

Histophysiological studies of the inner ear

With emphasis on endolymphatic hydrops

Peter Paul G. van Benthem

Samenvatting

In *hoofdstuk 1* werd een uiteenzetting gegeven van de huidige inzichten over de mechano-electrische transductie van de haarcellen en over de fysiologie van het endolymfatische compartiment van het binnenoor, met name in relatie tot de subcellulaire morfologie van het binnenoor. Daarnaast werd de pathofysiologie van experimentele endolymfatische hydrops in het binnenoor besproken, een proefdiermodel dat overeenkomsten vertoont met de ziekte van Menière wat betreft de pathologische en functionele veranderingen van het binnenoor.

In *hoofdstuk 2* werd de luminale glycocalyx – een onderdeel van de plasmamembraan gevormd door met name de glycolipiden en glycoproteïnen die in de “outer leaflet” aanwezig zijn – van de cochleaire epithelia bestudeerd, zowel in normale als hydrops cochlea's. De elektronendichte, cytochemische markers colloïdaal thorium en gekationiseerd ferritine werden gebruikt voor de ultrastructurele aantoning van de glycocalyx. De apicale glycocalyx van de cochleaire haarcellen bleek sterk te reageren met colloïdaal thorium, terwijl de glycocalyx van de stria vascularis in minder sterke mate reageerde. Behandeling met het enzym neuraminidase voorafgaand aan incubatie met colloïdaal thorium resulteerde in een verminderde reactiviteit van de glycocalyx die het endolymfatisch compartiment bekleedt. Dit duidt op aanwezigheid van sialzuur-bevattende eiwitten en/of lipiden in de luminale membranen van de epithelia die het endolymfatische compartiment van de cochlea bekleden. Er is gesuggereerd dat de apicale glycocalyx van de cochleaire haarcellen een rol speelt in het proces van mechano-electrische transductie. De glycocalyx aanwezig op de apicale membranen van de stria vascularis zou betrokken zijn bij de instandhouding van de samenstelling van de endolymfe. In hydrops cochlea's werd de sterke reactiviteit van de apicale glycocalyx van de haarcellen voor colloïdaal thorium niet meer gezien. Biochemische disorganisatie van de glycocalyx van de haarcellen zou een veranderde glycocalyxfunctie tot gevolg kunnen hebben. Dit zou een rol kunnen spelen bij de functionele veranderingen die optreden in de hydrops cochlea.

Andere subcellulaire structuren die mogelijk belangrijk zijn voor het transductie proces zijn de zogenaamde stereociliaire “cross-links”. Zowel “side links” als “tip links” worden onderscheiden. Side links verbinden de flanken van de stereocilia en komen voor in het bovenste deel van de stereociliaire bundel. Een centrale verdichting van de side links werd geobserveerd. Waarschijnlijk hebben de side links tot doel een geïntegreerde beweging van de stereociliaire bundel te bewerkstelligen. Een tip link verbindt de tip van een korter stereocilium met de flank van een langer, naburig stereocilium. Op de plaats van insertie van de tip link wordt een submembraneuze verdichting gezien in het stereocilium. Mogelijk dat dit de plaats is waar de tip links zijn verankerd aan het cytoskelet van het stereocilium.

In *hoofdstuk 3* werden deze cross-links bestudeerd met behulp van de cytochemische markers colloïdaal thorium en gekationiseerd ferritine. Digestie met neuraminidase voorafgaande aan incubatie met colloïdaal thorium resulteerde in een sterk gereduceerde reactiviteit van de cross-links. Echter, cross-links konden nog steeds worden waargenomen als gevolg van de routinematig toegepaste post-fixatie en nacontrastering met zware metalen. Op basis van bovengenoemde structurele en cytochemische argumenten nemen wij aan dat cross-links een aparte entiteit zijn.

In experimentele endolymfatische hydrops is het verlies van cross-links een van de eerste pathologische veranderingen die optreden in de cochleaire haarcel. Het verlies van cross-links heeft tot gevolg dat de stereociliaire bundel uiteen valt. Waarschijnlijk is het verlies van cross-links in combinatie met het uiteenvallen van de stereociliaire bundel een van de factoren die bijdragen aan het ontstaan van een permanent perceptief gehoorverlies in endolymfatische hydrops.

In *hoofdstuk 4* werd de glycocalyx van de epitheelcellen van de saccus endolymphaticus bestudeerd. Colloïdaal thorium en gekationiseerd ferritine werden gebruikt om de glycocalyx aan te tonen. Er werden geen verschillen in glycocalyx reactiviteit tussen de zogenaamde "light" en "dark cells" waargenomen. Na incubatie met colloïdaal thorium werd wel een sterkere reactiviteit van de apicale membranen ten opzichte van de basolaterale membranen gezien. Digestie met neuraminidase resulteerde in sterk gereduceerde reactiviteit van alle celmembranen, iets wat duidt op de aanwezigheid van sialzuurgroepen. Het feit dat de apicale membranen sterk reageerden met colloïdaal thorium zou kunnen wijzen op een hoog gehalte van sialzuur in deze membranen. Aangezien sialzuur van belang lijkt te zijn voor het lokaal accumuleren van elektrolyten en het transport van elektrolyten over de plasmamembraan, denken wij dat specifieke samenstelling van de glycocalyx van de apicale celmembraan van invloed is op de samenstelling van de endolymfe in de saccus endolymphaticus.

In *hoofdstuk 5* werden diverse methodieken bestudeerd voor de aantoning van het enzym Na^+/K^+ -ATPase, dat sterk betrokken is bij de instandhouding van het hoge gehalte aan kalium in de endolymfe van de cochlea alsmede bij het handhaven van de hoge transepitheliale potentiaal in de scala media. De enzymcytochemische aantoning van Na^+/K^+ -ATPase activiteit is gebaseerd op het vermogen van het enzym om de fosfaatgroep van het, door ons gebruikte, substraat para-nitrofenylfosfaat af te splitsen. De fosfaatgroep wordt tijdens de incubatie direct weggevangen door zwaar metaalionen, zoals loodionen of ceriumionen, waarbij een precipitaat gevormd wordt dat voldoende elektronendicht is om in het elektronenmicroscop te kunnen worden geobserveerd. De methode waarbij loodionen worden gebruikt blijkt een meer consistent resultaat te geven dan de methode waarbij ceriumionen worden gebruikt. Elektronendichte precipitatie, wijzend op Na^+/K^+ -ATPase activiteit, werd gezien langs de basolaterale membranen van de marginale cellen van de stria vascularis, maar ook op de membranen van de stromale cellen in het spirale ligament. De basolaterale membranen van de "dark cells" van de cristae ampullares en de macula utriculi in het vestibulair apparaat vertoonden ook een significante activiteit. Nagenoeg geen activiteit werd gezien in de saccus endolymphaticus.

Volgens diverse studies is de sterk positieve transepitheliale potentiaal in de scala media verlaagd in chirurgisch geïnduceerde hydrops. Dit zou in verband kunnen staan met een verminderde activiteit van het enzym Na^+/K^+ -ATPase in de stria vascularis.

In *hoofdstuk 6* werd het effect van nimodipine – een calcium-antagonist waarvan ook Na^+/K^+ -ATPase stimulerende eigenschappen zijn beschreven – op het enzym Na^+/K^+ -ATPase in normale en hydrops cochlea's bestudeerd. Daarnaast werd het effect van nimodipine op de cochleaire functie met behulp van elektrofysiologische methoden bestudeerd. In chirurgisch geïnduceerde hydrops werden verhoogde actiepotentiaal drempels gemeten na laagfrequente stimulatie. De sommatiepotentiaal was sterk verhoogd met name bij 4 en 8 kHz. Door degeneratieve afwijkingen van de stria vascularis leek een verminderde precipitatie van loodfosfaat – en dus een verminderde activiteit van het enzym Na^+/K^+ -ATPase – aanwezig te zijn. Ook systemische toediening van nimodipine resulteerde in een verhoging van de actiepotentiaal drempels na laagfrequente stimulatie. Het effect van hydrops en nimodipine op de actiepotentialen was additief en niet interactief. Toediening van nimodipine alleen leek geen invloed te hebben op sommatiepotentialen of op de Na^+/K^+ -ATPase activiteit in de stria vascularis. Wel werd in sommige controle cochlea's een milde hydrops waargenomen na nimodipine toediening. Dit laatste zou toch weer pleiten voor een verhoogde activiteit van Na^+/K^+ -ATPase in de cochlea. Ook veranderingen in de actiepotentialen na nimodipine toediening lijken op de actiepotentiaal veranderingen die werden gemeten in chirurgisch geïnduceerde hydrops. Deze bevindingen lijken aan te tonen dat farmacologische stimulatie van het enzym Na^+/K^+ -ATPase kan leiden tot een edolymfatische hydrops in de cochlea.