

## SAMENVATTING

Het trilhaarepitheel waarmee de neus bekleed is, heeft een belangrijke functie bij de bescherming van de luchtwegen. De trilhaarslag is de stuwende kracht achter het mucociliair transportsysteem. In dit proefschrift wordt een methode beschreven waarmee de trilhaarslag van menselijk neusslijmvlies met behulp van een foto-electrische registratietechniek kan worden onderzocht. Het verkregen foto-electrische signaal heeft een complex karakter aangezien het tot stand komt door de bewegingen van de 100-200 trilharen of cilia van één cel. Bovendien wordt het signaal beïnvloed door factoren zoals trilhaar-activiteit van naburige cellen, veranderingen in de trilhaarslagfrequentie en eigenschappen van de mucus. Tot op heden werd vooral de trilhaarslagfrequentie gebruikt als parameter voor de ciliaire functie. Deze frequentie werd berekend door het aantal pieken in het geregistreerde signaal, over een bepaald tijdsinterval, te tellen. Met de computer is het tegenwoordig mogelijk een Fourier transform (FT) analyse toe te passen, waardoor de frequentie objectief vastgelegd kan worden. Daarnaast kunnen met geavanceerde software gedetailleerde analyses van de trilhaarslag worden gemaakt.

### *Parameters van de trilhaarslag in het foto-electrische signaal*

#### *Trilhaarslagfrequentie, ciliary beat frequency (CBF)*

De frequentie wordt weergegeven door de eerste piek of harmonische in het door FT analyse verkregen powerspectrum. De trilhaarslagfrequentie kan beschouwd worden als een maat voor ciliaire activiteit. Daarnaast werd de verdeling van de overige harmonischen in het powerspectrum bestudeerd in de hoop hieruit verdere informatie over de morfologie van het signaal te verkrijgen. Zodra echter de kwaliteit van het signaal iets minder wordt, door bijvoorbeeld verlies van vitaliteit of door één van de hierboven beschreven factoren, verdwijnt de tweede harmonische onder ruisniveau.

#### *Frequentieshift, CBF shift*

De grootte van de variatie van de trilhaarslagfrequentie in de tijd leverde in onze experimenten geen extra informatie op. In de forcepsbipten, die wij voornamelijk gebruikten, was de frequentie redelijk constant. Daarom werd besloten de frequentieshift niet verder te betrekken in de analyse van het signaal.

#### *Signaalconsistentie, signal consistency (SC) - harmonie van de trilhaarslag, ciliary beat harmony*

Het bleek mogelijk de consistentie van het signaal te bepalen door te middelen. De SC is een maat voor de gelijkvormigheid van de verschillende cycli en werd berekend uit de reciproke waarde van de gemiddelde SD van de cyclusvorm over een periode van 0,2 seconden. Dit bleek een betrouwbare parameter voor de mate van harmonie van de trilhaarslag. Het is

te verwachten dat het "metachrone ritme" van de trilhaarslag evenredig verandert met de SC. Metachroniciteit betekent immers dat aaneengrenzende cilia zich op een zelfde moment in opeenvolgende fasen van hun bewegingscyclus bevinden, zoals koren in de wind. Dit is een voorwaarde voor een effectief mucociliair transport.

#### *Faseverhouding*

In het algemeen bleek het niet mogelijk de verschillende fasen van de bewegingscyclus van de trilharen in het foto-electrische signaal te herkennen. Eenvoudigheidshalve berekenden we de verhouding tussen de duur van de stijgende en die van de dalende fase in de cycli. Deze verhouding bleek een grote spreiding te vertonen. Dat de verschillende fasen niet konden worden herkend zou het gevolg kunnen zijn van het gebruik van verse biopten uit het menselijk neusslijmvlies. Het is niet onwaarschijnlijk dat de faseverhouding nauwkeuriger bepaald zou kunnen worden in gekweekte trilhaarcellen. In dit geval mag men een minder complex signaal verwachten door de afwezigheid van storende factoren.

#### *Curette versus forceps biopt*

Het aanzienlijke verschil in trilhaarslagfrequentie tussen verschillende cellen van hetzelfde biopt bleek voor zowel curette- als forcepsbiopten even groot. Nochthans verkiezen wij de forcepsmethode. Ten eerste omdat in tegenstelling tot bij de curettebiopten een overvloed aan vitale cellen beschikbaar is. Ten tweede omdat de histologische architectuur van het pseudomeerlagig trilaarepitheel in de forcepsbiopten behouden blijft waardoor de in vivo situatie beter benaderd wordt. Tot slot omdat forcepsbiopten beter geschikt zijn voor onderzoek naar de invloed van diverse farmaca, aangezien ze door hun massa niet verplaatst worden tijdens superfusie.

#### *Invloed van het medium*

De biopten werden onderzocht in een vloeibaar medium. De trilhaarslagfrequentie bleek evenredig toe te nemen met de temperatuur in het door ons onderzochte gebied tussen 22,5 en 40 °C. Onze verdere experimenten werden uitgevoerd bij een temperatuur van 32 °C, aangezien deze temperatuur die van het neusslijmvlies het beste benadert. Verandering van de pH tussen 7,5 en 6,5 bleek geen invloed op de trilhaarslagfrequentie te hebben. Verandering van de osmolariteit van 300 mosm/l naar 450 mosm/l deed de frequentie evenmin veranderen. Er kon ook geen effect worden aangetoond als gevolg van superfusie met neutraal medium.

#### *Invloed van de neuscyclus*

Er werd geen relatie gevonden tussen de trilhaarslagfrequentie en de gemeten doorgankelijkheid van de beide neushelften. Evenmin was de mate van doorgankelijkheid van elke neushelft afzonderlijk van invloed op de

frequentie. Bij onderzoek van de trilhaarfunctie blijkt het derhalve niet belangrijk tijdens welke fase van de neuscyclus het biopt wordt verkregen.

### ***Ortho- en parasympathische geneesmiddelen***

Er is een aantal voordelen aan onze in vitro methode verbonden. Ten eerste kan het effect van stoffen op één en dezelfde cel onderzocht worden. Ten tweede kan een gemeten effect niet neurogeen of vasculair veroorzaakt zijn, maar moet voortvloeien uit een directe werking op de trilhaarcel.

De invloed van mediators van het autonome zenuwstelsel op de trilhaarslag is reeds uitvoerig door anderen onderzocht in vivo in de sinus maxillaris van het konijn. Er is echter weinig bekend over het effect van deze mediators op de cilia van het menselijk neusslijmvlies. Met name zijn de veranderingen in de harmonie van de trilhaarslag onbekend.

Het niet-specifieke  $\beta$ -sympathicomimeticum isoprenaline bleek een stimulerend effect te hebben op de frequentie, terwijl het  $\alpha$ -sympathicomimeticum xylometazoline de frequentie liet dalen. Het parasympathicomimeticum carbachol deed de trilhaarslagfrequentie stijgen doch alleen in hoge, niet-fysiologische concentraties, zoals gebruikt worden voor therapeutische doeleinden. Het is echter de vraag of de gemeten invloed van deze relatief hoge concentraties het resultaat is van een receptoreffect.

De SC daalde na toevoeging van xylometazoline, doch bleef onveranderd onder invloed van isoprenaline en carbachol. In geen van onze experimenten konden we vanuit de initiële experimentele conditie de harmonie van de trilhaarslag verbeteren. Dit zou erop kunnen wijzen dat onze in vitro methode de fysiologische situatie goed benadert. Alleen indien de ciliaire functie kunstmatig werd gestoord bleek het mogelijk om door middel van een  $\beta_2$ -sympathicomimeticum zowel de frequentie als de harmonie van de trilhaarslag opnieuw te stimuleren.

### ***Cocaine and lidocaine***

Beide lokaal anesthetica deden frequentie en harmonie van de trilhaarslag dosis-afhankelijk dalen. Dit effect kon worden aangetoond bij lagere concentraties dan die in de klinische praktijk gebruikelijk zijn. Bij onderzoek van de trilhaarslag is het gebruik van deze anesthetica ten behoeve van het nemen van een biopt derhalve niet gewenst.

### ***Toekomstperspectieven***

Op grond van onze ervaring beschouwen wij de foto-electrische methode een geschikte manier om de trilhaaractiviteit te bestuderen. Er kan meer informatie uit het signaal verkregen worden wanneer dit met behulp van de computer wordt geanalyseerd. Het zou van wetenschappelijke en klinische waarde zijn indien een relatie kon worden gevonden tussen de SC, als maat voor de trilhaarslagharmonie, en de effectiviteit van het mucociliair transport. Om meer gegevens over de verschillende fasen van de trilhaarslag te

verkrijgen lijkt onderzoek van gekweekte cellen, met een minder complex foto-electrisch signaal, aangewezen.

De foto-electrische methode is zeer geschikt voor het onderzoeken van de invloed van farmaca omdat trilhaarbewegingen van één cel bestudeerd kunnen worden. In de toekomst zouden met name de effecten van neuropeptiden en allergische mediators, zoals leukotrienen en prostaglandinen nog kunnen worden onderzocht. De effecten van deze stoffen zijn reeds bekend op trilhaarcellen van proefdieren en menselijk bronchiaal slijmvlies, doch de invloed op cilia van het menselijk neusslijmvlies is nog onvoldoende bestudeerd.