat een homogenaat zich goed mengen met Freund's compleet adjuvant. Het homogenaat werd als volgt bereid:

Onder ether narcose werd de nervus ischiadicus uit donorratten genomen. De zenuwen werden met een schaar in kleine stukjes geknipt en na toevoeging van TCM 199 werd het weefsel gehomogeniseerd. Dit gebeurde in een Sorvall microhomogenisator in ijswaterkoeling bij 19.000r/min.

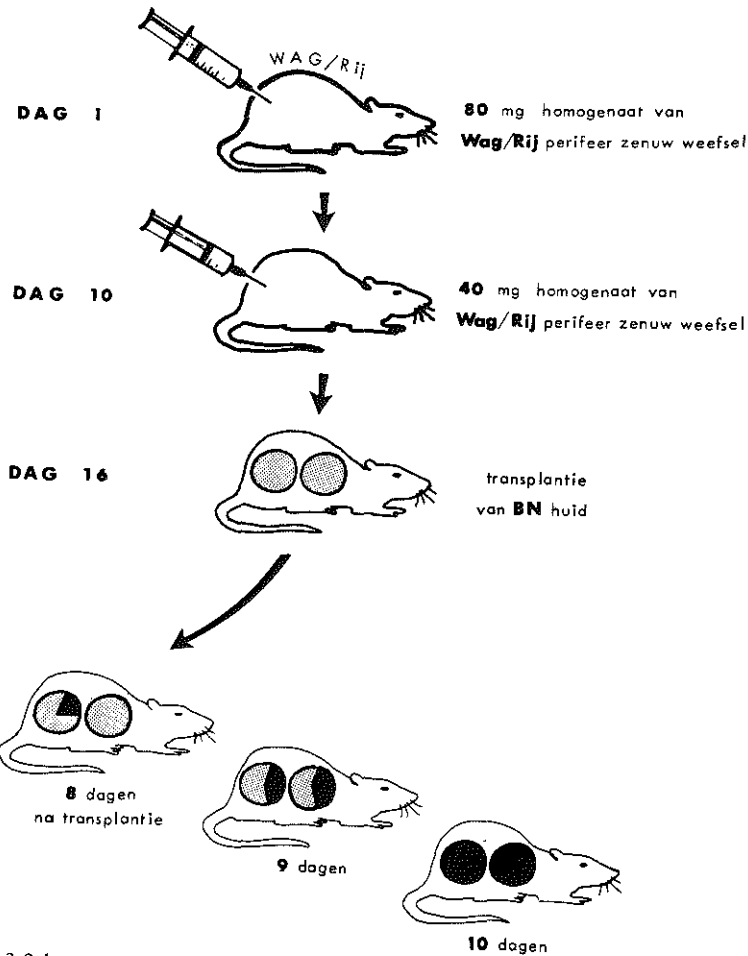
B. Huidtransplantatie

De procedure is een standaard techniek in het Radiobiologisch Instituut TNO en is uitgebreid beschreven door Balner (1969). Uit de buikhuid van geschoren donorratten werden transplantaten van 22 mm ϕ geponst. Bij geschoren ontvangers wordt onder ether narcose een dubbele huidstans van 20 mm ϕ uit de rug geponst. In de ontstane gaten wordt een transplantaat gelegd, waarna het transplantaat wordt bedekt met paraffinegas en tissue-paper. De rat wordt omwikkeld met tape. De beoordeling van het transplantaat geschiedt macroscopisch, de huid wordt als afgestoten beschouwd, indien de gehele epidermis necrotisch is.

C. Uitvoering van de sensibilisaties en 'second set' test

I. Huid 'second set' na sensibilisatie met zenuwweefsel (Fig. 4.3.2.1. en 4.3.2.2.). Vijf WAG/Rij ratten werden met 80 mg BN zenuwhomogenaat in voetzolen en subcutis van de hals geïnjecteerd. Op dag 10 werd 40 mg zenuwhomogenaat intraperitoneaal gespoten en op de dag 16 werd BN-huid op bovenbeschreven wijze getransplanteerd. De huiden werden op dag 8, 9 en 10 na transplantatie beoordeeld. Ter vergelijking werd dezelfde procedure herhaald bij vier WAG/Rij ratten, die met WAG/Rij zenuwhomogenaat werden ingespoten.

II. Zenuw 'second set' reactie na sensibilisatie met zenuw. Tien WAG/Rij ratten werden op bovenbeschreven wijze met 80 mg homogenaat in voetzolen en hals gesensibiliseerd. Op dag 10 werd 40 mg homogenaat als booster intraperitoneaal toegediend. Op dag 16 werden stukjes perifeer BN zenuw onder het nierkapsel getransplanteerd en op dag 2, 3, 4, 5 en 6 na transplantatie werd steeds van 2 ratten het transplantaat histologisch beoordeeld en vergeleken met een groep van met WAG/Rij homogenaat ingespoten ratten.

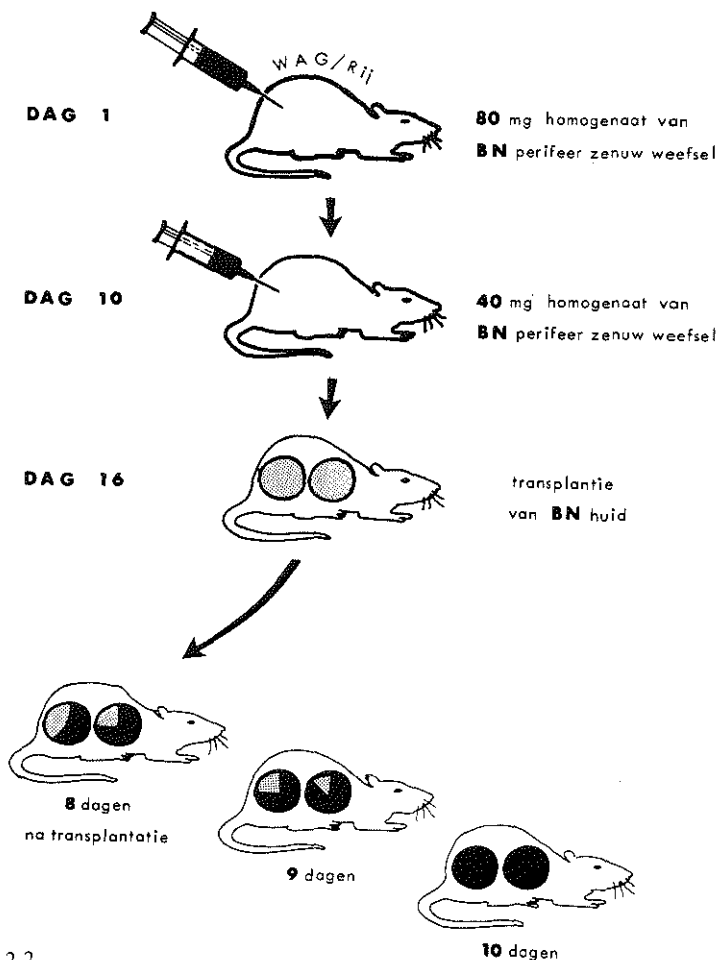


Figuur 4.3.2.1.
Normale afstoting van allogene huidtransplantaten na voorafgaande injectie van isogeen zenuw-homogenaat.

III. Zenuw 'second set' reactie na sensibilisatie met huid. Bij een groep van 10 WAG/Rij ratten werd op de bovenbeschreven wijze BN huid getransplanteerd. Op dag 16 werden onder het nierkapsel een stukje perifeer BN zenuwweefsel getransplanteerd en op dag 2, 3, 4, 5 en 6 na transplantatie werd steeds van 2 ratten het transplantaat histologisch beoordeeld en vergeleken met een groep van met WAG/Rij huid getransplanteerde ratten.

4.3.3. Resultaten van de immunisatieexperimenten

Groep I. Immunisatie met isogeen homogenaat met 'booster' injectie, gevolgd door allogene huidtransplantatie. De resultaten zijn weergegeven in tabel 4.3.3. en in figuur 4.3.2.1.



Figuur 4.3.2.2. 'Second-set' afstoting van allogene huidtransplantaten na sensibilisatie met allogeen zenuw-homogenaat.

Groep II. Immunisatie met allogeen homogenaat met 'booster' injectie, gevolgd door allogene huidtransplantatie. De resultaten zijn weergegeven in tabel 4.3.3. en in figuur 4.3.2.2.

Uit de experimenten waarbij een allogeen huidtransplantaat wordt beoordeeld na sensibilisatie met gehomogeniseerd perifeer zenuwweefsel (Tabel 4.3.3.B.) blijkt dat er een duidelijk vervroegde afstoting bestaat vergeleken met transplantatie na injectie met isogeen zenuwhomogenaat (Tabel 4.3.3.A.).

Histologische beschrijving van de preparaten. Op dag 2, 3, 4, 5, en 6 na transplantatie werden telkens twee ratten gedood en de transplantaten histologisch bewerkt.

Tabel 4.3.3 Afstoting van allogene huidtransplantaten bij de rat na immunisatie met gehomogeniseerd perifeer zenuwweefsel

Dag	<i>Immunisatie met zenuwhomogenaat</i>			
	A. Isogeen		B. Allogeen	
	Mate van afstoting	Mate van afstoting	Mate van afstoting	Mate van afstoting
	Links*	Rechts*	Links*	Rechts*
8	—	—	+	++
	+	—	+++	++
	+	—	+	+++
9	+	—	++	+++
	++	++	+++	++
	+	++	++	+++
10	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++

Dag = aantal dagen na transplantatie van de huid, deze transplantatie vond plaats op de 16e dag na de eerste immunisatie; dit is de 6e dag na de 2e immunisatie.

Transplantatiemodel: WAG/Rij naar BN.

Symbolen: —: soepele huid, geen tekenen van afstoting;

+: niet soepele huid; beginnende afstoting;

++: matig hard; gevorderde afstoting;

+++ : hard; implantaat is afgestoten.

* Elke ontvanger werd met 2 stukjes donorhuid getransplanteerd.

Groep III. Immunisatie met isogeen zenuwhomogenaat met 'booster' injectie, gevolgd door transplantatie van allogene zenuw.

Dag 2 Vitaal, geen infiltraat.

Dag 3 Vitaal, enig infiltraat.

Dag 4 Vitaal, enig infiltraat.

Dag 5 Minder vitaal implantaat, veel infiltraat.

Dag 6 Minder vitaal implantaat, veel infiltraat.

Groep IV. Immunisatie met allogeen zenuwhomogenaat met 'booster' injectie, gevolgd door transplantatie van allogene zenuw.

Dag 2 Vitaal implantaat, infiltraat aanwezig.

Dag 3 Vitaal implantaat, aanzienlijke infiltratie.

Dag 4 Minder vitaal, veel infiltraat.

Dag 5 Minder vitaal implantaat, veel infiltraat.

Dag 6 Minder vitaal implantaat, veel infiltraat.

Tabel 4.3.3.C Vergelijking van het verloop van de afstotingsreactie van allogeen perifeer zenuwweefsel onder het nierkapsel na immunisatie

Immunisatie met: Dag	Isogene zenuw Groep III		Allogene zenuw Groep IV		Allogene huid Groep VI	
2	+++	0	+++	++	+++	+
3	+++	+	+++	+++	++	++++
4	+++	+	++	+++	—	++++
5	++	+++	+	+++	—	++++
6	++	+++	+	+++	—	++++

Verklaring der symbolen (1ste kolom):

—: necrose, voornamelijk dode cellen en volledig structuurverlies van het endoneurale bindweefsel;

+: duidelijke verschijnselen van verminderde vitaliteit, o.a. ± 50% dode cellen en verstoorde structuur van het endoneurale bindweefsel;

++: geringe verschijnselen van verminderde vitaliteit, o.a. enkele dode cellen;

+++ : geheel vitaal.

Verklaring der symbolen (2de kolom):

0: 0-100 lymfocyten per gezichtsveld;

+: 100-250; ++: 250-400; +++: 400-750; ++++: meer dan 750.

Groep V. Immunisatie met allogene huid, gevolgd door transplantatie van isogene zenuw.

Dag 2 Vitaal transplantaat, geen infiltraat.

Dag 3 Vitaal transplantaat, geen infiltraat.

Dag 4 Vitaal transplantaat, geen infiltraat.

Dag 5 Vitaal transplantaat, geen infiltraat.

Dag 6 Vitaal transplantaat, geen infiltraat.

Groep VI. Immunisatie met allogene huid, gevolgd door transplantatie van allogene zenuw.

Dag 2 Vitaal transplantaat, geen infiltraat.

Dag 3 Minder vitaal transplantaat, massaal infiltraat.

Dag 4 Necrose in transplantaat, massaal infiltraat.

Dag 5 Ernstige necrose in transplantaat, massaal infiltraat.

Dag 6 Ernstige necrose in transplantaat, massaal infiltraat.

In tabel 4.3.3.C. wordt de afstotingsreactie die allogeen perifeer zenuwweefsel onder het nierkapsel van ratten veroorzaakt na immunisatie met identieke transplantatie antigenen van zenuwweefsel en huid vergeleken met voorafgaande injectie van isogeen zenuwhomogenaat. In deze tabel komt duidelijk tot uiting dat een 'second set' reactie optreedt na immunisatie.

4.3.4. Conclusies

Na sensibilisatie met behulp van allogeen gehomogeniseerd perifeer zenuwweefsel wordt een tweede transplantaat versneld afgestoten zoals blijkt uit de experimentele groep IV. Dat dit sensibilisatie is blijkt uit de resultaten van de experimentele groep III waarbij geen versnelling van de afstoting optreedt na injectie met isogeen zenuwhomogenaat. De versnelde afstoting na sensibilisatie wordt nog eens bevestigd in experimentele groep VI, waarbij een heftige, vroege afstoting ontstaat na sensibilisatie door een allogeen huidtransplantaat. Ook wordt een huid versneld afgestoten na sensibilisatie met behulp van allogeen zenuwhomogenisaat (Fig. 4.3.2.2). Dus bij alle experimenten werd voldaan aan het tweede criterium voor het bestaan van immunogeniciteit van perifeer zenuwweefsel, namelijk dat na transplantatie van weefselantigenen een transplantaat met dezelfde weefselantigenen versneld moet worden afgestoten. Het vrij grote verschil dat bestaat tussen de zeer heftige afstoting na transplantatie van twee huidstukjes en de minder heftige afstoting na injectie van gehomogeniseerd zenuwweefsel zoals in groep VI, en IV, is vermoedelijk het gevolg van de hoeveelheid primair aangeboden antigenen.

4.4. Antilichaanvorming na immunisatie met perifeer zenuwweefsel

4.4.1. Probleemstelling

Indien in perifeer zenuwweefsel antigenen aanwezig zijn dan zullen deze bij immunisatie aanleiding geven tot de vorming van antilichamen. Een van de methoden om de aanwezigheid van antilichamen aan te tonen, is de haemagglutinatie-reactie, zoals beschreven door Gorer en Mikulska (1954). Immers, bij knaagdieren zijn transplantatieantigenen ook gebonden aan de erythrocyten. Als gevolg hiervan treedt bij contact tussen specifieke antilichamen en erythrocyten agglutinatie op.

4.4.2. Materiaal en methoden

Voor de immunisatie werd gebruik gemaakt van 80 mg gehomogeniseerde zenuw in 0,5 ml TCM 199 en 0,5 ml Freund's compleet adjuvant. Dit mengsel werd in de voetzolen van WAG/Rij ratten gespoten. Na 10 dagen werd 40 mg gehomogeniseerde zenuw in 0,5 ml TCM 199 intraperitoneaal gespoten. Zes ratten werden met allogeen materiaal en vier met isogeen materiaal geïnjecteerd. Zestien dagen na de eerste immunisatie werd bloed afgenomen en de haemagglutinatie-test in 3% Dextran^R uitgevoerd.

4.4.3. Resultaten en conclusies

De resultaten na allogene immunisatie zijn weergegeven in tabel 4.4.3. Het feit dat na immunisatie met allogeen zenuwweefsel de sera van drie van de zes ratten agglutinatie geven van allogene erythrocyten toont de aanwezigheid van antilichamen tegen de transplantatieantigenen aan. De bevinding dat de sera van 3 ratten geen agglutinatie vertonen zou verklaard kunnen worden door de slechte immuunres-

ponse capaciteit van deze rattenstam. Echter, dit zwakt de resultaten niet af. Er is namelijk duidelijk antilichaamvorming bij 3 andere ratten aangetoond en daarom leek het niet nodig meer experimenten uit te voeren. De resultaten tonen opnieuw aan dat op perifeer zenuwweefsel histocompatibiliteitsantigenen voorkomen; na isogene immunisatie kon geen agglutinatatie worden waargenomen.

Tabel 4.4.3 Haemagglutinatie-titers na immunisatie van WAG/Rij ratten met gehomogeniseerd allogeen zenuwweefsel

Rat nummer	Verdunningsfactor van het antiserum:						
	2	4	8	16	32	64	128
1	+++	+++	+++	+++	+++	(+)	—
2	—	—					
3	—	—					
4	+++	+++	+++	+++	+++	+	—
5	+++	+++	+++	+++	+++	(+)	—
6	—	—					

De reactie werd verricht met serum verkregen na immunisatie met allogeen zenuwhomogenaat. Erythrocyten: BN

4.5. Het effect van immunosuppressiva op de overleving van zenuwtransplantaten

4.5.1. Probleemstelling

Door behandeling van de ontvanger is het mogelijk de afstotingsreactie tegen niertransplantaten, huidtransplantaten, etc. te onderdrukken. De drie immunosuppressieve middelen die in de kliniek het meest gebruikt worden, n.l. azathioprine (Imuran), prednisolon en antilymfocytenglobuline, werden in het zenuwtransplantatiemodel getest. Indien perifeer zenuwweefsel antigeen is en de afstoting immunologisch is, zal immunosuppressie door middel van bovengenoemde middelen mogelijk zijn. Aldus kan de verlenging van de afstotingstijd vergeleken worden met de verlenging van de afstotingstijd van huid, hart- en niertransplantaten binnen dezelfde donor-ontvanger combinatie indien ook hier immunosuppressie wordt toegepast. Het effect van bovengenoemde immunosuppressiva op de overleving van nier-allotransplantaten en heterotopie harttransplantaten, zoals eerder beschreven door respectievelijk Tinbergen (1971) en Van Bekkum (1969) is weergegeven in tabel 4.5.1.

4.5.2. Materiaal en methoden

Op de eerder beschreven wijze werd een stukje nervus ischiadicus van 4 mm lengte via een kleine incisie, onder het nierkapsel getransplanteerd. Voor de isogene

Tabel 4.5.1 Het effect van verschillende immunosuppressiva op de overleving van nier en harttransplantaten in het BN naar WAG/Rij model

<i>Behandeling</i>	Gemiddelde overleving van	
	<i>Niertransplantaten*</i>	<i>Harttransplantaten**</i>
onbehandeld	14	9
Prednisolon 4 mg/kg/dag	32	N.G.***
Imuran 4 mg/kg/dag	41	18
Imuran + prednisolon	91	24
ALG; 20 mg/rat/week	175	75
ALG + Imuran	273	N.G.

* Tinbergen, 1971.

** Van Bekkum et al., 1969.

*** N.G. = niet getest.

transplantaties werden WAG/Rij ratten gebruikt, terwijl voor de allogene transplantaties BN ratten als donor en WAG/Rij ratten als ontvanger dienden. Voor ieder experiment werd bij 12 ratten een stukje zenuwweefsel getransplanteerd. Iedere week werden 3 ratten gedood. De transplantaten werden in 4% gebufferde formiline gefixeerd en na kleuring met haematoxyline Phloxine-saffraan histologisch beoordeeld.

Overzicht van de gebruikte immunosuppressiva,

- a. Imuran (azathioprine, Burroughs Wellcome, Londen, Engeland); dosering: 2 mg/kg lichaamsgewicht/dag, intraperitoneaal toegediend. De injecties begonnen op de dag van transplantatie en werden gestaakt op de dag dat het experiment beëindigd werd.
- b. Prednisolon (Di-Adreson-F aquosum, Organon, Oss, Holland); dosering: 4 mg/kg lichaamsgewicht, subcutaan toegediend. De toediening begon op de dag van de transplantatie en werd gestaakt op de dag dat het experiment beëindigd werd.
- c. Antilymfocytenglobuline. Gebruik werd gemaakt van een paard-anti-rat serum waaruit het globuline gezuiverd werd. Het ALG werd in het Radiobiologisch Instituut TNO bereid. Immunisatie geschiedde op dag 0, 1 en 2 met 1×10^9 cellen. Booster injectie geschiedde op dag 42 en 83; serum werd 6, 9 en 13 dagen na de laatste immunisatie afgenomen. Deze drie sera tezamen vormden 'batch C'. Hieruit werd het gammaglobuline bereid door precipitatie. Dit ALG bevatte 24,2 mg eiwit per ml en hiervan was 19,4 mg gammaglobuline. Het ALG had een lymfocytotoxiciteitstiter van 1 : 250 en toegediend in doses van 2 ml/rat op dag -1 en +1 verlengde dit serum de overleving van huidallotrans-

plantaten met gemiddeld 2 dagen. Hieruit blijkt dat dit een vrij zwakke immunosuppressieve werking had, maar er was op dat tijdstip geen ander ALG beschikbaar.

Overzicht van de verrichte experimenten:

- Groep 1. Geen immunosuppressiva; allogeen zenuwtransplantaat.
- Groep 2. Imuran 2 mg/kg lichaamsgewicht/dag; allogeen zenuwtransplantaat.
- Groep 3. Imuran 2 mg en prednisolon 4 mg/kg lichaamsgewicht/dag; allogeen zenuwtransplantaat.
- Groep 4. ALG 1,5 ml per week, gedurende 5 weken; de eerste injectie werd 7 dagen voor transplantatie gegeven; isogeen transplantaat.
- Groep 5. ALG 1,5 ml per week (als groep 4); allogeen zenuwtransplantaat.
- Groep 6. ALG 1,5 ml per week (als groep 4) + Imuran 2 mg/kg lichaamsgewicht/dag; allogeen zenuwtransplantaat.
- Groep 7. ALG 1,5 ml per week (als groep 4) + prednisolon 4 mg/kg lichaamsgewicht/dag; allogeen transplantaat.

4.5.3. Resultaten

Achtereenvolgens zullen de histologische preparaten van de verschillende experimenten besproken worden en in een schema worden weergegeven: n = 3; beoordeling 1, 2, 3 en 4 weken na transplantatie.

Groep 1. Geen immunosuppressiva; allogeen zenuwtransplantaat.

- Week 1: vitaliteit ongestoord, massale infiltratie.
- 2: verminderde vitaliteit, massale infiltratie.
- 3: necrose in de zenuw, massale infiltratie.
- 4: necrose in gehele zenuw, infiltraat neemt af.

Groep 2. Immunosuppressivum: Imuran; allogeen zenuwtransplantaat.

- Week 1: vitaliteit ongestoord, massale infiltratie.
- 2: verminderde vitaliteit, massale infiltratie.
- 3: vitaliteit sterk gestoord, diffuse infiltratie.
- 4: totale verbindweefseling, geen infiltraat.

Groep 3: Immunosuppressiva: Imuran + prednisolon; allogene zenuwtransplantatie.

- Week 1: vitaliteit ongestoord, massale infiltratie.
- 2: vitaliteit ongestoord, massale infiltratie.
- 3: vitaliteit sterk gestoord, diffuse infiltratie.
- 4: totale verbindweefseling, geen infiltratie.

Groep 4. Immunosuppressivum: ALG; isogene zenuwtransplantatie.

- Week 1: vitaliteit ongestoord, geen infiltraat.
2: vitaliteit ongestoord, geen infiltraat.
3: uitgroeiende cellen van Schwann, geen infiltraat.
4: uitgroeiende cellen van Schwann, geen infiltraat.

Groep 5. Immunosuppressivum: ALG; allogene zenuwtransplantatie.

- Week 1: vitaliteit ongestoord, geen infiltraat.
2: vitaliteit ongestoord, enig infiltraat. De cellen van Schwann groeien uit.
3: vitaliteit geheel verstoord, veel infiltraat.
4: transplantaat door collageen bindweefsel ingenomen, enig infiltraat.

Groep 6. Immunosuppressiva: ALG en prednisolon; allogene zenuwtransplantatie.

- Week 1: vitaliteit ongestoord; geen infiltraat.
2: vitaliteit ongestoord; enig infiltraat.
3: vitaliteit verstoord, veel infiltraat.
4: transplantaat door collageen bindweefsel ingenomen, enig infiltraat.

Groep 7. Immunosuppressiva: ALG en Imuran; allogene zenuwtransplantatie.

- Week 1: vitaliteit ongestoord; geen infiltraat.
2: vitaliteit ongestoord; enig infiltraat.
3: vitaliteit verstoord; veel infiltraat.
4: transplantaat door collageen bindweefsel ingenomen, enig infiltraat.

In tabel 4.5.3 zijn bovenvermelde resultaten schematisch weergegeven. Bij het beoordelen van de resultaten van het effect van immunosuppressiva valt op dat Imuran (Groep 2) slechts een gering immunosuppressief effect heeft en dat toevoeging van prednisolon de resultaten niet veel verbetert (Groep 3). Het effect van ALG is onmiskenbaar, een aanzienlijke vertraging van de afstoting wordt bereikt (Groep 5). In de eerste weken groeien de cellen van Schwann zelfs uit. Toevoeging van Imuran en prednisolon verandert hieraan niet veel.

4.5.4. Conclusies

Imuran heeft een aantoonbaar effect op de overleving van het transplantaat, hoewel het infiltraat niet merkbaar minder is dan bij de transplantatie zonder behandeling met immunosuppressiva. Dit is in overeenstemming met de bevindingen van Marmor (1967) bij de hond en, in dezelfde donor-ontvanger combinatie als door ons gebruikt, met de bevindingen van Van Bekkum (1969) voor niertransplantaties. Dit effect wordt niet gezien bij huidtransplantaties in dezelfde donor-ontvanger combinatie (Marquet, niet-gepubliceerde resultaten). Mogelijk is het verschil in immunogene dosis en de plaats van transplantatie hierbij van invloed. Toevoeging van prednisolon aan Imuran geeft geen merkbare verbetering van de resultaten.

ALG heeft een duidelijk effect op de overleving van een allogeen transplantaat,

Tabel 4.5.3 Effect van immunosuppressiva op de overleving van perifere zenuwtransplantaten

Groep 1. Onbehandeld, allogeen zenuwtransplantaat			Groep 5. ALG, allogeen zenuwtransplantaat		
Week	Vitaliteit	Infiltraat	Week	Vitaliteit	Infiltraat
1	+++	++++	1	+++	0
2	+	++++	2	+++	+
3	—	++++	3	—	+++
4	—	+++	4	—	++

Groep 2. Imuran, allogeen zenuwtransplantaat			Groep 6. ALG + prednisolon, allogeen zenuwtransplantaat		
Week	Vitaliteit	Infiltraat	Week	Vitaliteit	Infiltraat
1	+++	++++	1	+++	0
2	++	++++	2	+++	+
3	+	+++	3	+	+++
4	—	0	4	—	+

Groep 3. Imuran + prednisolon, allogeen zenuwtransplantaat			Groep 7. ALG + Imuran, allogeen zenuwtransplantaat		
Week	Vitaliteit	Infiltraat	Week	Vitaliteit	Infiltraat
1	+++	++++	1	+++	0
2	+++	++++	2	+++	+
3	+	+++	3	+	+++
4	—	0	4	—	+

Groep 4. ALG, isogeen zenuwtransplantaat		
Week	Vitaliteit	Infiltraat
1	+++	0
2	+++	0
3	+++	0
4	+++	0

Verklaring van de symbolen: zie onderschrift tabel 4.3.3.c.

De beoordeling geschiedde na 1, 2, 3 en 4 weken. n = 3.

toevoeging van prednisolon of Imuran geeft niet veel verbetering van dit effect. Bij behandeling met ALG worden de eerste 14 dagen gekenmerkt door uitgroei van de cellen van Schwann, na 4 weken wordt dit gevolgd door een snelle ingroei door gastheer-collageen bindweefsel. Het effect van ALG op de overleving van de allo-gene perifere zenuwtransplantaten bij ratten is in overeenstemming met de resultaten die verkregen worden voor niertransplantaten en in mindere mate voor hart-transplantaten (Van Bekkum, 1969). Dat dit effect verkregen wordt bij de betrekkelijk lage dosering van 2 ml/week en nog wel met een zwak preparaat, zou kunnen samenhangen met de antigeniciteit en de hoeveelheid transplantaat.

Omdat ALG en in mindere mate Imuran een vertraging van de transplantatie-reactie teweeg brengen kan opnieuw worden geconcludeerd dat perifere zenuw-transplantaten immunogeen zijn. Een vrij transplantaat wordt voornamelijk cellulair afgestoten en juist tegen deze vorm van afstoting is het ALG het meest actief.

HOOFDSTUK V

CONSERVERINGSEXPERIMENTEN MET PERIFERE ZENUWTRANSPLANTATEN

5.1. Probleemstellingen

Transplantatie van allogene perifere zenuwweefsel heeft alleen dan praktische betekenis, indien perifere zenuwen geruime tijd geconserveerd kunnen worden. Voor langdurige conservering van diverse celtypen en huid is diepvriezen, gebruik makend van cryoprotectieve stoffen, een goede methode gebleken. Om die reden werd deze methode ook voor perifere zenuwtransplantaten op zijn bruikbaarheid getoetst. Bij cel- en weefselconservering wordt er in het algemeen naar gestreefd om de viabiliteit van de cellen in stand te houden. Ten aanzien van zenuwtransplantaten waren er echter aanwijzingen dat de antigeniciteit gebonden is aan levende cellen in het transplantaat. Bij zenuwtransplantaten zou het intact houden van de viabiliteit met gebruik van cryoprotectiva dus tot minder goede resultaten van de transplantatie kunnen leiden. Om deze hypothese te testen werden methoden van preservatie, die levende cellen beschermen, vergeleken met methoden die juist maximale destructie van levende cellen veroorzaken. De bevinding van Marmor (1967) dat met ioniserende stralen behandeld perifere zenuwweefsel een niet vitaal maar bruikbaar transplantaat opleverde, wordt in dit hoofdstuk verder uitgewerkt, terwijl bovendien wordt onderzocht bij welke dosis ioniserende straling dit effect optreedt. Conservering in cialit werd onderzocht omdat Afanassieff (1967) hiermee goede functionele resultaten bereikte. De immunogeniciteit en de structuur van in cialit geconserveerde zenuwtransplantaten werd getest.

Door lyophilisatie en additionele behandelingen ontstaat een niet vitaal transplantaat; in dit hoofdstuk wordt de invloed van deze behandelingen op de immunogeniciteit en houdbaarheid van perifere zenuwweefsel beoordeeld.

De probleemstelling van de verschillende conserveringsmethoden wordt in afzonderlijke paragrafen behandeld.

Conserveringsmethoden

5.1.1. Cryopreservatie

Voor conservering van erythrocyten, lymphocyten, huid, spermatozoën en beemercellen is diepvriezen tot -192° C effectief gebleken (Doebbler en Rowe, 1966; Van Es, 1972). Men kan de cellen dan langdurig bewaren zonder aan de structuur en de levensvatbaarheid veel afbreuk te doen. Toevoegen van een cryoprotectivum is echter wel noodzakelijk. De werking van cryoprotectieve stoffen is hierop gebaseerd dat zij gemakkelijk bindingen met water kunnen aangaan. Of cryoprotectiva bescherming bieden tegen de wisselende ionenconcentraties gedurende vriezen en ontdooien, tegen de vorming van ijskristallen of tegen beide is niet duidelijk vastge-

steld. Wij kozen voor de cryoprotectie van perifere zenuwtransplantaten dimethylsulfoxide (DMSO) 15% volgens artikelen van Luyet (1957), Rowe (1966) en Doebbler (1966).

5.1.2. Radioactieve bestraling

Zoals reeds in Hoofdstuk I werd uiteengezet werd bestraling van transplantaten uitgevoerd om het implantaat te steriliseren. Deze bestraling werd verricht met een dosis van 2,5 Mrad, omdat was aangetoond dat bij deze dosis alle microorganismen gedood worden en de structuur van het collageen skelet in de zenuw (endoneurale buizen) niet gedestruëerd wordt (Jefferson, 1964; Goldblith, 1967; Schnell, 1967; Christensen, 1964; Trump, 1948). Deze bestraling zou als bijeffect tevens een vermindering van de immunogeniciteit tot gevolg hebben (Marmor, 1967), mogelijk omdat zulke hoge doses bestraling alle levende cellen vernietigen. Omdat wij in staat waren steriel te werken was de sterilisatie niet noodzakelijk en kon een experiment ontworpen worden, waarbij beoordeeld kon worden bij welke dosis de cellen gedood en het implantaat minder immunogeen wordt. Hiertoe werd een serie bestralingen uitgevoerd van 15×10^2 , 10^3 , 10^4 en 10^5 rad. De wijze van bestraling wordt in 5.2.1 beschreven.

5.1.3. Conservering met cialit

In 1967 beschreef Afanassieff zijn resultaten met perifere zenuwtransplantaten bij de mens. Hij bewaarde de transplantaten gedurende tenminste 14 dagen in cialit, een desinfectans op kwikbasis. De zenuwen werden hiertoe bij 4° C bewaard in een 0,02% oplossing van cialit in water. Wij wilden nagaan of de experimenten van Afanassieff in het dierexperiment bevestigd konden worden en zodoende een antwoord geven op de vraag of dood materiaal beter voldoet als implantaat dan zenuwen die levende cellen bevatten. Door cialit worden n.l. alle cellen gedood. Wij volgden dezelfde procedure als Afanassieff. Alvorens het implantaat in te hechten werd het gedurende 5 minuten gespoeld in TCM 199. De bevinding dat de transplantaten na deze behandeling een stugger perineurium kregen bleek een voordeel bij de orthotopie transplantatie: het stugge perineurium was gemakkelijker te hanteren en eenvoudiger aan het perineurium van de ontvanger te hechten.

5.1.4. Lyophilisatie

Er van uitgaande dat allotransplantaties van perifere zenuwen mislukken door afstoting, terwijl voor het slagen van een transplantatie slechts een niet-antigene, goed geleidende matrijs noodzakelijk is, was het belangrijk de antigene eigenschappen van gelyophiliseerde perifere zenuwtransplantaten te bestuderen. De firma B. Braun uit Melsungen, West-Duitsland, ontwikkelde aanvankelijk alleen voor menselijk dura mater een lyophilisatieprocédé. Door ditzelfde procédé op perifere zenuwen toe te passen verkrijgt men een collageen skelet van de oorspronkelijke zenuw waaruit de cellulaire elementen verwijderd zijn. Wij hebben de invloed van de

totale lyophilisatie behandeling en van de onderdelen van de behandeling op immunogeniciteit en structuur in het rattenmodel bestudeerd.

In zijn omschrijving van het lyophilisatieprocédé vermeldt Schnell (1972) dat de zenuwen binnen 24 uur na de dood uit de cadavers verwijderd en in 15% NaCl-oplossing geïncubeerd naar Melsingen verzonden werden. De extractieprocedure die Melsingen toepast is fabrieksgeheim. Derhalve werd een eigen procedure ontworpen die bestond uit: In het laboratorium werd de zenuw in een (15%) NaCl-oplossing gewassen, vervolgens geëxtraheerd in een aceton-ether mengsel en gelyophiliseerd in het Virtis apparaat.

5.2. Methoden van onderzoek

5.2.1. Methode van onderzoek bij de experimenten met conserveringsvloeistoffen, bij verschillende conserveringstemperaturen en met radioactieve bestraling

Er werd gebruik gemaakt van isogene en allogene zenuwtransplantaten onder het nierkapsel in de reeds eerder beschreven donor-ontvanger combinaties. Daarbij dienden de isogene transplantaten vooral voor de beoordeling van de vitaliteit. Door de allogene transplantaten te vergelijken met de isogene kon het effect op de antigeniciteit beoordeeld worden. Als totale bewaartijd werd steeds 60 minuten aangehouden bij een conserveringstemperatuur van -192°C , 4°C of 20°C . Als conserveringsmedium werd TCM 199 gebruikt, soms met toevoeging van DMSO (15%) als cryoprotectivum. De temperatuur van -192°C werd bereikt door onderdempeling in vloeibare stikstof. Voor transplantatie werd snel ontdooid in een groot volume TCM 199 bij 20°C . De bovenbeschreven experimenten werden nog uitgebreid met experimenten waarbij gecombineerd werd met radioactieve bestraling. Behalve de sterilisatiedosis van 2,5 Mrad (uitgevoerd in het Reactor Centrum Nederland, Petten) werd een opklimmende bestralingsreeks van 15×10^2 tot 15×10^5 rad onderzocht. Hiervoor werd een opstelling gemaakt rond de gammabron van het Radiobiologisch Instituut TNO. De technische dienst ontwikkelde een koelinstallatie welke met behulp van vloeibare lucht de zenuwpreparaten op een temperatuur van -24°C hield. De temperatuur werd elektronisch bewaakt. De voor iedere bestraling benodigde tijd werd met behulp van een daartoe ontwikkelde tabel berekend. De bestralingsreeks werd uitgevoerd om te kunnen bepalen bij welke stralingsdosis immunogeniciteitsreductie optrad.

Voor de cialit experimenten werden stukjes perifere zenuw van BN en WAG/Rij ratten 14 dagen geïncubeerd in een 0,02% cialit-oplossing en bewaard bij 4°C . Voor transplantatie onder het nierkapsel werd 5 minuten gespoeld in TCM 199.

5.2.2. Methode van onderzoek bij de experimenten met gelyophiliseerde allogene zenuwtransplantaten

Gebruik werd gemaakt van zenuwtransplantatie onder het nierkapsel in de bekende BN naar WAG/Rij donor-ontvanger combinatie. Per experiment werden drie ontvangers gebruikt. Het eerste experiment werd uitgevoerd met zenuwen afkomstig uit het Radiobiologisch Instituut TNO, die in Melsungen door de firma B. Braun werden bewerkt. De andere experimenten werden verricht met zenuwen die in Rijswijk met het Virtis-apparaat (Gardener, New York) werden gelyophiliseerd. Na verwijderd te zijn uit de donor werden de zenuwstukjes tenminste 24 uur in 15% NaCl-oplossing geïncubeerd. Hierna werden de transplantaten voor het eerste experiment per expresse naar Melsungen gezonden of voor de andere experimenten in het eigen laboratorium verder bewerkt. Alle transplantatie-experimenten duurden 14 dagen omdat uit voorgaande experimenten (4.2.4.) was gebleken dat op dit tijdstip de mate van infiltratie en de toestand van het implantaat het best kon worden beoordeeld. De nier met het implantaat werd in gebufferde 4% formaline gefixeerd en volgens de HPS techniek gekleurd.

De volgende procedures werden achtereenvolgens getest:

1. Na bewerking van de zenuwstukjes in Melsungen vond in Rijswijk incubatie in TCM 199 plaats en werden deze onder het nierkapsel getransplanteerd.
2. De zenuwstukjes werden na incubatie in NaCl gespoeld in TCM 199 en getransplanteerd.
3. De zenuwstukjes werden in 20 uur gelyophiliseerd in het Virtis apparaat.
4. De zenuwstukjes werden geëxtraheerd in een aceton-ether mengsel, gedroogd en na spoelen in TCM 199 onder het nierkapsel getransplanteerd.
5. Zo volledig mogelijk werd de behandeling in Melsungen nagebootst. Na extractie in aceton-ether mengsel en 20 uur lyophilisatie van de zenuwstukjes werd na droging en spoelen in TCM 199 getransplanteerd.

5.3. Resultaten

5.3.1. Beoordelingscriteria

A. De mate van infiltratie en de vitaliteit van het implantaat worden aangeduid met de symbolen zoals aangegeven in tabel 4.3.3.c.

B. *Structuur.* De opbouw van het endoneurale bindweefsel werd bestudeerd. Indien het normale patroon werd aangetroffen werd dit met een + gewaardeerd, terwijl meer dan 30% destructie van de endoneurale structuur met een – werd gewaardeerd.

5.3.2. Cryopreservatie

De resultaten zijn weergegeven in tabel 5.3.2.a en b. Door gebruik te maken van isogene transplantaten kon inzicht worden verkregen omtrent de invloed van de gevolgde procedures op vitaliteit en structuur. Het blijkt dat conservering gedurende 60 minuten bij 4° C in TCM 199 geen nadelige invloed op vitaliteit en structuur van de transplantaten heeft. Toevoeging van DMSO heeft geen ander effect bij 4° C, maar is essentieel bij diepvriezen tot -192° C. Indien geen DMSO wordt toegevoegd, blijken celvitaliteit en structuur ernstig aangetast. De waarneming dat directe conservering bij -192° C zonder medium geen verlies van celvitaliteit en structuur oplevert wijst op een schadelijke invloed van een waterig milieu, althans bij transplantaten van deze afmetingen. Na allogene transplantatie blijken deze zelfde effecten op te treden hetgeen tot uiting komt in infiltratie van die transplantaten die in de isogene situatie vitaal bleken te zijn. De afname van de celvitaliteit in de optimaal gepreserveerde zenuwen moet worden toegeschreven aan de afstotingsreactie (veel infiltratie). In de groepen zonder infiltratie was de structuur weg omdat de preservatie slecht was.

Radioactieve bestraling. In de groepen waarbij radioactieve bestraling (2,5 Mrad) met cryopreservatie van isogene transplantaten werd gecombineerd (Tabel 5.3.2.c.) blijkt dat de celvitaliteit nihil is en de structuur gespaard. Alleen indien diepgevroren wordt zonder cryopreservatie wordt de structuur geschaad. Bij de allogene transplantaten worden dezelfde effecten geconstateerd. (Tabel 5.3.2.d) Bovendien blijkt radioactieve bestraling (2,5 Mrad) de immunogeniciteit te reduceren. De resultaten met de opklimmende reeks bestralingen zijn weergegeven in de tabellen 5.3.2.e en f. De resultaten geven aan dat tot en met 1500 rad de vitaliteit en structuur van zenuwweefsel niet waarneembaar wordt aangetast. Bij 15.000 rad blijkt in de isogene groep de vitaliteit duidelijk gestoord, maar in de allogene groep veroorzaakt het transplantaat nog een aanmerkelijke infiltratie. Door de afstotingsreactie wordt de structuur geschaad, terwijl bij afwezigheid van de afstotingsreactie (meer dan 15.000 rad) de structuur behouden blijft.

Cialit. Na conservering in cialit is de celvitaliteit afwezig maar blijft de structuur behouden. Dientengevolge treedt in de allogene situatie geen infiltratie op (Tabel 5.3.2.g.).

Lyophilisatie. Uit de resultaten van de in ons eigen laboratorium uitgevoerde lyophilisatie experimenten (Tabel 5.3.2.h.) blijkt dat reeds na conservering in de NaCl-oplossing alle cellen gedood zijn en daardoor de immunogeniciteit verdwenen. Maar wij konden niet bereiken dat de endoneurale buizen leeg gemaakt werden. Dit gelukte in het laboratorium van Melsing wel. Hierdoor ontstond een niet-immunogeen transplantaat met lege endoneurale buizen, dat door radioactieve bestraling (2,5 Mrad) gesteriliseerd werd. Omdat dit transplantaat veelbelovend leek te zijn werd dit in de orthotope situatie bij apen getest (7.4.3.).

Tabel 5.3.2.a Effect van verschillende conserveringsmethoden op de overleving van isogene zenuwtransplantaten onder het nierkapsel

Conserverings-temperatuur	Conserverings-medium	Infiltratie	Cel vitaliteit	Structuur
4° C	TCM 199	—	+	+
	TCM 199 + 15%	—	+	+
	DMSO			
-192° C na 30 min. incubatie bij 4° C	TCM 199	—	—	—
	TCM 199 + 15%	—	+	+
	DMSO			
-192° C direct	TCM 199	—	—	—
	TCM 199 + 15%	—	+	+
	DMSO			
	geen	—	+	+

De conserveringstijd bedroeg 60 minuten. n = 3; beoordeling 14 dagen na transplantatie.

Tabel 5.3.2.b Effect van verschillende conserveringsmethoden op de overleving van allogene zenuwtransplantaten onder het nierkapsel

Conserverings-temperatuur	Conserverings-medium	Infiltratie	Cel vitaliteit	Structuur
4° C	TCM 199	++++	—	—
	TCM 199 + 15%	++++	—	—
	DMSO			
-192° C na 30 min. incubatie bij 4° C	TCM 199	—	—	—
	TCM 199 + 15%	++++	—	—
	DMSO			
-192° C direct	TCM 199	—	—	—
	TCM 199 + 15%	++++	—	—
	DMSO			
	geen	++++	—	—

De conserveringstijd bedroeg 60 minuten. n = 3; beoordeling 14 dagen na transplantatie.

Tabel 5.3.2.c Isogene transplantatie van perifere zenuwtransplantaten onder het nierkapsel na conservering en radioactieve bestraling

Conserverings-temperatuur	Conserverings-medium	Bestraling	Infiltratie	Celvitaliteit	Structuur
20° C	TCM 199	2,5 Mrad	—	—	+
20° C	„ + DMSO 15%	„	—	—	+
4° C	„	„	—	—	+
4° C	„ + DMSO 15%	„	—	—	+
-192° C	„	„	—	—	—
-192° C	„ + DMSO 15%	„	—	—	+

n = 3; beoordeling vond plaats 14 dagen na transplantatie.

Tabel 5.3.2.d Allogene transplantatie van perifere zenuwtransplantaten onder het nierkapsel na conservering en radioactieve bestraling

Conserverings-temperatuur	Conserverings-medium	Bestraling	Infiltratie	Celvitaliteit	Structuur
20° C	TCM 199	2,5 Mrad	—	—	+
20° C	„ + DMSO 15%	„	—	—	+
4° C	„	„	—	—	+
4° C	„ + DMSO 15%	„	—	—	+
-192° C	„	„	—	—	—
-192° C	„ + DMSO 15%	„	—	—	+

n = 3; beoordeling vond plaats 14 dagen na transplantatie.

Tabel 5.3.2.e Het effect van een opklimmende reeks bestralingen op vitaliteit en structuur van perifere zenuwweefsel

<i>Isogene zenuwtransplantaten onder het nierkapsel</i>			
Hoeveelheid rad	Infiltraat	Vitaliteit	Structuur
0	—	+	+
1.500	—	+	+
15.000	—	—	+
150.000	—	—	+
1.500.000	—	—	+

n = 3; transplantatie na 48 uur, beoordeling 14 dagen na transplantatie.

Tabel 5.3.2.f Het effect van een opklimmende reeks bestralingen op de antigeniciteit van perifere zenuwweefsel

<i>Allogene zenuwtransplantaten onder het nierkapsel</i>				
Hoeveelheid rad	Infiltraat	Vitaliteit	Structuur	
0	++++	—	—	
1500	++++	—	—	
15.000	+++	—	—	
150.000	—	—	+	
1.500.000	—	—	+	

n = 3; transplantatie na 48 uur, beoordeling na 14 dagen.

Tabel 5.3.2.g Het effect van conservering in cialit op de overleving van isogene en allogene zenuwtransplantaten onder het nierkapsel

Transplantaatsoort	Conserveringsmedium	Infiltratie	Celvitaliteit	Structuur
isogeen	cialit	—	—	+
allogeen	cialit	—	—	+

De conserveringstijd is 14 dagen. n = 3;
Beoordeling 14 dagen na transplantatie.

5.4. Conclusies

Optimaal conserveren van allogene zenuwweefsel levert nog geen goed transplantaat op, omdat door goede conservering in TCM 199 en DMSO (15%) bij -192°C de immunogeniciteit behouden blijft en de endoneurale buizen gevuld blijven. De immunogeniciteit kan effectief gereduceerd worden door bestraling, bewaren in cialit of lyophilisatie. Slechts de behandeling in Melsungen levert een niet-immunogeen collageen skelet op met lege endoneurale buizen. Daarom verdient dit lyophilisatie procédé als methode van conservering en immunogeniciteitsreductie de voorkeur boven de andere conserveringsprocedures. De conserveringsprocedures waarbij immunogeniciteitsreductie optreedt kunnen worden onderverdeeld in twee categorieën, n.l. de groep waarbij de endoneurale buizen gevuld blijven (bestraling; cialit) en die waarbij deze buizen worden leeggemaakt (Lyonerv). Bij de orthotope transplantatieexperimenten zijn methodes uit beide categorieën toegepast.

Tabel 5.3.2.h Resultaten met gelyophiliseerd zenuwweefsel

<i>Behandeling</i>	<i>Histologische bevindingen</i>
a. 24 uur incubatie in NaCl-15%	Alle cellen van het transplantaat zijn dood, het collageen is intact. Veel myeline afbraakproducten in de endoneurale buizen. Geen infiltraat, slechts beperkte ingroei van vaten, fibroblasten en macrofagen.
b. 24 uur incubatie in NaCl-15%, gevolgd door extractie in een aceton-ether mengsel	Alle cellen van het transplantaat zijn dood, het collageen is intact. Geen infiltraat, wel veel myeline afbraakproducten op de plaats van de cellen van Schwann. Enkele fibroblasten en macrofagen en ingroeiende bloedvaten zijn aanwezig.
c. 24 uur incubatie in NaCl-15%, gevolgd door lyophilisatie	Alle cellen van het transplantaat zijn dood. Geen infiltraat, wel ingroei van fibroblasten en macrofagen. Het collageenskelet is intact. De endoneurale buizen zijn gevuld met myeline afbraak producten.
d. 24 uur incubatie in NaCl-15%, gevolgd door extractie in aceton-ether mengsel en lyophilisatie.	Alle cellen van het transplantaat zijn dood, geen infiltraat, wel ingroei van fibroblasten en macrofagen. Het collageenskelet is intact. De endoneurale buizen zijn gevuld met afbraakproducten.
e. 24 uur incubatie in NaCl-15%, waarna bewerking volgens in 5.1.3 beschreven methode.	Geen cellen herkenbaar, slechts een collageenskelet met endoneurale buizen, waarin geen myeline of restproduct herkenbaar is. Geen infiltraat, wel ingroei van vaten, fibroblasten en macrofagen.

HOOFDSTUK VI

ORTHOTOPE ZENUWTRANSPLANTATIE BIJ DE RAT

6.1. Probleemstelling

Om de klinische toepasbaarheid van allogene zenuwtransplantatie te kunnen beoordelen is geen experiment zo waardevol als de orthotope transplantatie. Dit model biedt de mogelijkheid de gegevens verkregen uit de transplantaties onder het nierkapsel onder meer fysiologische omstandigheden te kunnen beoordelen. De beperkingen bij de groei door het transplantaat van de axonen uit de proximale stomp worden veroorzaakt door de immunogeniciteit van het allogene transplantaat. De immunogeniciteit kan gereduceerd worden en de afstoting van de gastheer kan beïnvloed worden door immunosuppressie. Of deze reductie van de immunogeniciteit en het effect van immunosuppressie voldoende is om doorgroei van axonen door het transplantaat mogelijk te maken, kan alleen in het orthotope model beoordeeld worden.

6.2. Materiaal en methoden

Het donormateriaal werd verkregen door, onder aether narcose, na scheren en desinfectie uit beide achterpoten de nervus ischiadicus over een zo groot mogelijke afstand vrij te prepareren en uit te snijden met behulp van een scheermes. Voor de allotransplantaties werden BN ratten als donor en WAG/Rij ratten als ontvanger gebruikt, voor isogene transplantaties werden WAG/Rij ratten gebruikt. De ontvanger werd onder aether narcose, na geschoren en gedesinfecteerd te zijn, op een perspexplaat gefixeerd. In linker zijligging werd onder de rechter achterpoot een wattenrol geschoven. De huidincisie werd evenwijdig aan het femur gemaakt. De musculus biceps femoris werd stomp in het vezelverloop gekliefd en gespreid met behulp van wondhaken. Nadat de nervus ischiadicus bereikt was werd verder gebruik gemaakt van het operatiemicroscop (Zeiss Opmi I). Voor de vertakking van de zenuw in nervus peroneus, nervus tibialis en nervus suralis werd 15 mm uitgesneden. De dikste fasciculus, later de nervus tibialis, werd nu vrijgeprepareerd door het epineurium terug te schuiven. De fasciculus tibialis van het transplantaat werd eveneens geïsoleerd en het epineurium teruggeschoven. Het transplantaat werd in de aangebrachte laesie van de ontvanger geplaatst en de distale en proximale stommen werden met de corresponderende uiteinden van het transplantaat verbonden (Fig. 6.2). Dit geschiedde door het perineurium van donor en ontvanger met 10-0 monofilament nylon (Ethicon) te hechten. Hierbij werd gebruik gemaakt van horlogemakerpincetten nr. 4 en de microchirurgische naaldvoerder volgens Castroviejo. De proximale en distale verbinding werd gelegd met 4-6 onderbroken hechtingen, waarbij zorg werd gedragen dat zo weinig mogelijk zenuwweefsel naar buiten stulpte. Na het voltooiën van de transplantatie werden de spieren geapproximeerd. De huid werd met agraves gesloten. De resultaten werden na 120 dagen histologisch



Figuur 6.2.
 Orthotope transplantatie van een deel van de nervus ischiadicus bij de rat (rechter poot).
 a Vrijgeprepareerde n. ischiadicus.
 b Deel van de fasciculus tibialis is verwijderd.
 c Isogeen onbehandeld transplantaat ingehecht met 10-0 nylon.
 d Voltooide transplantatie.

beoordeeld. (Van electrofysiologisch onderzoek werd afgezien omdat voor het verkrijgen van een éénmalige betrouwbare meting een onevenredig grote proefopstelling noodzakelijk was.) Beoordeling van de preparaten vond plaats na kleuring met HPS en volgens Klüwer en Bodian. De infiltratie wordt op de gebruikelijke manier aangeduid met de symbolen, zoals in tabel 4.3.3.c beschreven is. De experimenten kunnen verdeeld worden in twee groepen, namelijk controlegroepen en de experimentele groepen. De 3 laatste bestonden uit immunogeniteitsreductie van het transplantaat en immunosuppressie van de ontvanger.

6.3. Experimenten

1. Doorsnijding van de fasciculus tibialis van de nervus ischiadicus gevolgd door hechting van het perineurium.
 - a. met staal 9-0 (Davis en Geck).
 - b. met nylon 10-0 (Ethicon).
2. Een isogeen transplantaat werd op eerder beschreven wijze ingehecht.
3. Een allogeen transplantaat werd op eerder beschreven wijze ingehecht.
4. Allogeen transplantaties met zenuwen, die in TCM 199 met DMSO 15% bij -192°C in het Reactor Centrum Nederland met 2,5 Mrad gammastralen behandeld waren.
5. Allogeen zenuwtransplantaties met niet-behandelde zenuwen, maar met behandeling van de ontvangers met 1,5 ml ALG per week. Deze behandeling was dezelfde als beschreven in Hoofdstuk 4 en werd één week voor transplantatie aangevangen en 5 weken voortgezet.
6. Allogeen zenuwtransplantaties met niet-behandelde zenuwen, maar met behandeling van de ontvangers met Imuran (2 mg/kg lichaamsgewicht per dag) gedurende 30 dagen.

6.4. Resultaten

1. Zenuwdoorsnijding en hechten met:
 - a. staal 9-10.
 - b. nylon 10-0.

Bij beide experimenten is de doorgroei door de hechtplaats goed, het epi- en perineurium was ter plaatse van de hechting verdikt, maar er bestaat geen reactie op het hechtmateriaal.

2. Een isogeen transplantaat wordt orthotoop ingehecht. De axonen met begeleidende cellen van Schwann blijken door beide hechtplaatsen gegroeid te zijn. Het epi- en perineurium van het transplantaat en beide hechtplaatsen is verdikt.
3. Allotransplantaties met onbehandelde zenuwen. Het epi- en perineurium is verdikt, er bestaat wel ingroei van het transplantaat door cellen van Schwann en axonen, maar er is een ernstige onregelmatigheid en er zijn distaal geen tekenen van doorgroei. Er is weinig infiltraat en veel adherent spierweefsel aan het transplantaat.
4. Allotransplantaties met bestraalde zenuwen (2,5 Mrad). Het epi- en perineurium is verdikt, er bestaat ingroei van het transplantaat door cellen van Schwann en axonen met een geringe onregelmatigheid, er is doorgroei zonder tekenen van infiltratie.
5. Allotransplantaties met onbehandelde zenuwen, maar met behandeling van de ontvangers met ALG. Het transplantaat is goed herkenbaar. Lymfocytair infiltraat is aanwezig, zowel in het transplantaat als op de plaats van de zenuwhechtingen. Er is doorgroei van axonen en cellen van Schwann.
6. Allotransplantaties met onbehandelde zenuwen, maar met behandeling van de ontvangers met Imuran. Het transplantaat vertoont ingroei van zeer onregel-

Tabel 6.4

Experimentele groepen:	Doorgroei*	Infiltratie**
1. a. zenuw doorgesneden en gehecht met staal 9-0.	+	0
b. zenuw doorgesneden en gehecht met nylon 10-0.	+	0
2. isogeen orthotoop transplantaat	+	0
3. allogeen orthotoop transplantaat	—	+
4. allogeen transplantaat bestraald met 2.5 Mrad.	+	0
5. allogeen transplantaat, ontvanger behandeld met ALG.	+	++
6. allogeen transplantaat, ontvanger behandeld met Imuran.	—	+

n = 3 ; beoordeling na 120 dagen.

* De doorgroei is met + aangeduid als de axonen voorbij de distale zenuwnaad zijn doorgesneden.

** De infiltratie is aangeduid met de symbolen beschreven in tabel 4.3.3.c.

matig groeiende axonen en cellen van Schwann. Er bestaat geen doorgroei, infiltraat is aanwezig en er is veel adherent spierweefsel.

De resultaten van de orthotope zenuwtransplantaties zijn schematisch weergegeven in tabel 6.4.

6.5. Conclusies

Uit de experimenten waarbij de zenuw doorsneden en vervolgens gehecht werd met staal en nylon kunnen we de volgende conclusies trekken. Het hechten van het perineurium, gebruikmakend van microchirurgische technieken en instrumentarium geeft goede resultaten. Er bestaat geen verschil in reactie op nylon of staal. Wij gaven aan nylon de voorkeur omdat staal bij histologische verwerking het snijden van coupes bemoeilijkt. De afwezigheid van immunogeniciteit bij de isogene zenuwtransplantaties maakt orthotope transplantaties mogelijk zoals uit het tweede controle experiment blijkt. Allogeen zenuwtransplantaties mislukten indien geen bijzondere maatregelen werden genomen. De behandeling met radioactieve gammastralen (2,5 Mrad) resulteerde wel in doorgroei, zoals ook uit de experimenten van Marmor (1967) blijkt. Behandeling van de ontvanger met ALG resulteerde eveneens in histologische doorgroei. Dit is in overeenstemming met de experimenten van Pollard (1971). Hieruit kan geconcludeerd worden dat verandering van immunogeniciteit van het transplantaat of van de immunologische afweer van de

ontvanger tot verbetering van de resultaten van allotransplantaties leiden. Het slagen van de transplantaties moet worden toegeschreven aan de mogelijkheid voor de cellen van Schwann om een brug te slaan tussen proximale en distale stomp waarlangs de axonen kunnen groeien. Indien belemmering optreedt als gevolg van een immunologische afweerreactie is doorgroei onmogelijk.

HOOFDSTUK VII

ZENUWTRANSPLANTATIE BIJ DE AAP

7.1. Probleemstelling

Omdat de orthotope perifere zenuwtransplantaties bij ratten goede resultaten hadden opgeleverd, werd het zinvol geacht deze transplantatie ook bij de rhesus aap uit te voeren. Immers, rhesus apen vormen het meest geschikte preklinische diermodel omdat ze niet ingeteeld zijn, phylogenetisch zeer dicht bij de mens staan en er veel bekend is over het belangrijkste histocompatibiliteitssysteem. Bij de rhesus aap zijn reeds veel gegevens beschikbaar over afstoting en immunosuppressie t.a.v. nier- (Dicke, 1971) en huidallotransplantaten (Balner, 1975). Bovendien komen de technische problemen die zich voordoen bij het verrichten van een zenuwhechting bij de aap overeen met de menselijke situatie. Tenslotte is een meer verfijnde beoordeling van de transplantatieresultaten bij de aap mogelijk door het verrichten van electrofysiologisch onderzoek.

Om na te gaan of de voor de rhesusaap te volgen methodieken van transplantatie in afwezigheid van een afstotingsreactie goede resultaten opleverden, werden eerst enkele autotransplantaties verricht. Hierna werden transplantaties met onbehandelde en bestraalde (2.5 Mrad), diepgevroren (-192°C in TCM 199 + DMSO 15%) allogene zenuwen verricht. Vervolgens werden allotransplantaties uitgevoerd met Lyonerv van apen (zie de tevoren beschreven behandeling van de zenuw door de firma B. Braun in Melsungen, W. Duitsland, 5.1.4.).

De keuze voor bestraling met 2,5 Mrad en bewaren bij -192°C in TCM 199 + DMSO (15%) was gebaseerd op de goede resultaten verkregen bij orthotope transplantaties bij de rat (6.4.). Voor Lyonerv werd gekozen omdat het onderzoek naar de immunogeniciteit in de rattensexperimenten had aangetoond dat Lyonerv-transplantaten niet immunogeen waren en de structuur deed vermoeden dat goede resultaten behaald konden worden in de orthotope situatie (5.3.2.).

7.2. Materiaal en methoden

Als proefdieren dienden vrouwelijke rhesus apen (*Macaca mulatta*), van 2500-3500 gram. Het defect in de nervus medianus dat altijd van gelijke afmeting n.l. 25 mm was werd of door een transplantaat van de nervus ulnaris of nervus medianus, al of niet na voorbehandeling overbrugd. De anaesthesie werd ingeleid door intramusculaire toediening van 8 mg sernylan en 0.1 mg atropine. De apen werden orotracheaal geintubeerd met behulp van een kinderlaryngoscoop (Rüsch kinder tube; 2,5). Door intraveneuze toediening van 25 mg/kg lichaamsgewicht pentothal (Abbott) werd de anaesthesie onderhouden. Na fixatie met pleisters op een perspexplaat en desinfectie met 1% chloorhexidine in alcohol 70% werd de arm met steriele doeken afgedekt. De huid werd evenwijdig aan de pezen van de musculus palmaris longus geïncideerd. De lengte van de incisie was 120 mm, met de distale

punt ter hoogte van de aanhechting van de pees van de musculus flexor carpi radialis. De fascia antebrachii werd evenwijdig aan de pees van de musculus palmaris longus gekliefd. Door de verbindingen tussen de fascies van de musculus palmaris longus en de musculus flexor carpi radialis los te maken werd de nervus medianus zichtbaar gemaakt en over een afstand van 60 mm vrijgeprepareerd. Het te verwijderen deel (lengte 25 mm) werd losgemaakt van het mesoneurium en met een Gillette 'platinum plus' scheermesje op een houten tongspatel uitgesneden. Via dezelfde huidincisie werd de nervus ulnaris benaderd. De fascia antebrachii werd evenwijdig aan de musculus flexor carpi ulnaris gekliefd. De nervus ulnaris werd nu tussen de arteria ulnaris en de musculus flexor carpi ulnaris opgezocht en over een afstand van 55 mm vrijgeprepareerd. Het mesoneurium werd losgemaakt en 35 mm zenuw uitgesneden. Dit stuk nervus ulnaris kon dan als autotransplantaat gebruikt of als allotransplantaat uitgewisseld worden. De omvang van de nervus ulnaris was niet veel minder dan die van de nervus medianus, zodat bij het inhechten geen problemen ontstonden.

Voor de behandelde allotransplantaten werden delen van de nervus medianus en nervus ulnaris van beide armen van een donor uitgenomen, in TCM 199 met DMSO 15% geïncubeerd en in plastic zakjes verpakt. De conservering geschiedde in vloeibare stikstof door directe onderdompeling; de bestraling vond plaats te Petten op de eerder beschreven manier met gammastralen tot een dosis van 2,5 Mrad. Voor het Lyonerv experiment werd de nervus medianus uitgenomen en, in 15% NaCl oplossing geïncubeerd, per expresse voor behandeling naar Melsungen gezonden. Na de behandeling keerden de zenuwen in steriele dubbele plasticverpakking terug. Het inhechten geschiedde met behulp van een operatiemicroscop en met microchirurgisch instrumentarium, zoals eerder beschreven. Het hechtmateriaal was 10-0 monofilament nylon (Ethicon). De wond werd zorgvuldig met 3-0 nylonhechtingen gesloten. De apen werden individueel gekooid en volgens de in het Primatencentrum-TNO ontwikkelde procedure verzorgd. Bij observatie werd geen duidelijke afname of toename van de functie van de hand gekonstateerd omdat deze apensoort het gemis van de nervus medianus en nervus ulnaris zeer goed kan compenseren. Na 12 maanden werd een electrofysiologisch onderzoek verricht.

7.3. Electrofysiologisch onderzoek

7.3.1. Apparatuur

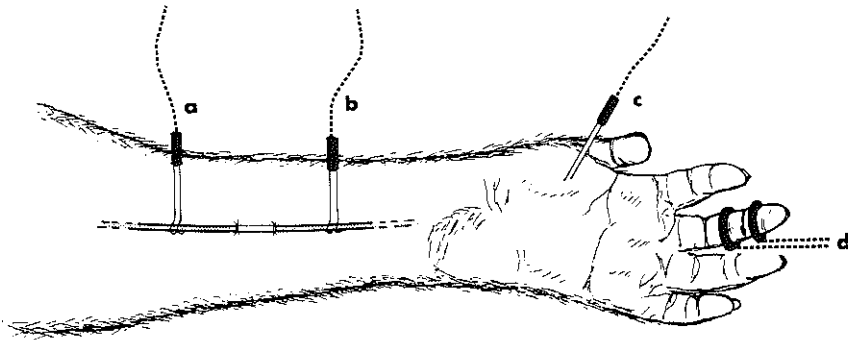
Gebruik werd gemaakt van een DISA 14 A. 20, twee-kanalige electromyograaf met ingebouwde prikkelaar, type 15 E. II. De actiepotentialen werden zichtbaar gemaakt op een oscilloscoop met raster en gefotografeerd met een polaroid camera.

7.3.2. Aanbrengen der elektroden

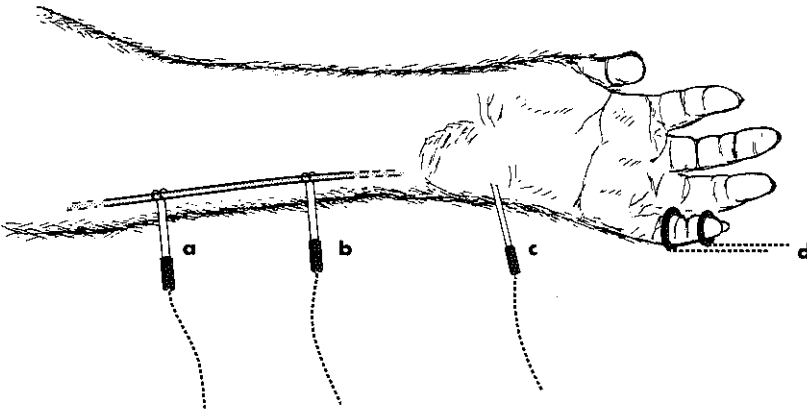
De apen werden met 8 mg sernylan en 0.1 mg atropine gesedeerd en de arm werd met pleister op een perspexplaat gefixeerd. Rond een geschoren deel van de

onderarm werd een met fysiologisch zout bevochtigde electrode bevestigd en verbonden met aarde. Na desinfectie met chloorhexidine 1% in alcohol 70% werd de arm met steriele doeken afgedekt. Proximaal van het litteken werd de huid en de fascia antebrachii evenwijdig aan de rand van de musculus flexor carpi radialis geïncideerd. Nadat de verbindingen tussen de fascies van de musculus flexor carpi radialis, de musculus palmaris longus en voor een deel de musculus flexor digitorum superficialis waren losgemaakt werd de nervus medianus zichtbaar. Twee gechloreerde zilveren haakvormige elektroden met een onderlinge afstand van 4 mm werden

Figuur 7.3.2.1. en 7.3.2.2. Electrofysiologisch onderzoek bij de rhesus aap.



Schematische weergave van de linker hand van een rhesus aap. De nervus medianus met transplantaat (figuur 7.3.2.1.) wordt geprikkeld door middel van de elektroden a en b voor het meten van de motorische geleidingssnelheid, welke wordt geregistreerd door middel van elektrode c. De sensibele geleidingssnelheid wordt gemeten door de prikkel aan de ringelektrode af te leiden bij a.



In figuur 7.3.2.2. wordt de nervus ulnaris weergegeven. Hierbij worden aan een niet-getransplanteerde zenuw dezelfde afleidingen geregistreerd ter controle van kruisinnervatie of anatomische variaties.

proximaal en bij een tweede meting distaal van het transplantaat rond de zenuw gelegd (Fig. 7.3.2.1. en 2). De elektroden werden van de omgeving geïsoleerd door ze met de zenuw enige millimeters op te tillen. Dezelfde procedure werd ook bij de nervus ulnaris uitgevoerd.

In de musculus abductor pollicis brevis en de musculus abductor digiti quinti werden concentrische naaldelectroden gestoken voor de registratie van de spieractiviteit. Aan de derde vinger werden met fysiologisch zout bevochtigde ringelelectroden bevestigd voor het prikkelen van de sensibele takken van de nervus medianus, en aan de vijfde vinger voor het prikkelen van de sensibele takken van de nervus ulnaris.

7.3.3. De geleidingssnelheidsmetingen

Deze betreffen de twee kwaliteiten van de zenuw, namelijk de motorische en de sensibele. De metingen van de eerste geschiedde als volgt: De zenuw werd via de proximale elektroden (Fig. 7.3.2.1. en 2., punten A en B) geprikkeld met een oplopend voltage. Door de prikkelsterkte te verhogen werd de maximale response verkregen. De distale motorische latenties werden nu bepaald door de toepassing van een zogenaamde supramaximale prikkel, dat wil zeggen het voltage dat het dubbele bedraagt van de prikkelsterkte welke nodig was voor het verkrijgen van de maximale response. Op deze wijze werden 2 distale motorische latenties geregistreerd. Het verschil tussen beide is de tijd waarin de afstand A-B overbrugd wordt. Door deze tijd te delen op de afstand A-B werd de geleidingssnelheid berekend. Teneinde de geleidingssnelheid van de sensibele kwaliteit van de zenuw te meten werden eerst de huidtakken van de te onderzoeken zenuw via ringelelectroden geprikkeld. Vervolgens werd de op de oscilloscoop af te lezen tijd tussen prikkel en response gedeeld door de afstand tussen de ringelelectroden (D) en de proximale elektroden (A).

7.3.4. Beoordelingscriteria

De motorische en sensibele geleidingssnelheden van de zenuw werden afwijkend genoemd indien ze trager waren dan de traagste snelheid gemeten aan normale zenuwen. Deze keuze is vrij arbitrair, maar een grotere nauwkeurigheid is gezien de variabiliteit van de meting niet zinvol. Verondersteld werd dat, indien dit criterium zou worden gehanteerd bij de mens, van praktisch functieherstel geen sprake zou zijn (Mechelse, persoonlijke mededeling). Indien de geleidingssnelheden niet afwijkend en dus sneller dan de aangenomen grenswaarde waren, werd functieherstel van de zenuw verondersteld.

7.4. Resultaten van de orthotope zenuwtransplantaties bij apen

7.4.1. Electrofysiologisch onderzoek

Na 12 maanden werd de mate van regeneratie door de getransplanteerde zenuwen electrofysiologisch beoordeeld. Volgens de tevoren beschreven methode wer-

Tabel 7.4.1 Resultaten van electrofysiologisch onderzoek van orthotope perifere zenuwtransplantaten bij rhesus apen

aapnummer:	1	2	3	4	5	6
<i>groep</i>						
autotransplantaten*	+	—	—	+	+	—
allogransplantaten onbehandeld	—	—	—	+		
allogransplantaten bestraald (2,5 Mrad) bij -192° C in TCM 199 + DSMO 15%	+	—	—	—	—	***
Lyonerv	+	+	+	+	+	+

Verklaring van de symbolen:

+ = electrofysiologisch werd herstel van de zenuwfunctie geconstateerd.

— = electrofysiologisch werd geen herstel van de zenuwfunctie geconstateerd.

* met andere apparatuur dan bij de overige groepen getest.

** bij histologisch onderzoek bleek de verkeerde zenuw getransplanteerd te zijn (zie 7.5.).

den de geleidingssnelheden van zenuwen met en zonder implantaat gemeten. De groepen gekenmerkt door herstel van de zenuw zijn in tabel 7.4.1. aangegeven met een +.

7.4.2. Histologisch onderzoek

Na 14 maanden werd de nervus medianus verwijderd en in 4% gebufferde formaline gefixeerd. De lengte coupes werden met behulp van drie kleurmethoden gekleurd, n.l. HPS, Bodian en de kleuring van Gieson. In de beoordeling werd de toestand van de zenuwnaden en van het implantaat betrokken. Tevens werd de mate van doorgroei van de axonen door het implantaat en de distale zenuwnaad beoordeeld. De histologische beoordeling wordt in tabel 7.4.2.1. schematisch weergegeven, hiervoor worden de volgende symbolen gebruikt.

— er is geen doorgroei door de proximale zenuwnaad.

+ er is alleen doorgroei door de proximale zenuwnaad.

++ de axonen groeien voorbij de helft van het implantaat.

+++ enkele axonen groeien door de distale zenuwnaad.

++++ bundels axonen groeien door de distale zenuwnaad.

7.4.3. Beschrijving van de histologische preparaten

Deze beschrijving betreft lengte coupes door het gehele implantaat met inbegrip van beide zenuwhechtingen en de proximale en distale stomp.

Tabel 7.4.2 Resultaten van het histologisch onderzoek van orthotope perifere zenuwtransplantaten bij rhesus apen

aapnummer	1	2	3	4	5	6
<i>groep</i>						
autotransplantaten	++++	++++	++++	++++	++++	++++
algotransplantaten onbehandeld	+	—	+	+++		
algotransplantaten bestraald (2,5 Mrad) bij -192° C in TCM 199 + DMSO 15%	++++	++	+++	+++	++	n.b.
Lyonerv	++++	++++	++++	++++	++++	++++

Verklaring van de symbolen:

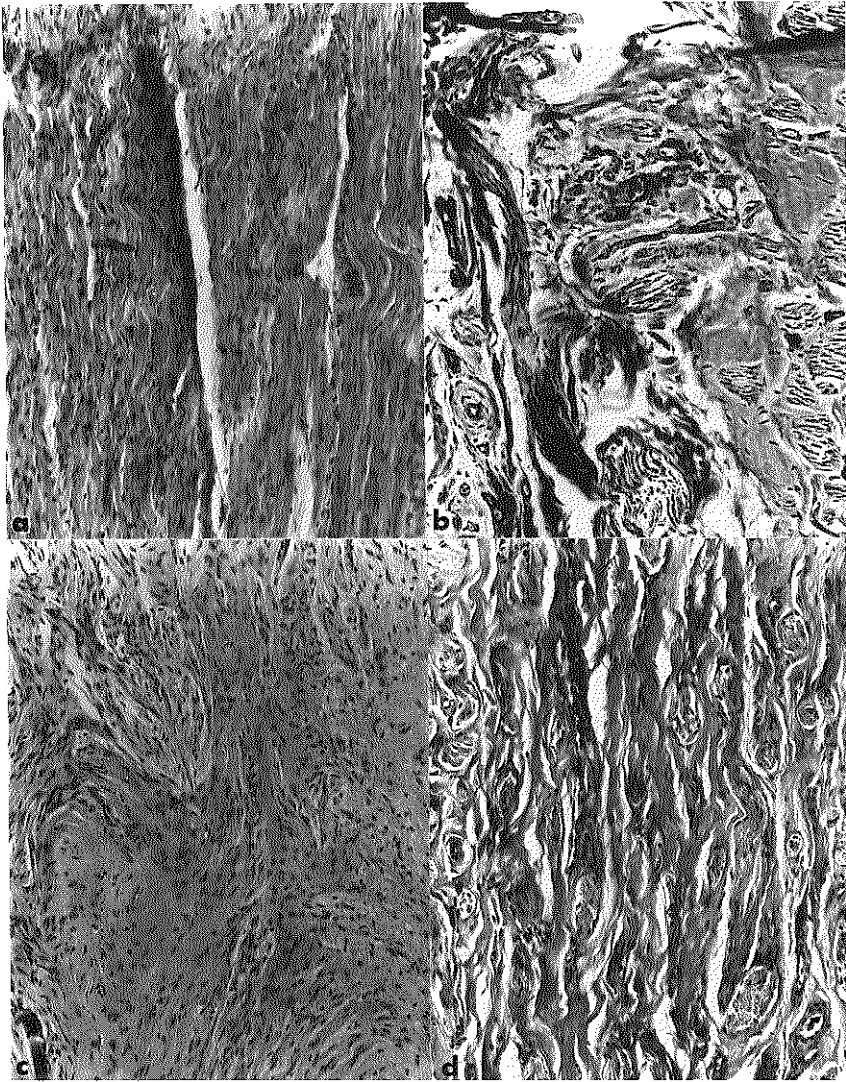
- : er is geen doorgroei door de proximale zenuwhechting.
- : er is alleen doorgroei door de proximale zenuwhechting.
- ++ : de axonen groeien voorbij de helft van het implantaat.
- +++ : enkele axonen groeien door de distale zenuwhechting.
- ++++ : bundels axonen groeien door de distale zenuwhechting.
- n.b. : niet beoordeeld.

a. Autotransplantaten

De plaats van de zenuwhechtingen is goed herkenbaar aan de doorsneden van het nylon hechtmateriaal. De geordende structuur van de perifere zenuw krijgt hier een golvend uitwaaiend karakter, vooral onder het perineurium is een warrig patroon ontstaan (Fig. 7.4.3.a.). Centraal ontstaat een overgang naar het implantaat. De axonen uit het centrum convergeren hier tot een ordelijk gestructeerde zenuwbundel. Rond de hechtingen is het epi- en perineurium verdikt. Tussen het epi- en perineurium bevinden zich vele dunne slingers van enkele axonen die gedesorienteerd zijn geraakt. Aan de distale zijde van het implantaat divergeren de axonen weer tot een golvende brede structuur om na enige mm weer te convergeren tot een smalle bundel met het geordende karakter van een perifere zenuw.

b. Onbehandelde algotransplantaten

De plaats van de zenuwhechtingen is hier eveneens goed herkenbaar, maar het implantaat zelf niet. Slechts een warrig neuroomachtige kluwen (Fig. 7.4.3.b.) en in één geval een enigszins georiënteerde bundel rond een torpedovormige kern waarin necrotisch materiaal en reuscellen zijn herkenbaar (Proefdier no. 4).



Figuur 7.4.3. (a-d).
 Histologische preparaten van lengtecoupes door orthotope perifere zenuwtransplantaten (nervus medianus) bij de rhesus aap, 14 maanden na transplantatie.
 a autotransplantaat.
 b onbehandeld allotransplantaat.
 c diepgevroren en bestraald allotransplantaat.
 d gelyophiliseerd allotransplantaat (Lyonerv)
 (Zie tekst 7.4.3. a-d).

c. Diepgevroren en bestraalde allotransplantaten

Bij deze groep valt op dat de bundels axonen welke vanuit de proximale stomp groeien een betere ordening dan bij de onbehandelde allotransplantaten vertonen, hoewel bij 4 van de 5 apen geen doorgroei voorbij de distale zenuwhechting kon worden waargenomen. Bij één aap werden twee fasciculi gezien die wel voorbij de distale zenuwhechting gegroeid waren (Fig. 7.4.3.c.).

d. Gelyophiliseerde allotransplantaten (Lyonerv)

Deze groep heeft een duidelijk ander karakter dan de voorgaande groepen. Bij de zenuwhechtingen is weinig neuroomvorming en verdikking te zien. Er is een duidelijke collageenskelet aanwezig; het is niet duidelijk of dit alleen door het transplantaat wordt gevormd of dat ook ingroeïend gastheer collageen een bijdrage levert. Hierin gebed liggen zeer vele goedgeordende fasciculi (Fig. 7.4.3.d.). Het epi- en perineurium is afkomstig van de gastheer, maar voegt zich naar het transplantaat.

7.5. Bespreking van de resultaten

Bij het beoordelen van de resultaten van het electrofysiologisch geleidingsonderzoek werd slechts bij drie van de zes autotransplantaten een herstel van de zenuwfunctie geconstateerd. Een verklaring hiervoor kan zijn dat deze eerste experimentele groep door middel van minder discriminerende apparatuur werd getest. Dit was onvermijdelijk omdat onverwacht na de eerste metingen de hele procedure in een ander laboratorium moest worden uitgevoerd. Herhaling van deze experimenten werd vanwege de tijdsfactor en schaarste aan proefdieren achterwege gelaten, te meer omdat de resultaten van de histologische beoordeling zeer goed waren.

In de groep onbehandelde allotransplantaten kon in drie van de vier gevallen geen functieherstel worden waargenomen. Dit komt overeen met de histologische bevindingen. Alleen bij proefdier nummer 4 kon wel doorgroei door de distale zenuwhechting geconstateerd worden. Dit lijkt een gevolg te zijn van een totale resorptie van het transplantaat: in het centrum is necrotisch weefsel met reuscellen aanwezig, terwijl axonen hieromheen naar distaal gegroeid zijn. Deze doorgroei komt tot uiting in herstel van zenuwfuncties, zoals geconstateerd bij electrofysiologisch onderzoek. Opvallend was, dat in de gehele groep de zenuwnaden na 14 maanden aanzienlijk dichter bij elkaar lagen dan tijdens de transplantatie. Het lijkt alsof de zenuwuiteinden in elkaars richting groeien omdat het transplantaat verkort wordt. Ook is opvallend dat de proximale stomp bijna altijd in het transplantaat gegroeid is en dat sommige bundels axonen doorgroei vertonen, maar zich meestal verliezen in een chaotisch neuroom.

De groep diepgevroren, bestraalde allotransplantaten wordt gekenmerkt door afwezigheid van functieherstel in vier van de vijf gevallen. Proefdier zes viel buiten de beschouwingen omdat het transplantaat in de nervus ulnaris in plaats van in de nervus medianus was geplaatst, waardoor de bij eletromyografie gevonden positieve uitslag verklaard kon worden. Het goede resultaat bij proefdier 1 uit deze groep is

toe te schrijven aan de omstandigheid dat 2 forse fasciculi kans hadden gezien ondanks sterke neuroomformatie en verbindweefseling de distale stomp te bereiken en goede contacten met de motorische eindplaatjes te maken. De histologisch geconstateerde doorgroei van enkele axonen door de distale zenuwhechting bij twee van de vijf bestraalde, diepgevroren allotransplantaten was kennelijk onvoldoende om electrofysiologisch functieherstel te kunnen aantonen.

Bij de Lyonerv transplantaten is de aanwezigheid van vele smalle door het transplantaat groeiende bundels kenmerkend. Deze bundels zijn in het duidelijk herkenbare collageen (normale endoneurale buisstructuren) gelegen. Hierdoor wordt de indruk gewekt dat de Lyonervstructuur een uitstekende geleider vormt voor de uitgroeiende bundels van Schwann en de axonen. In alle gevallen kon electrofysiologisch duidelijk een geleidingsherstel worden geconstateerd.

7.6. Conclusies

Nadat door autotransplantaties was aangetoond dat de gevolgde techniek van perifere zenuwtransplantatie bij rhesus apen bruikbaar was, werden drie soorten transplantaten getest, namelijk: onbehandeld allogene: deze werden afgestoten en doorgroei mislukte; diepgevroren bestraalde: deze gaven bij histologische beoordeling de indruk dat doorgroei bijna kans van slagen had, maar leek af te stuiten op een eerder gevormd Schwannoom (Ducker, 1966). De electrofysiologische resultaten waren slecht. De zeer goede resultaten die met Lyonerv behaald werden moeten worden toegeschreven aan de lege endoneurale buizen en de afwezigheid van immunogeniciteit.

HOOFDSTUK VIII

ALGEMENE DISCUSSIE

De opvatting dat perifeer zenuwweefsel niet of nauwelijks immunogeen zou zijn (Inleiding tot de immunologie, 1971) werd getoetst in heterotopie en orthotopie transplantatiemodellen. Tevens werd onderzocht of een zenuwtransplantaat alleen fungeert als geleidingsbuis waardoor of waarlangs de axonen, buizen van Schwann en fibroblasten uitgroeien of dat het noodzakelijk is dat de levende cellen van een transplantaat actief deelnemen aan het overbruggen van het defect. De opvatting dat een transplantaat slechts een geschikte matrijs dient te zijn voor de geleiding van de buizen van Schwann en de axonen werd door Marmor (1967), Jacoby (1972) en Afanassieff (1967) aangehangen. Zij baseerden deze opvatting op het onderzoek van Weiss (1945) dat regenererende axonen langs een geleidend oppervlak uit kunnen groeien. Hoewel Barnes (1946) reeds had waargenomen dat na allotransplantatie een 'ontstekingsreactie' werd uitgelokt en Marmor (1967) immunogeniciteit van perifeer zenuwweefsel veronderstelde, werd het onomstotelijk bewijs dat perifeer zenuwweefsel immunogeen is niet geleverd.

In dit proefschrift (Hoofdstuk IV) werd, door het verrichten van vier soorten van experimenten, bij ratten aangetoond dat perifeer zenuwweefsel immunogeen is. Dit werd op de volgende manier aangetoond in het heterotopie transplantatiemodel. Er is een duidelijk verschil tussen iso- en allotransplantaties, het histologisch beeld na allotransplantatie is in overeenstemming met de afstotingsreactie die kan worden waargenomen bij de afstoting van huid. Ten tweede was het mogelijk om ontvangers met allogene perifeer zenuwweefsel te sensibiliseren tegen transplantatie-antigenen, getuige het feit dat allogene huidtransplantaten afkomstig van dezelfde donorstam als het allogene zenuwweefsel versneld werden afgestoten. Bovendien konden na deze immunisatie antilichamen tegen erythrocyten (die bij de rat H-1 antigenen bevatten) worden aangetoond. Omgekeerd kon na sensibilisatie met huidtransplantatie versnelde afstoting van zenuwtransplantaten worden opgewekt. Ten derde werd aangetoond dat door immunosuppressie de afstoting van allogene zenuwtransplantaten kon worden onderdrukt. Uit de resultaten van experimenten met cryopreservatie, cialit en bestraling kon worden afgeleid dat de levende cellen in een zenuwtransplantaat de dragers zijn van de immunogeniciteit. Bij een goede conservering, die tot gevolg heeft dat de cellen niet worden gedood, blijft de immunogeniciteit intact. Door deze immunogeniciteit mislukken allogene transplantaties met onbehandeld perifeer zenuwweefsel. Dit werd bevestigd met orthotopie allogene zenuwtransplantatie bij de rat en de rhesus aap (Hoofdstuk VI en VII). Om een allogene transplantatie kans van slagen te geven bestaan er drie methoden:

1. *Onderdrukken van de afstotingsreactie door biologische en/of farmacologische immunosuppressiva.* Vooral ALG voldeed bij de rat zeer goed (Hoofdstuk IV en VI). Echter, aan het gebruik van immunosuppressieve middelen kleven zulke

belangrijke nadelen (Hoofdstuk III) dat klinische toepassing hiervan, gezien de niet levensbedreigende situatie waarin de te transplanteren patiënt verkeert, af te raden is. Daarom werd deze methode ook niet in het orthotope model bij de rhesus aap getest.

2. *Het reduceren van de afstotingsreactie door het selecteren van histocompatibele donor-ontvanger combinaties.* Deze methode bleek in het hondenmodel goede resultaten op te leveren (Singh, 1977). Bij de rhesus aap leidt compatibiliteit voor de SD determinanten tot verlengde overleving van huidtransplantaten, terwijl compatibiliteit voor LD geen additioneel effect heeft (Balner, 1975). Dit in tegenstelling tot orgaan transplantaten waarbij alleen compatibiliteit voor LD een positief effect heeft (van Es, 1977). Gezien de overeenkomst tussen zenuw en huidtransplantaten met betrekking tot de methode van transplanteren (vrije transplantatie) is het waarschijnlijk dat compatibiliteit voor SD determinanten een gunstig effect op de overleving van allogene perifere zenuwtransplantaten bij de aap (en vermoedelijk bij de mens) zal hebben. Helaas kon deze hypothese niet bij rhesus apen getoetst worden omdat voor dit onderzoek geen getypeerde rhesusapen beschikbaar waren.
3. *Het voorkomen van de afstotingsreactie door het verminderen van de immunogeniciteit van het transplantaat.* Er werden drie methoden getest namelijk: (a) behandeling met ioniserende stralen; (b) behandeling met cialit; (c) Lyophilisatie procedure in Melsungen (Lyonerv). Elk van deze methoden gaf goede reductie van de immunogeniciteit (Hoofdstuk V). Lyonerv transplantaten zijn de enige transplantaten waarvan het endoneurale skelet leeg is. Dit is vermoedelijk de reden dat alleen deze transplantaten, in de orthotope situatie bij de rhesusaap, electrofysiologisch functieherstel en histologisch doorgroei vertoonden. Door de commissie Kuhlendahl werd echter aangetoond dat het gebruik van Lyonerv bij de mens niet tot positieve resultaten heeft geleid. De discrepantie tussen de bevindingen bij de aap en de mens kan liggen aan het feit dat experimentele resultaten bij de aap niet zonder meer geextrapoleerd kunnen worden naar de mens. Het is bijvoorbeeld denkbaar dat het regeneratievermogen van perifere zenuwen bij rhesusapen sterker is dan bij de mens (Ducker, 1969). Bovendien werd in het apenmodel geen voorafgaand trauma toegebracht en werd altijd een perifeer gelegen defect aangebracht bij betrekkelijk jonge apen. Het is bekend dat distale laesies en jeugdige leeftijd gunstige factoren zijn voor de regeneratie (Ducker, 1969). Een ander belangrijk verschil is de lengte van het transplantaat; bij de mens zullen voor het gebruik van allogene transplantaten meestal zenuwstukken langer dan 35 mm (de door ons gebruikte afmeting bij de rhesusaap) nodig zijn. Bij korte transplantaten kunnen buizen van Schwann en fibroblasten van de proximale en distale stomp in korte tijd het defect overbruggen, hierdoor kunnen de axonen gericht uitgroeien. Vermoedelijk is elk van de bovengenoemde factoren van belang.

Het zoeken naar een bruikbaar allotransplantaat blijft toch zinvol, omdat, zoals

Singh (1976) reeds opmerkte, een allotransplantaat duidelijk voordelen kan hebben. Autotransplantaten zijn in onvoldoende mate voorhanden bij grote defecten en de sensibiliteitsuitval welke nabij de donorplaats optreedt kan zeer hinderlijk zijn. Het meest ideale allotransplantaat is dat transplantaat dat zich gedraagt als een autotransplantaat. Dit kan bereikt worden indien methoden voor de inductie van specifieke immunosuppressie klinisch toepasbaar zijn geworden. Een andere wijze om deze ideale situatie te bereiken is vervolmaking van de weefseltypering. Indien het in de toekomst mogelijk is om één van beide procedures toe te passen, lijkt de in dit proefschrift uitgeteste conservering van perifeer zenuwweefsel in TCM 199 met DMSO (15%) bij -192° C een goede bewaarmethode te zijn.

In de huidige situatie is voor het overbruggen van grote defecten, waarvoor onvoldoende autogeen perifeer zenuwweefsel voorhanden is, de volgende procedure te overwegen. Het feit dat de buizen van Schwann en de axonen in een lang inert allotransplantaat hun gevoel voor richting verliezen is mogelijk te ondervangen door een allotransplantaat, van bij voorkeur Lyonerv, op te delen in korte stukken en deze af te wisselen met korte stukken autotransplantaat afkomstig van de distale zijde van de gelaedeerde zenuw. Deze manier van sandwich-transplantatie kan een goede kans van slagen hebben omdat de autogene, in de Lyonerv uitgroeiende buizen van Schwann een verbinding vormen tussen de diverse proximale en distale stompen, zodat de regenererende axonen een goede geleiding aantreffen. Het zou aanbeveling verdienen om deze sandwich-transplantatietechniek in de experimentele situatie bij de rhesusaap te toetsen.

SAMENVATTING

In het historisch overzicht van de tot nu toe verrichte onderzoeken betreffende perifere zenuwtransplantaties, wordt in Hoofdstuk I de immunogeniciteit van perifeer zenuwweefsel ter discussie gesteld. De bevinding dat allotransplantatie over het algemeen mislukt, terwijl autotransplantatie tot goede resultaten leidde, stimuleerde ons tot het doen van een onderzoek naar de oorzaken van dit verschil. Dit onderzoek vormt de basis van dit proefschrift.

In Hoofdstuk II wordt na een beknopte samenvatting van de anatomie en histologie van perifere zenuwen, een beschrijving gegeven van de fasen die een perifere zenuw tijdens de regeneratie doorloopt. Een belangrijk facet van de regeneratie is de uitgroei van de buizen van Schwann. Tegelijkertijd vertoont het neuron een verhoogde eiwitsynthese welke zich uit in een functionele hypertrophie van het lichaam en uitgroei van het axon. Bij de bespreking van de verschillende zenuwhechtmethoden wordt gesteld dat gebruik van het operatiemicroscop en microchirurgisch instrumentarium en het leggen van perineurale hechtingen essentieel is.

Voor een goed begrip van de immunogeniciteit van perifere zenuwtransplantaten wordt in Hoofdstuk III een kort overzicht van de transplantatie-immunologie gegeven. Aandacht wordt besteed aan (1) de doorslaggevende rol van het 'Major Histocompatibility Complex', (2) het verloop van de transplantie-reactie, (3) de humorale en cellulaire componenten van deze reactie en (4) het vermogen van farmacologische en biologische middelen om deze te onderdrukken. Ingegaan wordt op het frequenter voorkomen van bepaalde vormen van maligniteit bij het gebruik van immunosuppressiva na klinische transplantatie.

In Hoofdstuk IV wordt, door het verrichten van vier soorten van experimenten, in het heterotope transplantatiemodel bij ratten aangetoond dat perifeer zenuwweefsel immunogeen is. Er is een duidelijk verschil tussen iso- en allotransplantaties, het histologisch beeld na allotransplantatie is in overeenstemming met de afstotingsreactie die kan worden waargenomen bij de afstoting van huid. Ten tweede is het mogelijk om ontvangers met allogeen perifeer zenuwweefsel te sensibiliseren tegen transplantatie-antigenen, getuige het feit dat allogene huidtransplantaten afkomstig van dezelfde donorstam als het allogene zenuwweefsel versneld worden afgestoten. Bovendien konden na deze immunisatie antilichamen tegen erythrocyten (die bij de rat H-1 antigenen bevatten) worden aangetoond. Omgekeerd kan na sensibilisatie met huidtransplantaten versnelde afstoting van zenuwtransplantaten worden opgewekt. Tenslotte wordt aangetoond dat door immunosuppressie de afstoting van allogene zenuwtransplantaten kan worden onderdrukt.

In Hoofdstuk V wordt uit de resultaten van experimenten met cryopreservatie, cialit en bestraling afgeleid dat de levende cellen in een zenuwtransplantaat de

dragers zijn van de immunogeniciteit. Bij een goede conservering, die tot gevolg heeft dat de cellen niet worden gedood, blijft de immunogeniciteit intact. In tegenstelling tot de eisen die aan cryopreservatie van organen en beenmerg worden gesteld, zal de ideale preservatie van zenuwweefsel tot gevolg moeten hebben dat de levende cellen *niet* worden beschermd en bovendien aan de speciale voorwaarde moeten voldoen dat de inhoud van de endoneurale buizen wordt verwijderd.

In Hoofdstuk VI worden experimenten beschreven die tot doel hadden de belangrijkste conclusies uit de voorgaande hoofdstukken in het orthotope transplantatiemodel bij de rat te toetsen. Uit de resultaten blijkt dat verandering van de immunogeniciteit van het transplantaat door behandeling met ioniserende stralen (2,5 Mrad) of door behandeling van de ontvanger met immunosuppressieve middelen (ALG of Imuran) de resultaten na allogene transplantatie verbeterd konden worden.

Nadat op deze wijze bij de rat was aangetoond dat er een goede overeenstemming was tussen heterotope en orthotope transplantatie werden de twee meest belovende methodes van preservatie in een preklinisch diemodel verder onderzocht; daarvoor werd de orthotope transplantatie bij de rhesusaap gebruikt omdat dit proefdier het meest overeenkomt met de mens. Deze experimenten worden in Hoofdstuk VII beschreven. Nadat door autotransplantaten was aangetoond dat de gevolgde techniek van perifere zenuwtransplantatie bij rhesusapen bruikbaar was, werden drie soorten transplantaten getest, namelijk: de onbehandelde allogene controles, diepgevroren bestraalde en Lyonerv. De onbehandeld allogene werden afgegoten en doorgroei mislukte, de diepgevroren bestraalde gaven bij histologische beoordeling de indruk dat doorgroei vrijwel altijd mislukte, waarschijnlijk ten gevolge van een eerder gevormd Schwannoma in de distale stomp. De electrofysiologische resultaten waren slecht. De zeer goede resultaten die met Lyonerv behaald werden moeten worden toegeschreven aan de lege endoneurale buizen en de afwezigheid van immunogeniciteit.

In Hoofdstuk VIII worden de experimentele resultaten behaald bij de rat en de rhesusaap in samenhang besproken, terwijl gespeculeerd wordt over mogelijke toepassing van de 'sandwich-techniek' bij het overbruggen van grote defecten waarvoor onvoldoende autogeen perifeer zenuwweefsel voorhanden is. De voorgestelde sandwich-techniek is een combinatie van niet immunogene transplantaten, bij voorkeur Lyonerv, met tussenschakeling van korte stukken autotransplantaat. Deze hebben tot taak door middel van in het allotransplantaat uitgroeiende buizen van Schwann een verbinding te vormen tussen de diverse proximale en distale stompen, zodat de regenererende axonen een goede geleider aantreffen.

SUMMARY

In the historical review on nerve transplantation, the question of immunogenicity of peripheral nerve tissue is discussed in Chapter I. The observation that allografts frequently fail, whereas autografting leads to favourable results prompted us to investigate the factors responsible for this discrepancy. This research forms the basis of this thesis.

In Chapter II the anatomy, histology and regeneration process of peripheral nerves is discussed. An important aspect of the regeneration consists of the outgrowth of the tubes of Schwann. At the same time the protein synthesis of the neuron increases, which is reflected as functional hypertrophy of the cell body and outgrowth of the axon. In the discussion on methods for nerve transplantation it is emphasized that the use of the operating microscope and microsurgical instruments is imperative and perineural suturing is essential. For a deeper understanding of the immunogenicity of nerves a brief review of transplantation immunology is given in Chapter III. Particular attention has been paid to (1) the importance of the major histocompatibility complex; (2) the course of the transplantation reaction; (3) the sequences of humoral and cell-mediated phenomena; (4) the suppression of these reactions by pharmacological and biological agents. Consideration is given to the more frequent occurrence of certain types of malignancies by the use of immunosuppressive agents after clinical transplantation.

Immunogenicity of peripheral nerve tissue is demonstrated in Chapter IV by performing four different experiments, using the heterotopic transplantation model in rats. The following observations were made. There is a clear difference between the outcome of iso- and allografting, histological examination confirmed that nerve allografts are rejected in a similar manner to that of skin allografts. It is possible to sensitize recipients with allogeneic peripheral nerve tissue against transplantation antigens as is shown by the observation that skin allografts derived from the nerve donor strain are rejected in an accelerated manner. In addition, antibodies against transplantation antigens were demonstrated following immunization with nerve tissue. In the reverse situation sensitization induced by skin grafting leads to accelerated rejection of subsequently transplanted nerve tissue. The rejection of nerve allografts can be prevented by administration of immunosuppressive agents.

From the results of experiments performed using cryopreservation, cialit and irradiation protocols it is shown that viable cells are the bearers of immunogenicity. Effective cryopreservation maintains the structural integrity and the immunogenicity of the cells. In contradiction to the demands imposed on cryopreservation of organs and bone marrow the ideal preservation of nerve tissue should lead to cell death and in addition to elimination of the contents of the endoneural tubes.

In Chapter VI experiments are described in which the most important observations made in the preceding Chapters were tested in the orthotopic transplantation model in rats. The results show that change in immunogenicity induced by ionizing radiation (2.5 Mrad) or treatment of the recipients with immunosuppressants (ALG or Imuran) could improve the outcome of allogeneic transplantation.

Upon the observation that in rats there was good agreement between heterotopic nerve transplantation was performed in the rhesus monkey since it is phylogenetically close to man. In Chapter VII the results of these experiments are described. Autografting revealed that the technique employed for orthotopic nerve grafting was suitable. As a consequence of this observation three types of transplants were tested, namely the untreated allogeneic controls, deepfrozen irradiated nerves and Lyonerv. The controls were rejected and growth through the graft failed; the deepfrozen irradiated nerves on histological examination gave the impression that growth through the graft invariably failed presumably as a consequence of an earlier formed Schwannoma in the distal stump. The electrophysiological tests were negative. The excellent results with Lyonerv could be attributed to the empty endoneurial tubes and absence of immunogenicity.

In Chapter VIII the results obtained in rats and rhesus monkeys are discussed in coherence. It is speculated that for 'bridging' of large nerve defects for which insufficient autologous material is available, a 'sandwich technique' may be a good procedure. The proposed sandwich technique consists of the use of short pieces of non-immunogenic grafts, preferentially Lyonerv-grafts, alternated with short pieces of autograft. The tubes of Schwann which proceed from the autografts grow into the various proximal and distal stumps of the Lyonerv, thus providing an excellent orientation for the regenerating axons.

DANKBETUIGINGEN

Professor Dr. W. Luyendijk stimuleerde de aanvang van dit onderzoek, maar reeds snel werd duidelijk dat alleen in een daartoe gespecialiseerd instituut de noodzakelijke kennis, begeleiding en experimentele mogelijkheden gevonden konden worden. Professor Dr. D.W. van Bekkum verleende mij gastvrijheid en de infrastructuur van het Radiobiologisch Instituut maakten het mogelijk dit onderzoek te verrichten en met een proefschrift af te ronden. Gedurende en na de opleiding tot chirurg werd hiertoe door wijlen Professor Dr. H. Muller en Professor Dr. H. van Houten eveneens gelegenheid geboden.

Professor Dr. C.F. Hollander en Professor Dr. S.A. de Lange hebben het concept zeer grondig bestudeerd en van goede op- en aanmerkingen voorzien.

Dr. K. Mechelse en zijn medewerker J. Schipper waren zo vriendelijk het electrofysiologisch onderzoek te verrichten. Gedurende het gehele onderzoek en de totstandkoming van dit proefschrift heb ik mij verheugd in de vriendschap en begaafde medewerking van Dr. R.L. Marquet en de heer G.A. Heystek.

De heer H.J. Nieuwenhuizen van het Reactor Centrum Nederland verrichtte de gamma-bestralingen van de stukjes perifere zenuw.

Dr. G.J.C. Bots begeleidde de beoordeling van de preparaten en verzorgde de histologische bewerking van de apenpreparaten.

Professor Dr. H.G.J.M. Kuipers was zo vriendelijk het hoofdstuk over de anatomie met mij door te nemen.

Van de technische medewerkers van het Radiobiologisch Instituut TNO wilde ik graag bedanken:

het hoofd rattenverzorging, W. Aarssen;

de hoofden apenverzorging, E.J. Beijersbergen van Henegouwen en C. Schoonhoven;

het hoofd operatiekamer, H.D. Wiersema;

de histologisch analiste, A.L. Nooteboom;

J.Ph. de Kler ontwierp en verzorgde voortreffelijk de illustraties;

A.A.G. Glaudemans maakte de fraaie foto's van de microscopische preparaten.

De preparaten van de dwarsdoorsnede door de nervus ischiadicus van een konijn werden ter beschikking gesteld door Dr. J.P. Scherft van het Laboratorium voor Celbiologie en Histologie van de Rijksuniversiteit te Leiden.

De concepten werden getypt door de dames E.C. Drooglever, G.J. Weltevrede, E.J. Nijssen.

Het typen van de kopij op de 'word processor' werd verzorgd door Mevrouw M. van der Sman.

Drs. P.M. Waszink was zo vriendelijk het concept te lezen en van opmerkingen te voorzien. Drs. B. Tank deed dit met de 'summary'.

Dr. P. Aleman, Dr. H. Sluzewski en Dr. H.P. Pull ter Gunne stelden mij in de gelegenheid de praktijk te kunnen verlaten om de laatste voorbereidingen voor de promotie te treffen.

LITERATUURLIJST

- Abbot, W.M. en Hembree, J.S., 1970, Absence of antigenicity in freeze-dried skin allografts. *Cryobiology*, 6, 416.
- Abercrombie, M. en Johnson, F., 1950, The influence of nerve fibres on Schwann migration investigated in tissue culture. *Proc. Roy. Soc. B.*, 136, 448.
- Afanassieff, A., 1967, Premiers resultats de 20 homogreffes de nerfs conservés par le cialit (main et avant-bras). *Presse Méd.*, 75, 1409.
- Alexandre, G.P.J., Murray, J.E. en Dammin, G.J., 1963, *Transplantation*, 1, 432.
- Ashley, F.L., Murphy, J.F., Morgan, S.C., Balch, C.R., Conover, W.A., Calloway, D.V. en Cross, L., 1968, Axon growth through irradiated median and ulnar nerve homografts in primates. *Plast. Reconstr. Surg.*, 42, 313.
- Bach, J.F., 1975, The mode of action of immunosuppressive agents. North-Holland publishing Company, Amsterdam.
- Bach, F.H., Bach, M.L., Sondel, P.M.M., 1976, Differential function of major histocompatibility complex antigens in T-lymphocyte activation. *Nature*, vol. 259, 273.
- Ballin, R.H.M. en Thomas, P.K., 1969, Changes at the nodes of Ranvier during wallerian degeneration on electron microscope study. *Acta neuropath.*, (Berl.), 14, 237.
- Balner, H. en van Vreeswijk, W., 1975, The major histocompatibility complex of rhesus monkeys (RhL-A). Attempts at serological identification of MLR determinants and postulation of an I region in the RhL-A complex. *Transplant. Proc.*, 7, 13.
- Barnes, R. et al., 1946, A study of the fate of nerve homografts in man. *Brit. J. Surg.*, 34, 34.
- Bekkum, D.W. van, 1978, in the press.
- Bekkum, D.W. van, Heystek, G.A. en Marquet, R.L., 1969, Effects of immunosuppressive treatment on rejection of heart allografts in rats. *Transplantation*, vol. 8, 678.
- Bekkum, D.W. van, Heystek, G.A., Marquet, R.L., Bruin, R.W. de en Timbergen, W.J., 1970, Comparative studies on immunosuppression of heart and kidney allograft rejection in rats. In: *Pharmacological treatment in organ and tissue transplantation*. Proc. of an Int. Symposium, Milan, 1969, *excerpta Medica*. Int. Congress Series nr. 197, p. 14.
- Bekkum, D.W. van, Waay, D. van der en Putten, L.M. van, 1969, Need for specific pathogen free monkeys in certain radiobiological studies. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 162, 363.
- Betel, I., Appelman, B.W.M. en Balner, H., 1970, The localization of the immunosuppressive activity in horse anti-monkey lymphocyte sera. *Transplantation*, vol. 8, 431.
- Bloom, W., en Fawcett, D.W., 1968, *A textbook of histology*. W.B. Saunders Company, Ch. 12, 304.
- Bora, F.W., Jr., 1967, Peripheral nerve repair in cats. *J. Bone Jt. Surg. (Amer.)*, 49, 659.
- Bowden, R.E.M. en Marmor, L., 1968, Peripheral nerve regeneration using nerve grafts. *Brit. Med. J.*, 1, 42.
- Bromley, F., 1964, Adhesive anastomosis techniques for fine nerves: Experimental and clinical techniques. *Amer. J. Surg.*, 108, 529.
- Brown, H.A., 1969, Internal neurolysis in the treatment of peripheral nerve injuries. *Clin. Neurosurg.*, 17, 99.
- Brown, P.W., 1970, Surgery of upper extremity peripheral nerve injury. *Clinical orthopaedics and related research*, 68, 14.
- Bruin, R.W. de, 1970, The effect of immunosuppression on function of kidney allografts in the rat, proefschrift Rotterdam.
- Bucko, C.D. en Steinmuller, D., 1974, Reinnervation after orthotopic grafting of peripheral nerve segments in inbred rats. *Plast. Reconstr. surg.*, 53, 326.
- Bunnell, S., 1959, *Transplantation of nerves in transplantation of tissues*. Ed. Peer, L.A., The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 2, 247.
- Burnet, F.M., 1957, Cancer – a biological approach. *Brit. med. J.*, 1, 779.
- Bushe, K.A., Duensing, F., Gerl, A., Gütler, G., Löser, R., Meier, C., Peterson, E. en Sollmann, H., 1974, Nachuntersuchungen mit homologen transplantaten überbrückter peripherer Nervenverletzungen. *Z. Neurol.*, 206, 129.

- Campbell, J.B., Bassett, C.A.L. en Bohler, J., 1963, Frozen irradiated homografts shielded with microfilter sheaths in peripheral nerve surgery. *J. Trauma*, 3, 303.
- Campbell, J.B. en Luzio, J., 1964, Facial nerve repair: new surgical techniques. *Trans. Amer. Acad. Ophthalm. Otolaryng.*, 68, 1068.
- Caston, J.D. en Singer, M., 1969, Isolation of radioactive amino acids and derivatives from peripheral nerve. *Exp. Neurol.*, 25, 438.
- Causey, G., 1960, The Schwann cell in degeneration and regeneration. *The cell of Schwann*, Livingstone, Edinburgh.
- Causey, G., 1960, The structure of a peripheral nerve trunk. *The cell of Schwann*, Livingstone, Edinburgh.
- Causey, G. en Hoffman, H., 1959, Axon sprouting in partially deneurotised nerves. *Brain*, 78, 661.
- Chalmers, A.H., Knight, P.R., Atkinson, M.R., 1967, Conversion of azothioprine into mercaptopurine and mercapto-imidazole derivatives in vitro and during immunosuppressive therapy. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 45, 681.
- Chase, R.A., 1969, Reconstructive procedures after irreversible nerve damage in the upper extremity. *Clin. Neurosurg.*, 17, 142.
- Christensen, E.A. et al., 1964, Inactivation of dried bacteria and bacterial spores by means of ionizing radiation. *Acta Path. Microbiol. scand. sect. A.B.*, 60, 253.
- Comtet, J.J., Deliry, P., Faure, A., Tommassi, M., Mallet-Guy, Y. en Transy, M.J., 1972, Etude comparative de deux series de greffes de nerfs conservés chez le chien. *Lyon Chir.*, 68, 352.
- Dasgupta, T.K., 1967, Mechanism of rejection of peripheral nerve allografts. *Surg. Gynec. Obstet.*, 125, 1058.
- Davis, L. en Ruge, D., 1950, Functional recovery following the use of homogenous nerve grafts. *Surgery*, 27, 102.
- Dicke, H.W., Marquet, R.L., Heystek, G.A. et al., 1971, Effect of immunosuppressive treatment and leukocyte antigen matching on kidney allografts in rhesus monkeys. *Transplant. Proc.*, 3, 484.
- Droz, B. en LeBlond, C.D., 1963, Axonal migration of proteins in the central nervous system and peripheral nerves as shown by radio autography. *J. Comp. Neurol.*, 121, 325.
- Ducker, T.B. et al., 1970, Peripheral nerve grafts: experimental studies in the dog and chimpanzee to define homograft limitations. *J. Neurosurg.*, 32, 236.
- Ducker, T.B. en Hayes, G.J., 1967, A comparative study of the technique of nerve repair. *surg. Forum.*, 18, 443.
- Ducker, T.B. en Hayes, G.J., 1968, Experimental improvements in the use of silastic cuff for peripheral nerve repair. *J. Neurosurg.*, 28, 582.
- Ducker, T.B. en Hayes, G.J., 1969, Peripheral nerve injuries: a comparative study of the anatomical and functional results following primary nerve repair in chimpanzees. *Military Medicine*, 133, 298.
- Ducker, T.B., Kempe, L.G. en Hayes, G.J., 1969, The metabolic background for peripheral nerve surgery. *J. Neurosurg.*, 30, 270.
- Duinen, M.Th.A. van, 1974, De microchirurgische behandeling van het perifere zenuwletsel. *Ned. T. Geneesk.*, 118, 103.
- Ebel, H.C. en Gilman, S., 1969, Estimation of errors in conduction velocity measurements due to branching of peripheral nerve fibers. *Brain Res.*, 16, 273.
- Eberle, R.C. en Conley, J.J., 1969, Nerve suturing. *Trans. Amer. Acad. Ophthalm. otolaryng.*, 73, 274.
- Edshage, S., 1964, *Acta chir. scand.*, 331, 1.
- Edshage, S., 1968, Peripheral nerve injury, diagnosis and treatment. *New Eng. J. Med.*, 278, 1431.
- Edshage, S., 1968, Important factors in peripheral nerve repair. *New Eng. J. Med.*, 278, 1454.
- Elion, G.B., 1968, In: P. Grabau and P.R. Micocher (eds.), *Mechanisms of inflammation induced by immune reactions*. Proc. 5th Int. Symp. of Immunopathology, Grune and Stratton, New York.
- Elion, G.B., 1977, Immunosuppressive agents, *Transpl. Proc.*, 9, 1, 975.
- Es, A.A. van, 1972, Skin preservation. *Annual Report REP Organization for Health research*

- TNO, Rijswijk, The Netherlands, p. 128.
- Es, A.A. van, Marquet, R.L., Vreeswijk, W. van, Tank, B., Balner, H., 1977, Influence of matching for RhLA (SD) antigens and of mixed lymphocyte reactivity on allograft survival in unrelated rhesus monkeys. *Transplant. Proc.*, 9, 257.
- Faul, P., 1965, Ersatz der chirurgischen nervennaht durch Klebstoff. *Zentralblatt für Neurochirurgie*, 26, 2.
- Fex, S. en Thesleff, S., 1967, The time required for innervation of denervated muscles by nerve implants. *Life Sci.*, 6, 635.
- Fischler, M., Hoehne, O., Sindermann, E. en Sollmann, H., 1974, Klinische und electromyographische verlaufsuntersuchungen bei patienten mit homologen lyophilisierten nerveninterponaten. *Arch. Psychiat. Nervenkr.*, 219, 223.
- Gaster, R.N. et al., 1971, Comparison of nerve regeneration rates following controlled freezing and crushing. *Arch. Surg.*, 103, 378.
- Goldner, J.L., 1971, Biological principles of repair and regeneration of nerve and tendon. *South Med. J.*, 64, 121.
- Gorer, P.A., Mikulska, Z.B., 1954, The antibody response to tumor inoculation, improved methods of antibody detection. *Cancer research*, 14, 653.
- Gowans, J.L., 1977, Cellular mediators of allograft immunity. *Transpl. Proc.*, Vol. 9, 685.
- Grafstein, B., 1971, Role of slow axonal transport in nerve regeneration. *acta Neuropath. (Berl.)*, 5, 144.
- Greene, E.C., 1968, *Anatomy of the rat*, Hafner Publ. Co., New York.
- Guttman, L. et al., 1942, The rate of regeneration of nerve. *J. Exp. Biol.*, 19, 14.
- Gyc, R.S., Hargrave, J.C., Loewenthal, J., McLeod, J.G., Pollard, J.D. en Booth, G.C., 1972, Use of immunosuppressive agents in human nerve grafting. *The Lancet* I, 647.
- Haller Frederick, R. et al., 1971, The fine structure of the peripheral nerve root sheath in the subarachnoid space in the rat and other laboratory animals. *Amer. J. anat.*, 131, 1.
- Harkin, J.C. en Reed, R.J., 1968, Tumors of the peripheral nervous system. *Atlas of tumor pathology second series fascicle 3*. Armed Forces Inst. of Path., Washington DC, USA.
- Hirasawa, Y. en Marmor, L., 1967, The protective effect of irradiation combined with sheathing methods on experimental nerve heterografts with silastic, autogenous veins and heterogenous arteries. *J. Neurosurg.*, 27, 401.
- Hirasawa, Y., Marmor, L. en Junge, 1968, Electrophysiologic recordings in peripheral nerve heterografts. *Arch. Neurol.*, 18, 445.
- Hirasawa, Y., Marmor, L. en Liebes, D., 1967, Irradiated experimental nerve heterografts pretreated with specific antiserum. *J. Neurosurg.*, 28, 68.
- Hirasawa, Y., Oda, R., Nakatani, K. en Nojyo, Y., 1974, Experimental study of the regeneration of sympathetic nerve fibers after nerve homografting. *Plast. and Reconstr. Surg.*, 54, 671.
- Holz, A., 1974, Regeneration peripherer nerven durch implantierte vielfachcapillären. *Res. Exp. med.*, 164, 321.
- Hubbard, J.H., 1972, The quality of nerve regeneration. *Surgical clinics of North America*, 52, 1099.
- Ikeda, K., 1965, Successful peripheral nerve homotransplantation by use of high-voltage electron irradiation. *Arch. Jap. Chirurg.*, 35, 679.
- Inleiding tot de immunologie, 1971, Uitgave van de Vereniging voor Immunologie, Academische paperbacks, Utrecht.
- Iwayama, T., 1969, Relation of regenerating nerve terminals to original endplates. *Nature*, 224, 81.
- Jacoby, W. et al., 1972, Klinische Resultate nach Nervennahten mit homologen lyophilisierten interponaten. *Melsunger Medizinische Mitteilungen*, 46, 221.
- Janetta, P.J., 1968, The surgical binocular microscope in neurological surgery. *Amer. Surg.*, 34, 31.
- Jefferson, S. et al., 1964, Radiation sterilization of medical supplies. *Nuclear engineering*, p. 284.
- Kenrick, M.M., 1971, A survey of peripheral nerve injuries. *South. Med. J.*, 64, 1, 58.
- Kline, D.G., 1968, Early evaluation of peripheral nerve lesions in continuity with a note on

- nerve recording. *Amer. Surg.*, 34, 77.
- Kline, D.G. et al., 1969, Evaluation of nerve injuries by evoked potentials and electromyography. *J. Neurosurg.*, 31, 128.
- Kline, D.G., 1970, Partial nerve laceration evaluated by evoked potentials. *J. Surg. Res.*, 10, 81.
- Kline, D.G. en de Jonge, B.R., 1968, Evoked potentials to evaluate peripheral nerve injuries. *Surg. Gynec. Obstet.*, 127, 1239.
- Koenig, J. en Decol-Dechavanine, M., 1971, Relations entre l'apparition de potentiels miniatures spontanés et l'ultrastructure des plaques motrices en voie de reinnervation et de neoformation chez le rat. *Brain Res.*, 27, 43.
- Krayenbühl, H. et al., 1967, The use of binocular microscope in neurosurgery. *Wien Z., Nervenheilk.*, 25, 268.
- Kreutzberg, G.W. en Schubert, P., 1971, Volume changes in the axon during regeneration. *Acta Neuropath. (Berl.)*, 17, 220.
- Krücke, W., 1967, Zur Morphologie der erkrankungsformen peripherer Nervenfasern. *Chir. Plast. reconstr.*, 3, 1.
- Kuczynski, K., 1974, Functional micro-anatomy of the peripheral nerve trunks. *The Hand*, 6, 1.
- Kuhlendahl, H., Mumenthaler, M., Penzholz, H., Röttgen, P., Schliack, H. en Struppler, A., 1972, The treatment of peripheral nerve injuries with homologous nerve grafts. *Acta Neurochirurgica*, 26, 339.
- Lampert, P.W., 1967, A comparative electron microscopic study of reactive, degenerating, regenerating and dystrophic axons. *J. Neuropath. Exp. neurol.*, 26, 345.
- Lassmann, H. en Ammerer, H.P., 1974, Schwann cells and perineurium in neuroma. *Virchows Arch. Abt. B. Zellpath.*, 15, 313.
- Lehman, R.A.W. en Hayes, G.J., 1967, Degeneration and regeneration in peripheral nerves. *Brain*, 90, 285.
- Lehman, R.A.W. en Hayes, G.J., 1967, The toxicity of alkyl 2-cyanoacrylate tissue adhesives on brain and blood vessels. *Surgery*, 61, 915.
- Lewis, H.P. et al., 1966, Application of tissue transplant technique to nerve grafting. *Surg. Forum*, 17, 432.
- Luyet, B. en Gonzales, S., 1953, Growth of nerve tissue after freezing in liquid nitrogen. *Biodynamica*, 7, 170.
- Lyons, W.R. en Woodhall, B., 1949, Atlas of peripheral nerve injuries. W.B. Saunders Company, London.
- Madden, J.W. en Peacock, E.E., 1971, Some thoughts on repair of peripheral nerves. *South. Med. J.*, 64, 17.
- Marmor, L., 1964, The repair of peripheral nerves by irradiated homografts. *Clin. Orthopaedics and related research*, 34, 161.
- Marmor, L., 1964, Regeneration of peripheral nerves by irradiated homografts. *J. Bone Jt. Surg. (Amer.)*, 46A, 383.
- Marmor, L., 1967, Peripheral nerve regeneration using nerve grafts. Charles C. Thomas, publ., Springfield, U.S.A.
- Marmor, L., 1972, Nerve grafting in peripheral nerve repair. *Surg. Cl. of North America*, 52, 1177.
- Marmor, L., Foster, J.M., Carlson, G.J. en Arpels, J.C., 1966, Experimental irradiated nerve heterografts. *J. Neurosurg.*, 24, 656.
- Marmor, L. en Hirasawa, Y., 1967, The protective effect of irradiation combined with sheathing methods on exp. nerve heterografts. Silastic, autogenous veins and heterogenous arteries. *J. Neurosurg.*, 5, 401.
- Marmor, L. en Hirasawa, Y., 1969, Peripheral nerve homo- and heterografts. The effect of various irradiation doses and the lapse of time before implantation. *Japan J. Exp. Med.*, 39, 417.
- Marmor, L., Miner, R. en Foster, J., 1967, Experimental prevention of nerve homograft rejection by use of immunosuppressive drugs. *J. Neurosurg.*, 27, 415.
- Matson, D.E., Eben, A. en Weiss, R., 1948, Experiments on bridging of gaps in severed peripheral nerves in monkeys. *J. Neurosurg.*, 5, 230.
- Medawar, P.B. en Young, J.Z., 1944, A second study of the behaviour and fate of skin homo-

- grafts in rabbits. *J. Anatomy*, 78, 157.
- Metcalf, D., Resa Wakonig-Vaartaja, en Pradley, T.R., 1965, The growth and repopulation of thymus grafts placed under the kidney capsule. *Aust. J. Exp. Biol. med. Sci.*, 43, 17.
- Metz, R., 1970, Eine einfache Technik zur Vorbereitung von Nervenenden für die Naht. *Neurochirurgie*, 16, 80.
- Milgrom, F., 1977, Role of humoral antibodies in transplantation. *Transpl. Proc.*, 9, 721.
- Millesi, H., 1968, Zum Problem der Überbrückung von defekten peripheren Nerven. *Wien. Med. Wschr.*, 118, 182.
- Millesi, H., Garglberger, J. en Berger, A., 1967, Erfahrungen mit der Microchirurgie peripherer Nerven. *Chir. Plast. und Reconstr.*, 3, 47.
- Miranda, P. de, Reachan, L.M. en Creagh, T.H., 1973, The metabolic fate of the methyl-nitroimidazole moiety of azothioprine in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 187, 588.
- Miyazaki, T. et al., 1967, Conduction velocity of peripheral nerve, especially on the morphological basis of the conduction changes. *Electromyography*, 7, 183.
- Moberg, E., 1958, Objective methods for determining the functional value of sensibility in the hand. *Bone and Int. Surgery*, 40, 454.
- Moberg, E., 1968, Ninhydrin probe. *Dringliche Handchirurgie*. Georg Thieme Verlag.
- Morotomi, T. et al., 1967, The new method of suturing traumatic peripheral nerve paralysis. *Int. Surg.*, 48, 164.
- Morris, J.H. et al., 1972, A study of degeneration and regeneration in the divided rat sciatic nerve based on electron microscopy. I. The traumatic degeneration of myelin in the proximal stump of the divided nerve. *Z. Zellforsch.*, 124, 76.
- Mumenthaler, M., 1967, Die Neurologie der Verletzung Peripherer Nerven. *Chir. Plast. Reconstr.*, 3.
- Mumenthaler, M., 1970, Mechanische Läsionen Peripherer Nerven durch ärztliche Eingriffe. *Therapeutische Umschau* Band, 27, 365.
- Murray, J.E., Scheil, A.G.R., Moseley, R., 1964, Analysis of mechanisms of immunosuppression in renal homotransplantation. *Ann. Surg.*, 160, 449.
- Nakajima, S., 1966, Successful nerve homotransplantation using high energy electron irradiated grafts. *Arch. Jap. Chir.*, 35, 6.
- Nigst, H., 1955, Die Chirurgie der peripheren Nerven. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Nobel, W., 1968, Observations in the microcirculation of peripheral nerves. Proc. 5th European conference on microcirculation, Gothenburg.
- Nobel, W. en Black, D., 1974, The microcirculation of peripheral nerves: techniques for perfusion and microangiographic, macrophotographic, and photomicrographic recordings in animals. *J. Neurosurg.*, 41, 83.
- Ohno, S., 1977, The original function of MHC antigens as the general plasma membrane anchorage site of organogenesis-directing proteins. *Immunological Rev.*, 33, 60.
- Parrin, C., 1969, Paralyse faciale chirurgicale traitée par greffe nerveuse et ressort palpebral. *J. France Oto-Rhino-Laryng.*, 18, 330.
- Peters, A., Palay, S.L. en Webster, H.F., 1970, The fine structure of the nervous system: the cells and their processes. Hoebnner Medical Division, Harper and Row, New York and London.
- Peters, A., Palay, L. en Webster, H., 1977, The fine structure of the nervous system, the neurons and supporting cells. Saunders, London.
- Phillepeaux, J.M. en Vulpian, a., 1970, note sur des essais de greffe d'un tronçon du nerf lingual entre les deux bouts du nerf hypoglosse, après excision d'un segment de ce dernier nerf. *Archives du physiologie*, 3, 618.
- Piotrowski, W., 1967, Zum Problem der Nerven-naht, Erfahrungen von über 270 Patienten. *Chir. Plast. Reconstr.*, 3, 56.
- Pollard, J.D. en Fitzpatrick, L., 1973, An ultrastructural comparison of peripheral nerve allografts and autografts. *Acta Neuropath. (Berl.)*, 23, 152.
- Pollard, J.D. en Fitzpatrick, L., 1973, A comparison of the effects of irradiation and immunosuppressive agents on regeneration through peripheral nerve allografts: an ultrastructural study. *Acta Neuropath. (Berl.)*, 23, 166.
- Pollard, J.D. en McLeod, J.G., 1971, An assessment of immunosuppressive agents in experi-

- mental peripheral nerve transplantation. *Surg. Gynec. Obstet.*, 132, 839.
- Pollard, J.D., McLeod, J.G. en Gyc, R.S., 1971, The use of immunosuppressive agents in peripheral nerve homografts surgery: an experimental study. *Proc. Austr. Assoc. Neurol.*, 8, 77.
- Rood, J.J. van, Leeuwen, A. van, Persijn, G.G., Lansbergen, Q., Goulmy, E., Termijtelen, A. en Bradley, B.A., 1977, HLA compatibility in clinical transplantation. *Transpl. Proc.*, 9, 459.
- Rowe, A.W., 1966, Biochemical aspects of cryoprotective agents in freezing and thawing. *Cryobiology*, 3, 12.
- Saito, A. et al., 1969, Fine structure of neuromuscular junctions after nerve section and implantation of nerve in denervated muscle. *Exp. Molec. Pathol.*, 10, 256.
- Sanders, F.K., 1949, The fate of nerve homografts in the rabbit. *J. Anat. London*, 17, 80.
- Sanders, F.K., 1954, Preservation and transplantation of normal tissues. The preservation of nerve grafts. p. 175.
- Sanders, F.K. en Young, J.Z., 1942, The degeneration and reinnervation of grafted nerves. *J. Anat.*, 76, 143.
- Schmidt, E.M., 1969, Computer dissection of peripheral nerve bundle activity. *Computers and biomedical research*, 2, 446.
- Schnell, J. et al., 1967, The influence of ionizing radiation on various collagen-containing medical bioproducts. *Radiosterilization of medical products. Symp. Int. Atomic Energy Agency*, 145.
- Schnell, J., 1972, Aufbereitung von Nerven als Interponate. *Melsunger Medizinische Mitteilungen*, 46, 271.
- Schröder, J.M., 1972, Altered ratio between axon diameter and myelin sheath thickness in regenerated nerve fibers. *Brain research*, 45, 49.
- Schröder, J.M. en Seiffert, K.E., 1970, Die Feinstruktur der Neuromatösen Neurotisation von Nerventransplantaten. *Virchows Arch. Abt. B. Zellpath.*, 5, 219.
- Schröder, J.M. en Seiffert, K.E., 1972, Untersuchungen zur homologen Nerven transplantation. *Zbl. Neurochir.*, 33, 103.
- Seddon, H.J., 1963, Nerve grafting. *Ann. Roy. Coll. Surg. Eng.*, 32, 269.
- Seddon, H.J. en Holmes, W., 1944, The late condition of nerve homografts in man. *Surg. Gynec. Obstet.*, 79, 342.
- Seeger, W. en Metz, R., 1972, Tubulisation von Nerven mit alloplastischem Material. *Melsunger Medizinische Mitteilungen*, 46, 309.
- Seiffert, K.E., Maxion, H., Schindler, P. en Schröder, J.M., 1972, Experimentelle und klinische Untersuchungen zur homologen Nerven transplantation. *Zbl. Neurochir.*, 33, 119.
- Seiffert, K.E., Schindler, P., Thomas, E., Schröder, J.M. en Hufschmidt, F., 1968, Experimentelle technik und Ergebnisse der homologen Nerven transplantation. *Langenbecks arch. Chir.*, 322, 598.
- Seletz, E., 1966, Peripheral nerve surgery. *Progr. Neurol. Psychiatr.*, 21, 391.
- Seletz, E., 1969, Peripheral nerve surgery. *Progr. Neurol. Psychiatr.*, 24, III Neurosurg., 14, 306.
- Shaw, G.D.H., 1954, On the number of branches formed by regenerating nerve-fibers. *Brit. J. Surg.*, 42, 474.
- Silvers, W.K. en Billingham, R.F., 1970, Contributions of the rat to the immunobiology of tissue transplantation. *Transpl. Proc.*, 2, 1.
- Singh, R., en de Lange S.A., 1975, Experiments with homologous lyophilized nerve grafts in the treatment of peripheral nerve injuries. *Acta Neuro Chr. Wien* 32, 125.
- Singh, R., 1977, Moderne behandeling van perifere zenuwletsels. *Ned. T. Geneesk.*, 121, 412.
- Smith, J.W., 1966, Factors influencing nerve repair. Blood supply of peripheral nerves. *Arch. Surg.*, 93, 335.
- Snyder, C.C. et al., 1968, A preliminary clinical and histological evaluation. *Ann. Surg.*, 167, 5.
- Solheim, B.G., Bratlie, A., Whitney, N., 1975, In: Kissmeyer-Nielsen, F. (ed.), *Histocompatibility Testing 1975*. Copenhagen, Munksgaard, p. 713.
- Sorbie, C. en Porter, T.L., 1969, Reinnervation of paralysed muscles by direct motor nerve implantation. *J. Bone Jt. Surg. (Amer.)*, 51B, 156.
- Spreafico, F., Donelli, M.G., Bossi, A., Vecchi, A., Standen, S. en Garattini, S., 1973, Immuno-depressant activity and 6-mercaptopurine levels after administration of 6-mercaptopurine and azathioprine. *Transplantation*, 16, 269.

- Starzl, T.E., Weil, R., Putnam, C.W., 1977, Modern trends in kidney transplantation. *Transpl. Proc.*, vol. 9, 1.
- Stellbrink, G., 1969, Modifizierter Stenströmscher Nervenhalter für die Chirurgie der peripheren Nerven. *Chirurg*, 9, 424.
- Stener, B. et al., 1969, Angiographic and histologic studies of the vascularization of peripheral nerve tumors. *Ann. Orthop.*, 66, 113.
- Sumitsuji, N.A. et al., 1967, Electromyographic investigation of the facial muscles. *Electromyography*, 7, 77.
- Sunderland, S., 1969, Anatomical features of nerve trunks in relation to nerve injury and nerve repair. *Clin. Neurosurg.*, 17, 38.
- Tarlov, I.M.S. en Epstein, J.A., 1944, Nerve grafts: the importance of an adequate blood supply. *J. Neurosurg.*, 2, 218.
- Trump, J.G. en v.d. Graaf, R.V., 1948, Irradiation of biological materials by high energy röntgen and cathode rays. *J. Appl. Physics*, 19, 599.
- Valentin, P.A. et al., 1971, Possibilités et limites de la regeneration du nerf sciatique chez le lapin. *Rev. Chir. Orthop.*, 57, 187.
- Warren, J. et al., 1969, Electromyographic changes of brachial plexus root avulsions. *J. Neurosurg.*, 31, 137.
- Weiss, P., 1944, The technology of nerve regeneration: a review. Sutureless tubulation and related methods of nerve repair. *J. Neurosurg.*, 1, 400.
- Weiss, P., 1945, Experiments on cell and axon orientation in vitro the role of colloidal exudate in tissue organization. *J. Exp. Zool.*, 99, 353.
- Weiss, P., 1948, Nerve reunion with sleeves of frozen closed artery in rabbits, cats and monkeys. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 54, 274.
- Weiss, P., 1969, Panta rhei and so flow our nerves. *Amer. Sci.*, 57, 287.
- Weiss, P. en Hiscoe, H.B., 1948, Experiments on mechanism of nerve growth. *J. Exp. Zool.*, 107, 315.
- White, J.C., 1960, Timing of nerve suture after a gunshot wound. *Surgery*, 48, 946.
- White, J.C., 1969, Nerve regeneration after replantation of severed arms. *Ann. Surg.*, 170, 715.
- Wisc, A.J., Topuzlu, C., Davis, P. en Kaye, J., 1969, A comparative analysis of macro- and micro-surgical neuroraphy techniques. *Am. J. Surg.*, 117, 566.
- Woodruff, M.F.A., 1965, Biological and clinical aspects of organ transplantation. *Brit. med. Bull.*, 21, 176.
- Yasargil, M.G. en Peardon Donaghy, R.M., 1968, *Micro-vascular surgery*, Thieme Verlag, Stuttgart.
- Young, J.Z., Homes, W., Sanders, F.K., 1940, Nerve regeneration, importance of the peripheral stump and the value of nerve grafts, *The Lancet*, 128.
- Young, J.Z. en Medawar, P.B., 1940, Fibrin suture of peripheral nerves. Measurement of the rate of regeneration. *Lancet*, 3, 126.
- Zinkernagel, R.M., Doherty, D.C., 1974, Immunological surveillance against altered self components by sensitized T-lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis. *Nature*, 251, 547.
- Zukoski, C., Cerilli, J., 1977, Pharmacologic immunosuppression. *Transpl. Proc.*, 9, 1297.

CURRICULUM VITAE

Bertus Dirk Verhoog werd op 2 juni 1939 geboren te 's-Gravenhage. Hij bezocht het Johan de Wit Lyceum te 's-Gravenhage en behaalde in 1958 het eindexamen HBS-B. De studie in de geneeskunde werd aan de Rijksuniversiteit te Leiden gevolgd en in 1969 behaalde hij het artsexamen.

Van 1967 tot/met 1970 was hij assistent op de afdeling neurochirurgie van het Academisch Ziekenhuis Leiden (Hoofd: Professor Dr. W. Lujendijk) en het Radiobiologisch Instituut TNO te Rijswijk (Directeur: Professor Dr. D.W. van Bekkum). Hij begon zijn specialisatie tot chirurg in 1970 in het Academisch Ziekenhuis Dijkzigt onder leiding van wijlen Professor Dr. H. Muller en Professor Dr. H. van Houten.

Na de specialisatie in 1976 werden stages doorlopen in het Ikazia Ziekenhuis te Rotterdam (Hoofd: Dr. A.P. Brinkhorst) en het Antoni van Leeuwenhoek Ziekenhuis (Hoofd: Professor Dr. E.A. van Slooten). Sinds 1977 is hij als chirurg werkzaam in het Diaconessenhuis te Eindhoven.