

ONDERZOEK

HAZELIP EN GESPLETEN GEHEMELTE ALS GEVOLG VAN EEN
LOKAAL TEKORT AAN NEURALE-LIJSTCELLEN

J. VAN LIMBORGH
S. H. LIEUW KIE SONG
W. BEEN

*Uit het laboratorium voor Anatomie en Embryologie
van de Universiteit van Amsterdam.
Hoofd: Prof. Dr. J. van Limborgh.*

Trefwoorden: Embryologie – Hazelip – Gehemeltepleet

Inleiding

De ontstaanswijze van de hazelip en de gehemeltepleet is onderwerp van talrijke onderzoeken geweest. Er zijn embryonen van de mens beschreven, waarbij deze spleten toevalligerwijs in statu nascendi werden aangetroffen (o.a. Stark, 1954; Töndury, 1976), en ook onderzoeken verricht bij zoogdierembryonen, waarbij spleten ontstonden op basis van erfelijke aanleg, dan wel experimenteel werden opgewekt (Peter, 1924; Walker en Fraser, 1956; Lejour, 1970; en vele anderen). Uit de resultaten van deze onderzoeken is gebleken, dat – afgezien van een mogelijke rol van de tong bij de vorming van een gehemeltepleet (Poswillo en Roy, 1965; Schade, 1973) – de ontwikkeling van spleten in het algemeen moet worden toegeschreven aan abnormale ontwikkelingstendities van het epitheel of het mesenchym van de embryonale aangezichtsuitsteeksels (de processus nasalis medialis en lateralis, de processus maxillaris, resp. de processus palatini).

Waarnemingen van o.a. Kitamura (1966) en Kraus (1970) bij embryonen van mens en rat met gehemeltepleten gaven aanleiding tot het vermoeden dat, althans in sommige gevallen, de fusie van de epithelia van de processus palatini niet wordt gevolgd door een mesenchymale vergroeiing. Tijdens de verdere ontwikkeling laten beide processus elkaar dan weer los. Dit verschijnsel van zgn. secundaire spleetvorming ('post-closure reopening') werd door Lejour (1970) en Töndury (1976) ook waargenomen bij muize-

embryonen met zich ontwikkelende hazelippen; hier laten de epithelia van de processus nasalis medialis en lateralis weer van elkaar los. Omdat deze wijze van spleetvorming niet vergezeld gaat van enig tekort aan mesenchym, werd de conclusie getrokken, dat in deze gevallen de epithelia – waardoor dan ook – niet tot normale fusie in staat zijn.

In de meeste gevallen is evenwel vastgesteld, dat embryonale hazelippen en gehemeltepleten metterdaad gepaard gaan met een onderontwikkeling van het mesenchym, hetzij in één hetzij in meer van de aangrenzende aangezichtsuitsteeksels (o.a. Stark, 1954; Van Limborgh, 1963). Men vermoedt, dat men dan te doen heeft met zgn. primaire spleetvorming: het mesenchym is in onvoldoende mate gegroeid om de betrokken aangezichtsuitsteeksels met elkaar in contact te brengen. Primaire spleten worden dus gezien als gevolg van een lokaal achterblijvende groei van het mesenchym.

Omdat deze lokale achterstand in mesenchymgroei zo veelvuldig voorkomt, leek het de moeite waard een nader onderzoek in te stellen naar de mogelijke oorzaken hiervan.

In dit verband moesten natuurlijk verschillende (groepen van) factoren, die de mesenchymgroei zouden kunnen remmen, in de overwegingen betrokken worden. Speciaal ging onze aandacht echter uit naar de mogelijke betekenis van de invloed van cellen van de neurale lijst. De resultaten van recente onderzoeken, zoals die van Johnston (1966, 1975), Van Oostrom (1972) en Le Lièvre (1978), hebben na-

Samenvatting:

Om de vraag te beantwoorden of hazelippen en gehemeltepleten toe te schrijven zouden kunnen zijn aan een lokaal tekort aan neurale-lijstcellen, werd bij 250 kippe-embryonen van de ontwikkelingsstadia van 6-8 oersegmenten (30-36 bebroedingsuren) door middel van tangentiële microlaserbestraling unilateraal het mesencefale deel van de neurale lijst partieel uitgeschakeld.

De koppen van de overlevende embryonen werden, bij een coupe-dikte van 10 micron, in serie gesneden en de coupeseries microscopisch bestudeerd. Bij 3 van de 36 embryonen, die 24 uur na de bestraling waren opgeofferd, werd aan de bestraalde zijde een onmiskenbaar tekort aan mesenchym in de aanleg van de processus maxillaris waargenomen. Onder de 63 embryonen van 7 dagen en 9 embryonen van 12 dagen, die de ingreep hadden overleefd, bleken er in totaal 14 te zijn met een hazelip en 5 met een combinatie van een hazelip en een wijde gehemeltepleet. Uit deze waarnemingen wordt de conclusie getrokken dat, met als intermediair een ten achter blijvende mesenchymgroei in de processus maxillaris, hazelippen en gehemeltepleten kunnen ontstaan als gevolg van een partieel tekort aan mesencefale neurale-lijstcellen.

melijk nog eens onderstreept, hoe groot de bijdrage is die deze cellen aan het mesenchym in de aangezichtsuitsteeksels leveren. Op grond van deze resultaten rees de vraag, of lokale achterstand in mesenchymgroei wellicht gevolg kon zijn van een lokaal tekort aan neurale-lijstcellen.

Als aanzet tot beantwoording van deze vraag werd bij kippe-embryonen op beperkte schaal een onderzoek verricht naar het effect van partiële uitschakeling van het mesencefale deel van de neurale lijst (dit deel van de lijst werd gekozen, omdat blijkens het onderzoek van Johnston veel cellen hieruit migreren naar het dorsale deel van de eerste kieuwboog, d.i. de aanleg van de processus maxillaris). Bij ongeveer een kwart van de overlevende embryonen bleek na deze ingreep een laterale hazelip, soms gecombineerd met een gehemeltepleet, te ontstaan (Been en Lieuw Kie Song, 1978).

Deze eerste positieve resultaten leidden tot voortzetting van de experimenten, en over de waarnemingen bij het thans voorhanden, omvangrijker onderzoekmateriaal wordt in het hiernavolgende verslag uitgebracht.

Materiaal en methode

De onderzoeken werden uitgevoerd bij kippe-embryonen van het ras Witte Leghorn. De eieren werden bebroed in een broedstuf met een constante temperatuur van 38 °C en een relatieve vochtigheid, die varieerde van 60-70%.

De partiële uitschakeling van het mesencefale deel van de neurale lijst werd bewerkstelligd door een tangentiale laserbestraling.

De bestraling, die steeds eenzijdig (links) werd uitgevoerd, duurde 1/10 seconde, bij een energie-'output' van 0.055 Joules. Op deze wijze werd van de neurale lijst een oppervlak van ongeveer 0.30 x 0.25 mm beschadigd.

De toegepaste werkwijze was als volgt. Na een bebroedingsduur van 30-36 uur werd de eierschaal boven het embryo geopend, het eivlies verwijderd en het ontwikkelingsstadium van het embryo bepaald; voor de experimenten werden uitsluitend embryonen van de stadia van 6-8 oersegmenten gebruikt. Vervolgens werd een lichtstraal gefocust op het gebied, dat bestraald moest worden. Het embryo werd dan in een zodanige positie gebracht dat de schuin invallende laserstraal, die dezelfde focus als de lichtstraal had, het mesencefale deel van de (linker) neurale lijst transverso-tangentiaal zou passeren zonder enig ander deel van het embryo te raken. Na dit richten van het embryo werd het laserapparaat ingeschakeld. In aansluiting op de bestraling werd de opening in de eierschaal met cellofaan gesloten en het ei ter verdere bebroeding in de broedstuf teruggeplaatst.

In totaal werden 250 embryonen bestraald. Hiervan werden er, ter bestudering van het onmiddellijke bestralingseffect, 24 twee uur na de bestraling opgeofferd. Om te zien, of het mesenchym in het dorsale deel van de linker en rechter eerste kieuwboog even sterk in omvang toenam of niet, werden nog eens 36 andere embryonen na verloop van 24 uur opgeofferd. Van de overige 190 embryonen werden er 160 bebroed tot zij 7 dagen oud waren, en 30 tot de leeftijd van 12 dagen. Van deze twee groepen embryonen bleken er 63, resp. 9 de ingreep tot die leeftijden te hebben overleefd.

De opgeofferde (overlevende) embryonen werden gefixeerd in Bouin d'Hollande. Van hun kop (-aanleg) werden histologische serie-coupees vervaardigd; de coupe-dikte bedroeg 10 micron. De coupes wer-

den gekleurd met een combinatie van picrobloauw-zwart, 'nuclear fast red', Ehrlich's hematoxyline en azofloxine, en bestudeerd met een binoculaire Zeiss research-microscop.

Waarnemingen

2 uur na de bestraling

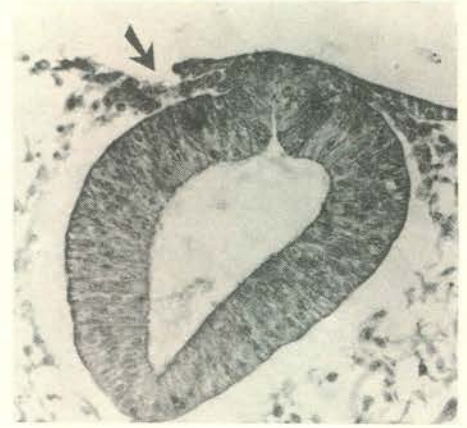
Bij de embryonen, die 2 uur na de bestraling waren opgeofferd, werd een desintegratie van het bestraalde deel van de neurale lijst en het daaroverheen gelegen ectoderm waargenomen (afb. 1). Er kan geen twijfel over bestaan dat in dit gebied verreweg de meeste neurale-lijstcellen ernstig beschadigd zijn; veel van deze cellen zijn necrotisch. In de omgevende weefsels zijn echter geen tekenen van schade waar te nemen. De structuur van de wand van het nabijgelegen deel van de neurale buis (mesencefalon) is normaal; het mesenchym van mesodermale herkomst, dat links en rechts aanwezig is, toont kwantitatief geen verschil.

24 uur na de bestraling

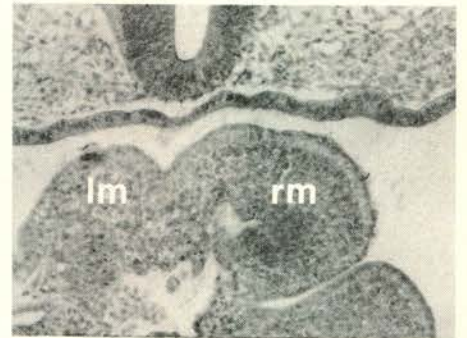
Van de 36 embryonen, die 24 uur na de bestraling waren gefixeerd, waren er 3 waarbij het zonder meer duidelijk was, dat de linker en rechter eerste kieuwboog zich in ongelijke mate ontwikkeld hadden: links, d.i. aan de bestraalde zijde, was het dorsale (maxillaire) deel van deze kieuwboog aanmerkelijk kleiner dan rechts (afb. 2). Omdat de dikte en rangschikking van de bekleedende epitheelcellen geen enkel verschil tonen, moet de linkszijdige onderontwikkeling uitsluitend worden toegeschreven aan een te geringe toeneming van het mesenchym aan deze zijde. De tweede en volgende kieuwbogen bleken zich normaal en symmetrisch ontwikkeld te hebben. Bij de andere 33 embryonen werd geen (opvallend) verschil tussen de dorsale delen van de beide eerste kieuwbogen waargenomen.

6 dagen na de bestraling

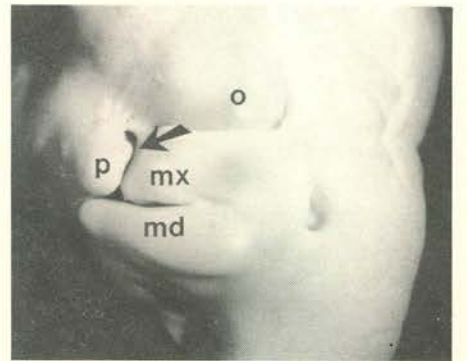
Onder de 63 embryonen, die de bestraling 6 dagen hadden overleefd (en toen dus in totaal 7 dagen oud waren), hadden er 48 een normale bovensnavel en een normaal gehemelte. De andere 15 embryonen toonden aan de linker (bestraalde) kant een laterale hazelip (afb. 3). De breedte van deze spleet varieerde enigszins. Dit hing aan de ene kant samen met de mate van onderontwikkeling van de linker processus maxillaris, die tevens bleek te bestaan, en aan de andere kant met de mate van deviatie en rotatie van de bovensnavel. De punt of wel het premaxillaire deel van de bovensnavel had zich normaal ontwikkeld; het draaiingspunt van de deviatie en rotatie ligt meer naar achteren. Aan de rechter, onbestraalde zijde bevindt zich tussen de onder-voorrand van de processus maxillaris en de sna-



Afb. 1. Transversale coupe door het mesencefalon van een bestraald embryo, dat 2 uur na de bestraling werd opgeofferd. De neurale lijst ligt beiderzijds dorsolateraal van het mesencefalon. De linker neurale lijst (pijl) is bestraald; zowel deze lijst als het daaroverheen gelegen oppervlakte-ectoderm toont desintegratie en celdood. Rechts toont de neurale lijst zijn normale aspect. 250x.



Afb. 2. Transversale coupe door het maxillaire deel van de rechter (rm) en de linker (lm) eerste kieuwboog van een bestraald embryo, dat 24 uur na de bestraling werd opgeofferd. Bij dit embryo is het desbetreffende deel van deze kieuwboog rechts (rm) normaal van omvang en links (lm) aanzienlijk te klein. 100x.



Afb. 3. Detailopname van de kop van een embryo van 7 dagen met aan de linker, bestraalde zijde een hazelip (pijl). mx: processus maxillaris, p: het premaxillaire deel van de bovensnavel (processus nasalis medialis), md: processus mandibularis, o: oogaanleg. 15x.

velpunt ook een kleine groeve, maar deze is normaal en een dehiscentie tussen de aan elkaar grenzende aangezichtsuitsteeksels bestaat hier nooit. Het onderste deel van het aangezicht, gevormd door de mondbodem, de tong en de processus mandibulares, heeft zich normaal en symmetrisch ontwikkeld.

Het microscopisch onderzoek van de serie-coupees bevestigde het bestaan van een asymmetrie in de grootte van het linker en rechter maxillaire gebied bij de 15 embryonen met een hazelip. Dit gebied is links kleiner dan rechts, zij het ook dat dit verschil niet altijd even groot is. Daarnaast bleek uit het microscopisch onderzoek echter, dat bij 4 van deze 15 embryonen tevens een gehemeltspleet aanwezig was, die veel breder was dan de spleet die normaliter bij embryonen van 7 dagen (en ook bij de andere 11 embryonen met een hazelip) werd aangetroffen (afb. 4). Deze waarneming wijst erop, dat in 4 gevallen de neiging bestond tot de ontwikkeling van een combinatie van een hazelip en een gehemeltspleet. In hoeverre het additionele ontstaan van deze gehemeltspleet gevolg zou zijn van een linkszijdig tekort aan mesenchymgroei dan wel van de tevens opgetreden lateraalwaartse deviatie van het maxillaire gebied, kon niet uit de preparaten worden opgemaakt.

11 dagen na de bestraling

Van de 9 overlevende embryonen, die op de leeftijd van 12 dagen (dus 11 dagen na de bestraling) werden opgeofferd, hadden er 5 een normale bovensnavel en een normaal gehemelte. De andere 4 toonden alle een linkszijdige laterale hazelip. Ook nu weer werd aan deze, bestraalde zijde een zekere graad van onderontwikkeling van het maxillaire gebied waargenomen. In één geval bleek de hazelip met een brede gehemeltspleet gepaard te gaan, en was dus weer een spleetcombinatie tot ontwikkeling gekomen.

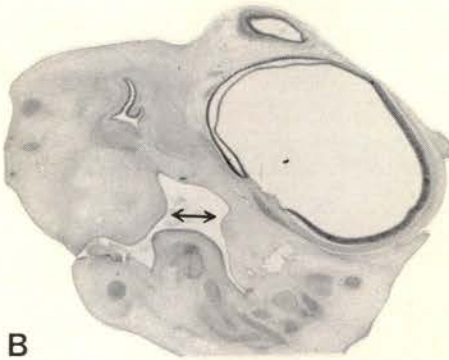
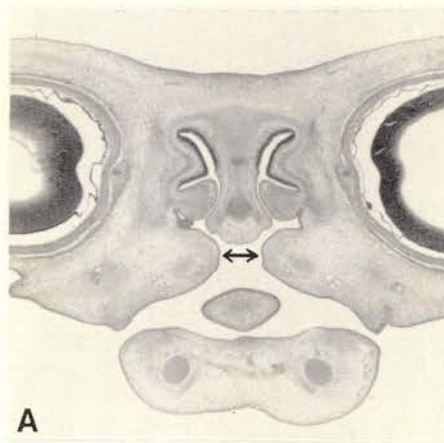
Bij de embryonen van deze leeftijdsgroep kon ook nog een (eerste) indruk worden verkregen van het verloop van de differentiatie van het skelet. Normaliter is bij 12-daagse embryonen het aangezichtsskelet volledig gedifferentieerd. Dit bleek ook het geval te zijn in de rechter gelaatshelft van de embryonen met een hazelip. In hun linker gelaatshelft evenwel, dus aan de kant van de spleet, was de differentiatie van met name het maxillaire, het jugale en het palatinum enigszins ten achter. Soms bleek de differentiatie van één of meer van deze beenderen zelfs nog niet begonnen te zijn.

Beschouwing

Uit de resultaten van de experimenten blijkt, dat partiële uitschakeling van

het mesencefale deel van de neurale lijst bij ongeveer een kwart van de (overlevende) embryonen is gevolgd door de ontwikkeling van een homolaterale hazelip, al dan niet gecombineerd met een gehemeltspleet.

Het feit dat zich niet bij alle embryonen een hazelip ontwikkelde had, is vermoedelijk te wijten aan de gebruikte methode. Omdat bij alle 24 embryonen, die 2 uur na de bestraling waren gefixeerd, een beschadiging van de neurale lijst werd waargenomen doch slechts bij 3 van de 36 embryonen, die 24 uur na de bestraling waren opgeof-



Afb. 4. Transversale coupes door het gebied van het gehemelte bij embryonen van 7 dagen. A: een normaal beeld, B: het beeld bij een bestraald embryo met een hazelip. De coupe van het normale embryo ligt meer naar ventraal dan de coupe van het bestraalde embryo; als gevolg hiervan is de processus nasalis medialis, waaruit (ook) het voorste deel van het neustussenschot wordt gevormd, in de coupe van het normale embryo wel getroffen maar in de coupe van het bestraalde embryo niet. Verder is ten gevolge van de asymmetrie van de kop in de coupe van het laatste embryo slechts één oog getroffen. Duidelijk is te zien, dat de spleet in het gehemelte (dubbele pijl) bij het bestraalde embryo breder is dan bij het normale embryo. 20x.

ferd, een manifeste onderontwikkeling van het maxillaire deel van de homolaterale eerste kieuwboog kon worden vastgesteld, ligt de veronderstelling voor de hand dat niet in alle gevallen evenveel neurale-lijstcellen beschadigd zijn, en dat alleen als een bepaald minimum-aantal van deze cellen uitgeschakeld is, het ontstaan van een hazelip het gevolg zal zijn.

Aan de andere kant is zeker dat de ontwikkeling van de hazelip niet is te weggebracht door een directe beschadiging van de aanleg van de eerste kieuwboog en het daarin gelegen mesenchym van mesodermale herkomst; de bundel laserstralen is deze structuren op afstand gepasseerd, en schade aan het mesodermale mesenchym werd metterdaad niet waargenomen. Verder zijn de enige tekenen van abnormale ontwikkeling een tekort aan groei van het mesenchym in de processus maxillaris en, later, een zekere achterstand in het ontstaan van de verbeningskernen van met name het maxillare, jugale en palatinum aan de bestraalde zijde. Wat dit laatste verschijnsel betreft was niet uit te maken, of dit een specifiek effect van het tekort aan neurale-lijstcellen is of dat het louter een gevolg is van de achterstand in de mesenchymgroei.

Hoe dit ook zij, uit al deze waarnemingen gezamenlijk kunnen de volgende conclusies worden getrokken:

1. Cellen uit het mesencefale deel van de neurale lijst dragen bij aan de toename van het mesenchym in het dorsale (maxillaire) deel van de eerste kieuwboog.
2. Uitschakeling van een bepaald aantal van deze cellen leidt tot een onderontwikkeling van het mesenchym in dit kieuwboogdeel.
3. Tijdens de verdere ontwikkeling blijft de groei van het mesenchym in de zich uit dit kieuwboogdeel ontwikkelde processus maxillaris ten achter.
4. Als gevolg van de achterstand in groei kan deze processus maxillaris niet in contact komen met de naburige zijrand van de processus nasalis medialis, zodat een laterale hazelip ontstaat.

5. Later in de ontwikkeling manifesteert zich in het betrokken maxillaire gebied een tendens tot vertraging in de ontwikkeling van de verbeingskernen.

Met betrekking tot de soms tevens voorkomende wijde gehemeltespleet is al opgemerkt, dat uit de preparaten niet kon worden opgemaakt, of deze een direct gevolg is van het tekort aan mesenchymgroei of wel gezien moet worden als secundair aan de deviatie van het linker maxillaire gebied. In elk geval is van belang vast te stellen, dat bij de onderzochte kippe-embryonen – net als bij 'spontaan' ontstane spleten bij mens en zoogdieren – de hazelip afzonderlijk of in combinatie met een gespleten gehemelte kan optreden, met andere woorden de experimenteel opgewekte spleten tonen in dit opzicht grote overeenkomst met 'spontane' spleten.

Deze grote gelijkenis maakt het stellig mogelijk, dat het nu ontdekte mechanisme van het lokale tekort aan mesencefale neurale-lijstcellen ook een rol kan spelen bij het ontstaan van 'spontane' hazelippen en gehemeltespleten. Erffactoren of milieufactoren, waarvan bekend is dat zij spleten kunnen doen ontstaan (zoals bijvoorbeeld hypervitaminose A en corticosteroiden), behoeven de groei van het aangezichtsmesenchym niet noodzakelijkerwijs rechtstreeks te remmen; zij zouden dit ook kunnen doen langs de weg van onderdrukking van de vorming van de neurale lijst dan wel van een remming van de vermenigvuldiging of de migratie van de cellen hiervan.

Het bestaan van deze mogelijkheid moet er onzes inziens toe manen, dat grote terughoudendheid wordt be-

tracht bij het voorschrijven, resp. toedienen van pijnstillende middelen of sedativa tijdens de eerste weken van de zwangerschap. Vooralnog is weliswaar onbewezen, dat deze neurotrope substanties daadwerkelijk hazelippen en gehemeltespleten opwekken, doch de kans dat zij op de ontwikkeling van neurale-lijstcellen een remmende invloed uitoefenen en langs deze weg het ontstaan van de genoemde afwijkingen zouden kunnen bevorderen, is niet denkbeeldig.

Summary:

Title: Harelip and cleft palate due to a local deficiency of neural crest cells. – In an effort to answer the question whether harelip and cleft palate conditions might be due to a local deficiency of neural crest cells, in 250 chick embryos of developmental stages varying from 6-8 somites (30-36 hours of incubation), by means of tangential microlaser irradiation unilaterally the mesencephalic neural crest was partially eliminated. The heads of the surviving embryos were serially sectioned at 10 micron and the sections microscopically studied. In 3 of the 36 embryos sacrificed 24 hours after the irradiation, on the side of irradiation a clear-cut deficiency of mesenchyme in the anlage of the maxillary process was observed. Among the 63 surviving embryos sacrificed at the age of 7 days, and the 9 embryos which reached the age of 12 days, a total of 14 specimens proved to have developed a solitary harelip condition and another 5 a combined harelip and cleft palate condition. From these observations the conclusion is drawn that, through the intermediary of insufficient growth of the mesenchyme in the maxillary process, cleft lip and palate conditions can arise as a result of a partial deficiency of mesencephalic neural crest cells.

Literatuur:

1. *Been, W., Lieuw Kie Song, S.H.* (1978): Harelip and cleft palate conditions in chick embryos following local destruction of the ce-

- chalic neural crest. A preliminary note. *Acta Morphol Neerl-Scand* 16: 245-255.
2. *Johnston, M. C.* (1966): A radioautographic study of the migration and fate of the cranial neural crest cells in the chick embryo. *Anat Rec* 156: 143-155.
3. *Johnston, M. C.* (1975): The neural crest in abnormalities of the face and brain. In: D. Bergsma, *Morphogenesis and malformations of face and brain*. Alan Liss, New York.
4. *Kitamura, H.* (1966): Epithelial remnants and pearls in the secondary palate in the human abortus: a contribution to the study of the mechanism of cleft palate formation. *Cleft Palate J* 3: 240-257.
5. *Kraus, B. S.* (1970): Basic research in cleft palate – an appraisal and some suggestions. *Cleft Palate J* 7: 1-26.
6. *Lejour, M.* (1970): Cleft lip induced in the rat. *Amer Cleft Palate Ass* 7: 169-186.
7. *Le Lièvre, C.* (1978): Participation of neural crest-derived cells in the genesis of the skull in birds. *J Embryol Exper Morphol* 47: 17-37.
8. *Limborgh, J. van* (1963): Three human embryos with harelip conditions. *Exc Med Internat Congr Ser* 70: 195.
9. *Oostrom, C. G. van* (1972): De initiële regionale ectoderm-ontwikkeling in het kopgebied bij de muis. *Acad. Proefschrift, Amsterdam*.
10. *Peter, K.* (1924): Die Entwicklung des Säugetierraumens. *Erg Anat Entw-Gesch* 25: 448-564.
11. *Poswillo, D., Roy, L. J.* (1965): The pathogenesis of cleft palate – an animal study. *Brit J Surg* 52: 902-912.
12. *Schade, G. J.* (1973): De embryonale schedelontwikkeling bij opwekking van een gespleten verhemelte. *Acad. Proefschrift, Amsterdam*.
13. *Stark, R. B.* (1954): The pathogenesis of harelip and cleft palate. *J Plast Rec Surg* 13: 20-39.
14. *Töndury, G.* (1976): Zur Genese der Lippen-Kiefer-Gaumen-Spalten. *Z Kinderchir* 19, Suppl: 5-22.
15. *Walker, B. E., Fraser, F. C.* (1956): Closure of the secondary palate in three strains of mice. *J Embryol Exper Morphol* 4: 176-189.

Mei 1981. Adres: Prof. Dr J. van Limborgh, Mauritskade 61, 1092 AD Amsterdam.