

Samenvatting

Ofschoon de basisprincipes van de immunohistochemie reeds in 1941 door Coons zijn uiteengezet en hoewel in de zeventiger jaren immunohistochemische technieken al volledig waren ingeburgerd in de meeste wetenschappelijke disciplines, werd pas in 1980 de eerste immunohistochemische studie van het binnenoor gepubliceerd. Sedertdien heeft het gebruik van deze onderzoeksmodaliteit in grote mate bijgedragen aan onze verdere kennis van de structuur en functie van het binnenoor.

In deze lichtmicroscopische studie werden de verschillende weefseltypen waaruit het binnenoor van de mens is opgebouwd – cochlea, vestibulaire labyrinth en ductus en saccus endolymphaticus – immunohistochemisch onderzocht. Daartoe werd het expressiepatroon van zogenoemde intermediaire filament (IF) eiwitten, cytoskeletaire componenten met een karakteristieke weefsel specificiteit, bepaald.

Techniek

In Hoofdstuk 2 is een nieuwe techniek voor immunohistochemisch onderzoek van het volwassen menselijke binnenoor (cochlea en vestibulaire labyrinth) beschreven. In essentie bestaat deze techniek uit het volledig wegboren (of anderszins wegnemen) van alle botweefsel – waaronder de benige schil die het binnenoor omgeeft – vóórdat het membraneuze labyrinth onder microscopische controle verwijderd wordt. Op deze wijze hoeft het binnenoorweefsel niet te worden ontkalkt. Deze procedure blijkt de weefsel-antigeniciteit vrijwel niet aan te tasten. Structurele weefselcomponenten, zoals de IF-eiwitten, kunnen betrouwbaar worden aangetoond.

De bewerkingsmethode kan in de navolgende stappen worden samengevat: (1) chemische fixatie van het binnenoorweefsel door intralabyrinthaire perfusie met een geschikt fixatief binnen enkele (< 3) uren na de dood, (2) vrijleggen van de benige cochlea, vestibulum en halfcirkelvormige kanalen door het bot van het rotsbeen, waarin deze structuren liggen ingebed, onder microscopische controle weg te boren, (3) microdissectie (= verwijderen van de resterende benige schil) van de cochlea, vestibulum en halfcirkelvormige kanalen, (4) *in toto* uitnemen van zowel het cochleaire als vestibulaire deel van het membraneuze labyrinth, (5) inbedden in *Tissue-Tek® II*, en (6) na invriezen tot -70 °C, snijden van 4-5 µm coupes met behulp van de cryostaat.

In de huidige studie werden alle preparaten van cochlea en vestibulaire labyrinth op deze wijze verwerkt. De ductus en saccus endolymphaticus werden op een alternatieve wijze verworven en bewerkt. Microdissectie van dit onderdeel van het binnenoor is zeer moeilijk uitvoerbaar. Specimina werden peroperatief verwijderd bij patiënten die brughoekchirurgie ondergingen via de translabyrinthaire benadering, waarna ze onmiddellijk werden ingebed in *Tissue-Tek® II* en cryostaat-gesneden. Chemische fixatie of ontkalking vond hierbij dus niet plaats.

In de Hoofdstukken 3 tot en met 6 zijn de resultaten beschreven van de immunohistochemische detectie en lokalisatie van de voornaamste cytoplasmatische IF-eiwitten in de humane cochlea (Hoofdstuk 3 en 4), het vestibulaire labyrinth (Hoofdstuk 5), en de ductus en saccus endolymphaticus (Hoofdstuk 6). Drie van de vijf onderzochte typen IF-eiwitten bleken in het menselijk binnenoor aanwezig, te weten cytokeratines (specifiek voor epithelia), vimentine (specifiek voor mesenchymale weefsels) en neurofilament-eiwitten (specifiek voor neurale weefsels). Desmine en gliafilament-eiwitten (GFAP) konden niet worden aangetoond.

In tegenstelling tot de beschrijving en bespreking in Hoofdstukken 3 tot en met 6 van het expressiepatroon van IF-eiwitten voor elk afzonderlijk deel van het menselijk binnenoor, zullen nu de resultaten voor ieder IF-eiwit apart worden samengevat voor alle onderdelen van het binnenoor.

Cytokeratines

Cytokeratines, welke over het algemeen specifiek worden gesynthetiseerd door epithelia, werden gevonden in de volledige epitheliale bekleding van het endolymfatische compartiment van het binnenoor, te weten de cochlea, het vestibulaire labyrinth en de ductus en saccus endolymphaticus. Dit bevestigt de algemeen aanvaarde epitheliale oorsprong van deze cellen. In tegenstelling tot de meeste andere mesothelia in het menselijk lichaam, bleken de verschillende mesotheliale structuren in de cochlea en het vestibulaire labyrinth geen cytokeratines, naast vimentine, te bevatten.

Cochlea

Alhoewel in de cochlea alle cellen die de scala media bekleden – inclusief de steuncellen in het orgaan van Corti – aankleurden voor cytokeratines, ontbrak aankleuring voor cytokeratines en voor alle verder onderzochte IF-eiwitten in de haarcellen van het orgaan van Corti.

Vestibulaire labyrinth

Een vrijwel identiek patroon, suggestief voor aankleuring van alléén de steuncellen en niet van de haarcellen, werd eveneens gevonden in het zintuig-epitheel van het vestibulaire labyrinth. Wel dient opgemerkt te worden dat het oplossend vermogen van de lichtmicroscopische techniek niet afdoende is om aankleuring in de haarcellen in deze epithelia definitief te kunnen uitsluiten.

Functionele implicaties

Het ontbreken van aankleuring voor alle onderzochte IF-eiwitten in de haarcellen van het orgaan van Corti (en waarschijnlijk ook in de vestibulaire haarcellen) is een ongewone, en ook onbegrepen, bevinding. Daarnaast blijkt dat, terwijl kennelijk in het cytoskelet van de haarcellen cytokeratines ontbreken, deze in ruime mate aanwezig zijn in alle omringende steuncellen. Weinig is tot nu toe bekend over de specifieke functie(s) van IF-eiwitten. Wel is het

langzamerhand alom geaccepteerd dat de stijfheid of rigiditeit van weefsels mede bepaald wordt door de aanwezigheid van cytokeratines in het cytoskelet. Deze IF-eiwitten vormen een supracellulair netwerk in weefsels door hun intercellulair contact via desmosomen. Aldus zou het specifieke voorkomen van cytokeratines in het orgaan van Corti en in het vestibulaire zintuigepitheel van functionele betekenis kunnen zijn.

In het orgaan van Corti lijkt de aanwezigheid van cytokeratines in de lamina reticularis van de steuncellen, tezamen met hun afwezigheid in de omhulde apicale gedeelten van de haarcellen, van functioneel belang. Aangenomen mag worden dat de dientengevolge optredende verschillen in stijfheid tussen deze celtypen onderling een substantiële rol speelt in de micromechanica van het orgaan van Corti. Op gelijke wijze suggereert de sterke aankleuring voor cytokeratines in het vestibulaire zintuigepitheel dat de maculae en cristae rigide structuren zijn. Deze rigiditeit kan worden verondersteld van belang te zijn in het mechano-electrische transductieproces van het evenwichtsorgaan. De elasticiteit van de cupulae en statolietmembranen zou dan worden "tegengewerkt" door de stijfheid van deze neuro-epitheliale structuren.

Differentiële expressie van cytokeratine-subtypen

In menselijke epithelia kunnen momenteel 20 verschillende cytokeratine-subtypen worden onderscheiden. Het is gebleken dat verschillende typen epithelia verschillende combinaties van cytokeratines bevatten. Aldus kunnen immunohistochemisch, met monoclonale antilichamen die specifieke cytokeratine-subtypen herkennen, verschillende typen epitheel worden onderscheiden.

In de epithelia van de cochlea en het vestibulaire labrynt werden cytokeratines aangetroffen wier voorkomen typisch is voor "eenvoudige" of éénlagige epithelia (Tabel 1). Daarentegen werden in de ductus en saccus endolymphaticus cytokeratines aangetoond die typisch zijn voor "complexe" of "gemengde" epithelia (Tabel 1). Hier werden cytokeratine 14 (en cytokeratine 17), tezamen met dezelfde cytokeratines die ook in de overige delen van het binnenoor waren gevonden, aangetoond. Deze beide cytokeratines zijn specifiek voor de basale cellaag in een meerlagig of "gemengd" epitheel. Aangezien cytokeratine 14 nog nooit is vastgesteld in een homogeen éénlagig epitheel, vormt de

Tabel 1 Expressie van verschillende cytokeratine subtypen in het menselijke binnenoor

- cochlea	Cks 7, 8, 18 & 19	"eenvoudige" of éénlagige epithelia
- vestibulaire labrynt	Cks 7, 8, 18 & 19	"eenvoudige" of éénlagige epithelia
- ductus en saccus endolymphaticus	Cks 7, 8, 14, 17*, 18 & 19	meerlagige of "gemengde" epithelia

*NB de aanwezigheid van cytokeratine 17 is niet onderzocht in de cochlea of in het vestibulaire labrynt.

aanwezigheid van dit cytokeratine in een subpopulatie van epitheliale cellen in de ductus en saccus endolymphaticus een nieuw bewijs van pseudostratificatie. Dit fenomeen werd éénmaal eerder op elektronenmicroscopisch niveau in de humane saccus beschreven. Sedertdien is deze waarneming echter controversieel gebleven.

In de cochlea konden op basis van een differentieel expressiepatroon van cytokeratine 7 twee groepen "eenvoudige", d.w.z. éénlagige, epitheliale structuren worden onderscheiden, te weten het orgaan van Corti en de marginale cellen van de stria vascularis enerzijds, en alle overige epithelia anderzijds. Het is echter onduidelijk waarom het orgaan van Corti en de stria vascularis hetzelfde cytokeratine-fenotype delen (tenminste voor wat betreft de onderzochte cytokeratines), ondanks hun totaal verschillende structuur en functie.

Vimentine

Dit IF-eiwit, dat in het volwassen organisme over het algemeen wordt gesynthetiseerd door cellen van mesenchymale oorsprong, was primair aanwezig in de subepitheliale cellen (fibroblasten) van het membraneuze labrynt (cochlea, vestibulaire labrynt en ductus en saccus endolymphaticus). Echter, vimentine was ook plaatselijk aanwezig in verschillende epitheliale structuren. Hier was dan ook sprake van co-expressie met cytokeratines. In de cochlea toonden de spirale prominentia en sulcus externus, en de binnenste- en buitenste pilaarcellen en Deiters cellen in het orgaan van Corti, co-expressie van cytokeratines en vimentine. De gehele epitheliale bekleding van het vestibulaire labrynt en de ductus en saccus endolymphaticus toonde hetzelfde fenomeen. Alhoewel de bevinding van co-expressie van cytokeratines en vimentine een verdere karakterisering van weefsels mogelijk maakt, is de betekenis ervan vooralsnog onduidelijk. Zij is tevens waargenomen in verschillende neuro-epitheliale structuren maar ook in andere epithelia en mesotheel. Verder onderzoek zal hopelijk in de toekomst de betekenis van dit fenomeen ophelderen.

Neurofilament-eiwitten

Deze door zenuwweefsel gesynthetiseerde IF-eiwitten werden uitsluitend aangetroffen in het neurale weefsel van de cochlea en het vestibulaire labrynt. Ze werden niet aangetroffen in de ductus en saccus endolymphaticus. Dit is niet uitzonderlijk aangezien dit deel van het binnenoor geen zintuigepitheel bevat. Zowel in de cochlea als in het vestibulaire labrynt waren deze IF-eiwitten aanwezig in de zenuwbundels van en naar de zintuigepithelia en ter plaatse van de zenuwuiteinden bij de haarcellen. Beperkte gegevens toonden een variabele aankleuring voor de neurofilament-eiwitten in de cellen van het ganglion spirale. De vestibulaire ganglioncellen werden in deze studie niet onderzocht.

Overwegingen t.a.v. toekomstig onderzoek

De toepassing van immunohistochemische technieken op het menselijke binnenoor (rotsbeen) is zich geleidelijk aan het ontwikkelen. Het is bij uitstek een fraaie modaliteit voor onderzoek naar de relatie tussen structuur en functie, waarin het een aanvulling betekent op morfologische onderzoekstechnieken, gezien het onderscheidend vermogen op moleculair niveau.

Tot op heden zijn echter de meeste immunohistochemische studies van het binnenoor, zoals bijvoorbeeld de onderzoeken op het gebied van haarcelcontractiliteit, verricht op geïsoleerde haarcellen van diverse zoogdieren. Alhoewel deze studies van groot belang zijn en in hoge mate hebben bijgedragen aan ons begrip over de fundamentele principes van de werking van haarcellen, is er nu behoefte aan uitbreiding van vergelijkbaar onderzoek naar functionele eenheden zoals het orgaan van Corti, de maculae sacculi en utriculi, de cristae ampullares en de ductus en saccus endolymphaticus. Dergelijk onderzoek zou dan tevens op humaan materiaal moeten worden verricht, zoals in de huidige studie op het terrein van IF-analyse.

Daartoe moet immunohistochemisch onderzoek, naast de meer conventionele onderzoekstechnieken, een vaste plaats krijgen in het onderzoek van het menselijke rotsbeen. Intralabyrintaire perfusie met zorgvuldig geselecteerde fixatievloeistoffen, het (voor inbeddingsdoeleinden) toepassen van speciale plastics die de antigeniciteit van weefsels ongemoeid laten, en het toepassen van dissectietechnieken – zoals in deze studie beschreven – die immunohistochemie op cryostaat-coupees mogelijk maken, zijn alle voorbeelden van belangrijke stappen voorwaarts in het proces van het toegankelijk maken van het menselijke rotsbeen voor immunohistochemisch onderzoek.

CURRICULUM VITAE

The author was born on 15 February, 1959 in Salisbury, Southern Rhodesia. After finishing secondary school in 1976, he studied medicine at the Medical Faculty of the University of Utrecht, The Netherlands, where he graduated in 1983 (MD). From 1983 to 1985 he worked as a resident in Internal Medicine (1983), Radiology (1983-1984), and Surgery (1984-1985).

From 1985 to 1986 he was a research fellow in the Laboratory for Histophysiology and Experimental Pathology (Head: Dr. J.E. Veldman) of the Department of Otorhinolaryngology (Head: Prof. Dr. E.H. Huizing), University Hospital Utrecht.

From 1986 to 1990 he worked as a resident in Otorhinolaryngology at the Department of Otorhinolaryngology (Head: Prof. Dr. E.H. Huizing), University Hospital Utrecht.

In 1990 he was registered as an ENT-surgeon, and since January 1991 he is on the medical staff of the Westfries Gasthuis, Hoorn, The Netherlands. The author is married to Eliane Annette Moons. They have one daughter.