

OTOTOXICITEIT VAN
CHLOORAMFENICOL

E. N. BRONS - OTOTOXICITEIT VAN CHLOORAMFENICOL

E. N. BRONS

OTOTOXICITEIT VAN CHLOORAMFENICOL

OTOTOXICITEIT VAN CHLOORAMFENICOL

Het effect van chlooramfenicol op de cochleaire microfonie
en de actiepotentialen van de n. acusticus, na locale toediening op de
ronde venstermembraan van caviae

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN
DOCTOR IN DE GENEESKUNDE AAN DE RIJKS-
UNIVERSITEIT TE LEIDEN, OP GEZAG VAN DE
RECTOR MAGNIFICUS DR. A. E. COHEN, HOOG-
LERAAR IN DE FACULTEIT DER LETTEREN,
VOLGENS BESLUIT VAN HET COLLEGE VAN
DEKANEN TE VERDEDIGEN OP DINSDAG
24 JUNI 1975 TE KLOKKE 15.15 UUR

Door

EPPO NORMAN BRONS

Geboren te Manistique (Michigan, U.S.A.) in 1938

Promotor:

PROF. DR. P. H. SCHMIDT

Het in dit proefschrift beschreven onderzoek werd verricht in de afdeling Keel-, Neus- en Oorheelkunde van het Universitair Medisch Centrum te Leiden.

De metingen werden verricht onder de dagelijkse leiding van Dr. J. J. Eggermont. De apparatuur, voor zover in de eigen werkplaats vervaardigd, werd ontwikkeld door Drs. A. Spoor en gebouwd door de heer P. Schotel. Het toestel met kophouder ter fixatie van het proefdier werd gebouwd door de heer V. Gerritsma. Allen zijn verbonden aan bovengenoemde afdeling.

Mijn hartelijke dank aan mevrouw G. A. M. van der Oest-Welling en mevrouw A. Mulder-Brander voor het typen van dit proefschrift.

*Aan mijn vader en moeder
Aan Rietje, Menno en Bondine*

INHOUD

	INLEIDING	9
Hoofdstuk I	LITERATUUROVERZICHT EN VRAAGSTELLING VOOR HET ONDERZOEK	13
I.1.	Het begrip ototoxiciteit	13
I.2.	Onderzoek naar ototoxiciteit in dierexperimenten	13
I.2.1.	Het chronische dierexperiment	13
I.2.2.	Het acute dierexperiment	14
I.3.	Literatuuroverzicht	14
I.3.1.	Electrofysiologische gegevens	14
I.3.2.	Morfologische gegevens	15
I.3.3.	Invloed van de conditie van het proefdier	16
I.4.	Discussie literatuuroverzicht	16
I.5.	Vraagstelling eigen onderzoek	17
Hoofdstuk II	MEETOPSTELLING EN MEETPROCEDURE	19
II.1.	Het proefdier	19
II.1.1.	De keuze van het proefdier	19
II.1.2.	Premedicatie en narcose	19
II.1.3.	Operatiemethode	19
II.1.4.	Opstelling van het proefdier	19
II.2.	Chlooramfenicol	20
II.2.1.	Inleiding	20
II.2.2.	Chlooramfenicolvorm	20
II.3.	De meetprocedure en de gemeten parameters	21
II.3.1.	Meetprocedure	21
II.3.1.1.	Gebruikte chlooramfenicolsuccinaatconcentraties	21
II.3.1.2.	De verrichte metingen	21
II.3.1.3.	Het verloop van een meting	23
II.3.2.	Parameters	24
II.3.2.1.	Parameter van de CM	24
II.3.2.2.	Parameters van de AP	24
II.4.	Stimulatie, response-afleiding en response-verwerking	25
II.4.1.	Stimulatie	25
II.4.2.	Response-afleiding en -verwerking	25
Hoofdstuk III	MEETRESULTATEN	29
III.1.	Inleiding	29
III.2.	Het gedrag van CM en AP tijdens de aanwezigheid	

	van chlooramfenicolsuccinaat op de ronde venster-membraan	29
III.2.1.	De invloed van de concentratie	32
III.2.1.1.	De invloed van de concentratie op de CM amplitude	32
III.2.1.2.	De invloed van de concentratie op de A_{N1}	32
III.2.1.3.	De invloed van de concentratie op de τ_{N1}	34
III.3.	Vergelijking van het gedrag van CM en AP voor en na de aanwezigheid van chlooramfenicolsuccinaat op de ronde venstermembraan	35
III.3.1.	De amplitude van CM en AP	35
III.3.2.	De τ_{N1}	38
III.3.3.	De amplitude-latentie karakteristiek	42
III.3.4.	Drempelmetingen	42
III.3.5.	Adaptatiemetingen	43
III.4.	Controle oren	44
III.5.	Metingen tijdens aanvullende experimenten	45
Hoofdstuk IV	BESPREKING VAN DE MEETRESULTATEN EN BEANTWOORDING VAN DE VRAAGSTELLING	47
IV.1.	Bereikt het chlooramfenicolsuccinaat in aqua dest. de cochlea vanuit het middenoor via de middenoormucosa, via het ovale venster en/of via het ronde venster?	47
IV.2.	Is er iets te zeggen over de successieve aangrijpingspunten in de cochlea?	47
IV.2.1.	Inleiding	47
IV.2.2.	Beantwoording van de vraagstelling	48
IV.3.	Welke is de maximale concentratie van chlooramfenicolsuccinaat in aqua dest., die veilig toegediend kan worden in het middenoor van de cavia en kan men daaruit de maximaal toelaatbare concentratie bij klinisch gebruik extrapoleren?	48
IV.3.1.	Inleiding	48
IV.3.2.	Beantwoording van de vraagstelling	49
IV.4.	Is de in de literatuur bestaande discrepantie tussen het effect van chlooramfenicol-oordruppels bij klinisch gebruik en na locale applicatie in het acute dierexperiment te verklaren?	51
	SAMENVATTING	55
	SUMMARY	57
	LITERATUUR	59

INLEIDING

Geluid in de uitwendige gehoorgang brengt het trommelvlies in trilling. Deze trillingen worden via de gehoorbeentjesketen overgebracht naar de vloeistof van de cochlea. De luchttrilling wordt aldus getransformeerd in een vloeistoftrilling. De energieoverdracht, van een systeem met lage akoestische impedantie (lucht) naar een systeem met hoge akoestische impedantie (vloeistof), wordt verzorgd door een transformator, gevormd door trommelvlies met keten. Deze impedantie-aanpassing is mogelijk, doordat de luchttrilling wordt opgevangen op een groot oppervlak (het trommelvlies) en via de gehoorbeentjesketen via een klein oppervlak, de als een zuiger bewegende stapesvoetplaat (*Dankbaar*, 1972), wordt overgedragen op de vloeistof van het binnenoer (*Wever en Lawrence*, 1954).

De cochlea wordt door de basilaarmembraan en de membraan van Reissner verdeeld in drie secties, nl. scala media, scala vestibuli en scala tympani. Scala vestibuli en scala tympani communiceren met elkaar bij het helicotrema en zijn gevuld met perilymphe. De scala media bevat endolympe en ligt in de vorm van een aan de top gesloten buis op de basilaarmembraan aan de zijde van de scala vestibuli.

Daar vloeistof nagenoeg niet samendrukbaar is en starre botwanden cochlea en labyrint omgeven, zal een beweging van de stapesvoetplaat naar binnen de perilymphe in de scala vestibuli drukken en de basilaarmembraan naar de scala tympani bewegen, zodat de perilymphe van de scala tympani op zijn beurt de membraan in het ronde venster naar buiten zal bewegen en omgekeerd.

Door directe microscopische observatie met stroboscopische belichting vond *von Békésy* (1943) een lopende golf, die basaal ontstaat en snel uitdooft na het bereiken van een maximale amplitude naar apicaal toe. Deze golfbeweging is voornamelijk afhankelijk van de fysische eigenschappen van de basilaarmembraan, die smal en stijf is bij de stapes, maar breed en slap bij het helicotrema. De stijfheid neemt dus af van basaal naar apicaal. De plaats van de maximum uitwijking van de basilaarmembraan is hierdoor afhankelijk van de frequentie van de trilling: naarmate de frequentie hoger is, ligt deze uitwijking dichterbij de stapesvoetplaat. Het orgaan van Corti, gelegen op de basilaarmembraan in de scala media, bevat o.a. de haarcellen. De haarcellen zijn bij de mens en cavia gerangschikt in vier rijen, nl. drie rijen buitenste en één rij binnenste haarcellen. Bij beide soorten haarcellen is één haarcel steeds verbonden met een aantal zenuwvezels. Bij de binnenste haarcellen geldt, dat één zenuwvezel slechts met één haarcel verbonden is. Bij de buitenste haarcellen is één zenuwvezel steeds met meer haarcellen verbonden (*Spoendlin*, 1966). De buitenste haarcellen met de daaraan verbonden spirale vezels hebben bij cavia's een circa 20 tot 30 dB lagere drempel dan de binnenste haarcellen met de daaraan verbonden radiaire vezels (*Wang*, 1971). De haarcellen bevinden zich op steuncellen, die op de basilaarmembraan staan. De cilia van de haarcellen zijn verbonden met de membrana tectoria.

Trillingen van de basilaarmembraan veroorzaken verschuivingen van de haarcellen t.o.v. de membrana tectoria, zodat een mechanische vervorming van de haarcellen ontstaat. Daarom worden deze ook mechanoreceptoren genoemd. Door deformatie van de haarcellen ontstaat een verandering van de elektrische weerstand, die zich bevindt tussen de positieve gelijkspanning van + 80 mVolt in de scala

media en de negatieve gelijkspanning van — 80 mVolt in de haarcellen. Deze gelijkspanning in de scala media wordt ook genoemd: „resting potential” (RP) of „endocochlear potential” (EP). Door de optredende weerstandsvariaties wordt het bestaande gelijkspanningsverschil gemoduleerd, zodat een wisselspanning ontstaat (Davis, 1965). Deze wisselspanning wordt ook genoemd: microfonisch effect, „cochlear microphonics” (CM) of receptor potentiaal. Davis (1965) veronderstelt, dat de CM één of meer stoffen doet vrijkomen in de synaps tussen de haarcel en de dendrieten van het eerste neuron, waardoor een postsynaptisch potentiaal (generatorpotentiaal) in de dendrieten van het eerste neuron ontstaat. Deze postsynaptische potentiaal heeft door additie de actiepotentiaal (ap) in het axon van het eerste neuron tot gevolg (Davis, 1965; Furukawa en Ishii, 1967; Ishii, Matsuu-*ra* en Furukawa, 1971).

De gelijkspanningspotentialen in de cochlea:

1. De positieve rustpotentiaal.

Deze endocochleaire potentiaal, die dus ook zonder akoestische stimulatie aanwezig is, is een positieve gelijkspanningspotentiaal in de scala media van gemiddeld circa 80 mVolt t.o.v. de perilymphe in de scala tympani (v. Békésy, 1952, 1; Tasaki, Davis en Eldredge, 1954; Davis *et al.*, 1958; Lawrence en Nuttall, 1970). De generatorplaats van deze rustpotentiaal is de stria vascularis (Davis *et al.*, 1958; Tasaki en Spyropolous, 1959; Kuypers en Bonting, 1970).

2. De negatieve rustpotentiaal.

Dit is een intracellulaire (Sohmer, Peake en Weiss, 1971) negatieve gelijkspanningspotentiaal van gemiddeld circa 80 mVolt t.o.v. de perilymphe van de scala tympani, die o.a. in de haarcellen wordt gevonden (v. Békésy, 1952, 1; Tasaki en Spyropolous, 1959; Konishi en Yasuno, 1963; Butler, 1965; Lawrence en Nuttall, 1970; Sohmer, Peake en Weiss, 1971).

Het microfonisch effect

De generatorplaats van de CM is het lamina reticularis-membrana tectoria gebied, dus het gebied van het haardragende deel van de haarcel (v. Békésy, 1952, 2; Tasaki, Davis en Eldredge, 1954; Konishi en Yasuno, 1963; Lawrence en Nuttall, 1970). Daar werd nl. de maximale CM waarde gemeten, terwijl er een fase omslag van de CM optrad bij verdere penetratie van de micro-electrode.

De CM wordt niet opgewekt door omzetting van akoestische energie in elektrische energie (v. Békésy, 1951, 1 en 2), maar ontstaat, doordat de akoestische energie weerstandsveranderingen aan het haardragende deel van de haarcellen doet ontstaan, waardoor de bestaande gelijkspanning, die is opgebouwd uit de beide rustpotentialen, gemoduleerd wordt tot een wisselspanning, de CM (Davis, 1965).

De hieronder te bespreken experimenten van Rice en Shinabarger (1961), Butler (1965), Honrubia en Ward (1969) en Strelhoff, Haas en Honrubia (1972) ondersteunen deze hypothese van Davis (1965).

Rice en Shinabarger (1961) vonden geen fase omslag van de CM, wanneer de polariteit van de positieve rustpotentiaal veranderde van positief naar negatief gedurende anoxie. Dit betekent, dat de CM géén modulatie van deze rustpotentiaal alleen kan zijn. Butler (1965) vond, dat de daling van de CM gedurende asphyxie evenredig was met de daling van het algebraïsche verschil tussen de positieve en negatieve rustpotentiaal („de gradient”) van circa 160 mVolt aan weerszijden van de lamina reticularis. Honrubia en Ward veranderden de positieve rustpotentiaal van de scala media in de eerste cochleawinding door toediening van gelijkspanning. Zij vonden een stijging van EP en CM met de anode in de scala media en de kathode in de scala vestibuli of tympani en een daling van EP en CM, wanneer de elektroden verwisseld werden. Er was een lineair verband tussen de EP- en CM veranderingen. De grootste toegediende gelijkspanning, die net nog geen electrolytische of thermische veranderingen in de cochlea gaf, was niet voldoende om de „de gradient” van Butler van polariteit te veranderen. Na asphyxie lukte dit echter wel, terwijl tegelijkertijd een fase omslag van de CM optrad. Immers bij asphyxie krijgt men een daling van de positieve en negatieve rustpotentiaal (Butler, 1965). Strelhoff, Haas en Honrubia (1972) maten de elektrische weerstand tussen de positieve en negatieve rustpotentiaal, waarna de weerstandsverandering o.i.v. geluidsstimulatie werd gemeten. Deze weerstandsverandering zou zeer goed een wisselstroom in de orde van grootte van de CM kunnen veroorzaken.

De CM heeft geen duidelijke drempelwaarde, d.w.z. bij verlaging van de intensiteit is er geen abrupt einde van de CM. Ook bij extreem lage intensiteiten is er nog een lineair verband, d.w.z. dat de CM amplitude evenredig is met de stimulus intensiteit, nl. zeker tot een CM waarde van circa 0,01 μ Volt (Wever, Rahm en Strother, 1959). Dit niveau wordt normaal niet bereikt, doordat het CM signaal in de ruis verloren gaat („lawaaï” van meet- en stimulatieapparatuur, van de omgeving en van het dier zelf, nl. circulatie, ademhaling en beweging; Wever, 1966). De CM maxima voor geluidsstimuli van hogere frequenties liggen meer naar de basale winding en van lagere frequenties meer naar de apicale winding (Tasaki en Fernandez, 1952; Tasaki, Davis en Legoux, 1952; Honrubia en Ward, 1968). Dit is in overeenstemming met de observaties van v. Békésy (1943, zie hierboven) van de uitwijking van de basilaïrmembraan.

De CM opgewekt in de buitenste haarcellen is evenredig met de verplaatsing van de basilaïrmembraan, terwijl de CM opgewekt in de binnenste haarcellen evenredig is met de snelheid van verplaatsing van de basilaïrmembraan (Dallos *et al.*, 1972).

De samengestelde actiepotentiaal

De AP (= compound action potential = samengestelde actiepotentiaal) is de spanningsverandering, die ontstaat door summatie van de ontladingen van de afzonderlijke zenuwvezels (ap's) ter plaatse van de modiolus.

De zenuwvezels uit de basale winding van de cochlea vuren actiepotentialen af bij het aanbieden van hoge zowel als lage stimulusfrequenties en de zenuwvezels uit de apicale winding alleen bij het aanbieden van lage stimulusfrequenties (Tasaki, 1954). Dit stemt dus overeen met de distributie van de CM in de cochlea.

De latentie van de AP (Pestalozza en Davis, 1956), de tijd die verstrijkt tussen het

begin van de CM en het moment waarop de maximum deflectie van de AP wordt bereikt, is afhankelijk van twee factoren, nl. de looptijd van de golf tot de plaats in de cochlea waar de betreffende AP wordt opgewekt en de „opbouwtijd” van die AP in synaps en n. acusticus. Het bleek, dat de latentie afhankelijk is van de frequentie van de aangeboden geluidsstimulus, dus dat AP's in response op toonstoten van hogere frequentie een kleinere latentie hebben dan AP's in response op toonstoten van lagere frequentie. Bovendien bleek de latentie ook kleiner te worden bij verhoging van de intensiteit van de geluidsstimulus (wat te maken heeft met vergroting van de activiteit in de basale winding).

Resumerend: de latentie is dus kleiner bij hogere frequenties en hogere intensiteiten.

De AP is opgebouwd uit enkele negatieve pieken. De eerste piek is de grootste, omdat bij het begin van het signaal nog alle vezels van de n. acusticus kunnen afvuren, daarna spelen de refractaire periode en de adaptatie een rol. De ap's van de afzonderlijke zenuwvezels hebben een drempelwaarde, zodat ook de AP een drempelwaarde heeft.

Hoofdstuk I

LITERATUUROVERZICHT EN VRAAGSTELLING VOOR HET ONDERZOEK

I.1. HET BEGRIP OTOTOXICITEIT

Men noemt een stof ototoxisch, wanneer het auditieve of vestibulaire systeem door die stof beschadigd wordt. Reeds lang waren bijvoorbeeld kinine en aspirine bekend als geneesmiddelen met een ototoxische bijwerking. Vooral na de 2e Wereldoorlog kwamen grote aantallen nieuwe geneesmiddelen beschikbaar. Een aantal hiervan, vooral uit de groep van de antibiotica, bleek een ototoxische bijwerking te hebben. Als voorbeelden kunnen genoemd worden: neomycine, kanamycine, framycetine, dihydrostreptomycine, gentamycine, capreomycine, viomycine en rifamycine. De ototoxiciteit werd vrijwel steeds pas na klinische toepassing van het geneesmiddel ontdekt. Pas daarna werd deze bijwerking dan ook systematisch o.a. in dierexperimenten nader onderzocht.

Morfologisch blijkt, dat primair de buitenste haarcellen worden getroffen. De toedieningswijze van het geneesmiddel lijkt hier geen invloed op te hebben. Streptomycine bijvoorbeeld is ototoxisch na parenterale toediening (Ruedi *et al.*, 1952) en na locale applicatie in het middenoor (Davis *et al.*, 1958; Koide, Hata en Hando, 1966). Ook kinine is ototoxisch zowel na orale toediening (Ruedi *et al.*, 1952) als na locale applicatie in het middenoor (Hennebert en Fernandez, 1959; Koide, Hata en Hando, 1966). Het gaat waarschijnlijk om de concentratie, die in het binnenoor wordt bereikt.

Ototoxische antibiotica hebben na parenterale toediening meestal een beschadiging volgens een identiek patroon tot gevolg. Deze beschadiging begint bij de buitenste haarcellen van de basale winding en pas later treedt een beschadiging van binnenste haarcellen op en wel beginnend in de apicale windingen (Engström en Kohonen, 1965; Kohonen, 1965; Engström, Ades en Andersson, 1966; Akivoshi *et al.*, 1971). Ook kan een stof het gehoor beschadigen, doordat deze na locale toediening op het ronde venster de samenstelling van perilymfe/endolymfe sterk verandert (IV.3.; Sohmer en Feinmesser, 1967; Arslan, 1969).

I.2. ONDERZOEK NAAR OTOTOXICITEIT IN DIEREXPERIMENTEN

Onderzoek naar ototoxiciteit van stoffen kan bij proefdieren geschieden in het chronische en in het acute experiment.

I.2.1. Het chronische dierexperiment

Onder een chronisch dierexperiment verstaat men een experiment, waarbij het priefdier langere tijd (weken tot maanden) in leven wordt gelaten. In het chronische dierexperiment kan de beschadiging worden onderzocht met:

1. Electrofysiologische methoden, bijvoorbeeld met plaatsing van een permanente elektrode op de ronde venstermembraan (Portmann, Aran en Le Bert, 1966).
2. Conditioneringsproeven.

Bij de conventionele conditioneringsproeven duurt de training van een proefdier meestal weken à maanden, voordat met geconditioneerde reflexen bepaald kan worden of het een toon niet of wel gehoord heeft. Als proefdieren worden meestal katten, honden, apen of chinchilla's (Ward en Duvall, 1971) gebruikt. Een snellere methode, echter alleen bruikbaar bij cavia's, zou de zgn. „shiver-audiometry” (Anderson en Wedenberg, 1965; Crifò, 1973 en 1974) zijn: op geluid geconditioneerde (gelijkstroomprikkel) cavia's stoppen met rillen in een koude omgeving bij het aanbieden van geluidsstimuli, die door de cavia's kunnen worden waargenomen.

3. Morfologische methoden (bijvoorbeeld West, Brummett en Himes, 1973).

1.2.2. Het acute dierexperiment

Onder een acuut dierexperiment verstaat men een experiment, waarbij het proefdier na enkele uren of dagen wordt opgeofferd. In het acute dierexperiment kan de beschadiging worden onderzocht met:

1. Electrofysiologische methoden.
2. Morfologische methoden.
3. Biochemische methoden (Kuypers en Bonting, 1970).

Deze methoden kunnen ook gecombineerd worden (Arslan, 1969; Kuypers en Bonting, 1970).

In dit proefschrift wordt verslag gedaan van experimenten, waarin de ototoxiciteit van chlooramfenicol in het acute dierexperiment electrofysiologisch onderzocht werd.

1.3. LITERATUUROVERZICHT

Gezien de kans op beenmergremming is chlooramfenicol na orale en parenterale toediening een allerm minst onschuldig medicament (Yunis, Smith en Restrepo, 1970; Hussey, 1970). Van chlooramfenicol is echter door klinisch gebruik géén ototoxische werking bekend.

Volgens Patterson en Gulick (1963), Gulick en Patterson (1964), Koide, Hata en Hando (1966), d'Angelo, Patterson en Morrow (1967) en Proud, Mittelman en Seiden (1968) zou chlooramfenicol in het acute dierexperiment, na locale applicatie op de ronde venstermembraan, echter wel ototoxisch zijn. Deze publicaties waren voor ons de directe aanleiding de gevonden ototoxische werking van chlooramfenicol na locale applicatie op de ronde venstermembraan nader te onderzoeken, daar chlooramfenicol in de kliniek gebruikt wordt in de vorm van oordruppels bij chronische otitis media.

1.3.1. Electrofysiologische gegevens

Patterson en Gulick (1963) lieten 12 mg chlooramfenicolbase (0,030 cc van een 40% oplossing) 30 minuten op de ronde venstermembraan van cavia's liggen. Bij afleiding van het microfonisch effect van de ronde venstermembraan, bij een stimulusfrequentie van 800 Hz, bleek na 9 uren een vermindering van 30 dB te zijn opgetreden. Na applicatie van fysiologisch zout daarentegen werd na 9 uren

geen verlies gemeten. Daar de cavia's na 9 uren in een te slechte conditie kwamen om betrouwbare resultaten te leveren, werden dezelfde proeven bij katten herhaald (Gulick en Patterson, 1964). Merkwaardigerwijze bedroeg het verlies nu maximaal 3 à 5 dB gedurende de 30 à 60 uren dat gemeten werd. Het grootste CM verlies trad na circa 9 uren op. Dit verlies is nauwelijks groter dan de 2 à 3 dB CM verlies, die reeds 10 à 15 minuten na de plaatsing van de electrode op de ronde venstermembraan optreedt (Gulick, 1958). Dit CM verlies kan echter worden veroorzaakt door vochtontwikkeling rond de electrode op de ronde venstermembraan (Eggermont, 1972). Wordt bij katten echter i.p.v. chlooramfenicolbase chlooramfenicolsuccinaat op de ronde venstermembraan geapliceerd, dan treden CM verliezen tot 40 dB op. Gulick en Patterson schrijven dit verlies toe aan een mechanische trillingsbelemmering van de ronde venstermembraan door de grote viscositeit van chlooramfenicolsuccinaat, dat enige tijd aan lucht is blootgesteld. In hoofdstuk III zal blijken, dat onze experimentele bevindingen (géén gelijktijdige vermindering van AP en CM) deze hypothese niet steunen. d'Angelo, Patterson en Morrow (1967) trachtten klinische omstandigheden na te bootsen door 8 mg chlooramfenicolsuccinaat op het middenoorslijmvlies van cavia's te blazen, waarbij slechts een klein deel, nl. circa 0,5 mg op de ronde venstermembraan terecht kwam. Bij geluidsstimuli van 500, 1000, 5000 en 10.000 Hz toonden alle met chlooramfenicol behandelde dieren een progressief verlies in de van de ronde venstermembraan afgeleide CM, gedurende de 26 uren dat gemeten werd. Bij 1000 Hz bedroeg dit tenslotte 34 dB. Controle dieren, waarbij fysiologisch zout op de ronde venstermembraan geapliceerd werd, toonden géén CM verliezen.

1.3.2. Morfologische gegevens

Koide, Hata en Hando (1966) injecteerden 0,1 ml chlooramfenicolsuccinaat 20% (20 mg) dóór het trommelvlies in het middenoor van caviae, die dan 4 à 7 dagen later voor onderzoek werden gedood. Morfologisch bleek, dat vooral buitenste haarcellen beschadigd werden.

Ook Proud, Mittelman en Seiden (1968) toonden ototoxiciteit van chlooramfenicol bij cavia's morfologisch aan. Chlooramfenicolsuccinaatoplossingen (0,035 cc met 8 mg en 16 mg chlooramfenicolsuccinaat, dus met respectievelijke concentraties van 22,9% en 45,7%) werden 30 minuten op de ronde venstermembraan gelaten, waarna de operatiewond gesloten werd. Vervolgens werden deze cavia's 3, 6, 9 of 24 uren later gedood. De cochlea toonde in de basale winding altijd een duidelijke destructie van het orgaan van Corti (binnenste en buitenste haarcellen, cellen van Deiters, cellen van Claudius, sommige cellen van Hensen, stria vascularis). In de andere windingen werd géén duidelijke beschadiging gevonden. De gevonden beschadiging was onafhankelijk van de gebruikte concentraties en van de overlevingsduur na de operatie. Controle dieren met Nasuccinaat behandeld, isotonisch en met dezelfde pH als de 45,7% chlooramfenicolsuccinaatoplossing, toonden géén beschadiging. Een opmerkelijk feit was, dat de hypertone chlooramfenicolsuccinaatoplossingen primair een vasodilatatie van de vaten van de ronde venstermembraan en promontorium teweeg brachten en secundair, na circa 10 minuten, een dusdanig sterke vasoconstrictie, dat zelfs met 40× vergroting géén vaten

werden gezien. Hypertonische oplossingen, zowel van Nasuccinaat als van NaCl, veroorzaakten vasodilatatie, welke na 10 à 15 minuten in een normale toestand overging. Isotonische NaCl-oplossingen hadden géén zichtbaar effect op de vaten. De schrijvers meenden de beschadiging te kunnen toeschrijven aan een directe werking van chlooramfenicolsuccinaat of aan een indirect effect door vasoconstrictie. *Rahm et al.* (1962) en *Gulick en Cutt* (1962) vonden echter, dat aanwezigheid van respectievelijk 0,001% adrenaline en 0,1% adrenaline, gedurende 15 minuten op de ronde venstermembraan van katten, bij 1000 Hz géén CM verliezen veroorzaakt. *Gulick, Patterson en Myers* (1962) vonden, dat na toediening van 0,1% adrenaline aan de perilymfe van de scala tympani van de basale winding van katten, bij 1000 Hz géén CM verliezen optraden. Dus ook de door chlooramfenicolsuccinaat veroorzaakte vasoconstrictie lijkt niet verantwoordelijk voor de cochlea beschadiging. Mogelijk is de vasoconstrictie een reactieve beschermingsmaatregel tegen chlooramfenicolsuccinaat opname.

I.3.3. Invloed van de conditie van het proefdier

De CM, afgeleid van de ronde venstermembraan, blijft onder normale omstandigheden gedurende lange tijd stabiel. *Rahm, Strother en Gulick* (1958) hebben bij katten, bij stimulatie met een continue toon van 1000 Hz, gedurende 15 uren geen veranderingen in de CM gemeten. *Gulick en Cutt* (1960) vonden op soortgelijke wijze bij caviae een stabiele CM gedurende 26 uren.

De arteriele zuurstofsaturatie heeft géén grote invloed op de CM, zoals door *Gulick* (1958) bij katten is vastgesteld. De CM daling, bij verlaging van de arteriele zuurstofsaturatie van 100% naar 35%, bedroeg 5 dB bij 1000 Hz (circa 18% amplitudevermindering). Ook de lichaamstemperatuur van het proefdier beïnvloedt de CM niet sterk. *Gulick en Cutt* (1960) vonden bij cavia's, bij afkoeling tot 32 °C, bij 1000 Hz geen CM daling. Zelfs na afkoeling tot 30 °C lichaamstemperatuur was volledig CM herstel mogelijk bij terugkeer naar normale lichaamstemperatuur d.w.z. 37 à 38 °C.

I.4. DISCUSSIE LITERATUUROVERZICHT

In de literatuur is ototoxiciteit van chlooramfenicol bij klinisch gebruik niet beschreven. Dit geldt zowel voor orale als voor parenterale toediening. Toch is bekend, dat chlooramfenicol de bloed-liquor barrière goed passeert (*Extra Pharmacopoeia*, 1967).

Ook van locale toediening in de vorm van oordruppels is géén ototoxisch effect beschreven. Hierbij moet wel in aanmerking genomen worden, dat bij een langzaam ontstane perceptieslechthorendheid, zoals vaak optreedt bij een chronische otitis media, het niet duidelijk is of deze veroorzaakt is door otitis, eventuele ooroperatie(s) of eventueel gebruik van chlooramfenicoloordruppels. In tegenstelling tot de afwezigheid van ototoxiciteit bij klinisch gebruik van chlooramfenicol is, zoals boven beschreven, in dierexperimenten wel een ototoxisch effect aanwijsbaar. Bijna zonder uitzondering werden hierbij hoge tot zeer hoge concentraties gebruikt (*Patterson en Gulick*, 1963/1964, 40%; *Koide, Hata en Hando*, 1966,

20%; *d'Angelo, Patterson en Morrow*, 1967, zelfs tot 100%; *Proud, Mittelman en Seiden*, 1968, 22,9 à 45,7%).

Chlooramfenicolbase en chlooramfenicolsuccinaat blijken een verschillende mate van ototoxiciteit te bezitten. *Patterson en Gulick* (1964) appliceerden chlooramfenicolbase 40% en een zelfde concentratie chlooramfenicolsuccinaat op de ronde venstermembraan van katten. Chlooramfenicolsuccinaat gaf grotere verliezen dan chlooramfenicolbase. Het grotere verlies door chlooramfenicolsuccinaat zou veroorzaakt kunnen zijn door de onvolledige verwijdering van de succinaatoplossing van het ronde venster als gevolg van de grotere viscositeit. Daarnaast is mogelijk ook de betere oplosbaarheid in water van chlooramfenicolsuccinaat (= chlooramfenicol-Nasuccinaat) verantwoordelijk voor de grotere ototoxiciteit en wel door de betere resorptie.

Waarschijnlijk bereikt lokaal in het middenoor geapliceerd chlooramfenicol het orgaan van Corti via de ronde venstermembraan en de basilair membraan. De afwijkingen aan binnenste en buitenste haarcellen zijn nl. alleen aanwezig in de basale winding (*Proud, Mittelman en Seiden*, 1968; I.3.2.). Ook na locale applicatie van streptomycine op de ronde venstermembraan van cavia's worden de binnenste en buitenste haarcellen van alléén de basale winding beschadigd (*Davis et al.*, 1958). Dit in tegenstelling tot de beschadigingen, die gevonden worden, indien antibiotica parenteraal worden toegediend bij proefdieren. Dan worden nl. naast de beschadigingen aan de buitenste haarcellen in de basale winding, eventueel ook beschadigingen in de apicale winding gevonden en wel aan de binnenste haarcellen (I.1.).

Indien lokaal in het middenoor geapliceerd chlooramfenicol het orgaan van Corti via de scala vestibuli en de membraan van Reissner zou bereiken, zijn twee routes vanuit het middenoor mogelijk, nl. passage van chlooramfenicol via het ovale venster naar de perilymfe van de scala vestibuli of passage van chlooramfenicol via het ronde venster naar de perilymfe van de scala tympani en dan via het helicotrema naar de perilymfe van de scala vestibuli. De eerste route is gezien onze eigen experimenten onwaarschijnlijk (IV.1.). In het tweede geval zouden juist de apicale windingen i.p.v. alleen de basale winding beschadigd moeten zijn.

I.5. VRAAGSTELLING EIGEN ONDERZOEK

1. Bereikt het chlooramfenicol de cochlea vanuit het middenoor via de middenoormucosa, via het ovale venster en/of via het ronde venster?
2. Is er iets te zeggen over de successieve aangrijpingspunten in de cochlea?
3. Welke is de maximale chlooramfenicolconcentratie, die veilig toegediend kan worden in het middenoor van een proefdier en kan men daaruit de maximaal toelaatbare concentratie bij klinisch gebruik extrapoleren?
4. Is de in de literatuur bestaande discrepantie tussen het effect van chlooramfenicoloordruppels bij klinisch gebruik en na locale applicatie in het acute dierexperiment te verklaren?

Hoofdstuk II

MEETOPSTELLING EN MEETPROCEDURE

II.1. HET PROEFDIER

II.1.1. *De keuze van het proefdier*

Als proefdieren werden cavia's gekozen. Dit werd gedaan voor een vergelijking met gegevens uit de literatuur en vanwege de goede bereikbaarheid van de ronde venstermembraan van deze dieren. Ter beschikking stonden vrouwelijke jonge cavia's van één stam. Het aantal voor dit onderzoek gebruikte cavia's bedroeg 34, met een gemiddeld gewicht van 395 gram (het lichaamsgewicht varieerde van 310 tot 625 gram).

II.1.2. *Premedicatie en narcose*

Circa een half uur voor de operatie kregen de proefdieren:

1. 1,5 microgram atropinesulfaat per 100 gram lichaamsgewicht i.m. Dit ter beperking van de slijmsecretie in de tractus respiratorius en ter vermindering van de vagusprikkelbaarheid. Deze dosis werd tijdens de verdere procedure om de 3 uren toegediend.
2. Neuroleptanalgesie met 0,03 ml Thalamonal (een combinatie van het neurolepticum Droperidol en het analgeticum fentanylcitraat) per 100 gram lichaamsgewicht i.m.

Vlak voor de operatie werd 0,6 ml Urethaan 20% in aqua dest. per 100 gram lichaamsgewicht intraperitoneaal toegediend, waardoor de proefdieren gedurende het gehele experiment in voldoende diepe narcose waren.

II.1.3. *Operatiemethode*

Ter voorkoming van afkoeling tijdens de operatie lag het proefdier op een electrisch verwarmd dekentje. Na verwijdering van de lichaamsbehaarung beiderzijds retro-auriculair en in de hals van het proefdier werd via retro-auriculaire incisies beiderzijds de bulla auditiva (het middenoor) blootgelegd. Onder een binoculaire operatiemicroscop werd een gaatje in de bulla geboord, dat vergroot werd door het bot verder weg te nemen tot een diameter van circa 0,5 cm. Duidelijk zichtbaar zijn dan de benige richel gevormd door het horizontale halfcirkelvormige kanaal met daaronder de ronde vensterinis met de ronde venstermembraan, het basale einde van de cochlea en de benige anulus met trommelvlies en ketendelen. Bij ieder proefdier werd tracheotomie verricht, zodat de trachea regelmatig afgezogen kon worden, waardoor een vrije luchtweg verzekerd was.

II.1.4. *Opstelling van het proefdier*

De cavia werd zodanig in een speciaal ontworpen toestel met kophouder gefixeerd, dat zij om de eigen lichaamsas kon worden gedraaid. Hierdoor was het mogelijk

de ronde venstermembraan van beide oren horizontaal te plaatsen, zodat hier vloeistof op kon worden gebracht.

De actieve of differente electrode werd op de ronde venstermembraan geplaatst m.b.v. een micromanipulator (Micromanipulateur et Récepteur de Fonbrune No. 507, Ch. Beaudouin, Paris). Als aardelectrode, tevens indifferente electrode, werd de retro-auriculaire wondspeder gebruikt, die in goed contact was met de nek-musculatuur.

Beiderzijds werd een gemodificeerde oortrechter in de uitwendige gehoorgang vastgenaaid en door verbindingsarmen met het toestel geïmmobiliseerd. Aan de oortrechter van het te meten oor werd met een goed aansluitend verloopstuk een dynamische telefoon gekoppeld (STC-4026-A). Bij de eerste proefdieren werd de geluidsdruk bij het trommelvlies gemeten met een gecalibreerde probe microfoon (Bruel en Kjaer condensor microfoon, type 2615 + type 4133 „cartridge”) in combinatie met een probe van 1,6 mm diameter en 16 cm lengte. Deze geluidsdruk was tijdens de gehele duur van de experimenten constant, zodat deze metingen bij de volgende proefdieren niet meer verricht werden.

Het proefdier bevond zich in een geluidarme kamer, tevens kooi van Faraday. Het elektrische bromniveau in de kooi van Faraday was minder dan 5 μ Volt p.p. De acoustische storing bestond voornamelijk uit zeer lage frequenties, zoals trillingen in het gebouw. Het stoorniveau werd gemeten met een Precision Sound Level Meter (Bruel en Kjaer, type 2203 met type 1613 1/3-octaf filter set) en was boven de 500 Hz tijdens de metingen constant circa 10 dB SPL per octaf bandbreedte.

Met het verwarmingssysteem in de kooi van Faraday en een om de cavia gewonnen rubberstrip met een regelbare inwendige elektrische verwarming (Hotfoil LTD, Wolverhampton, England) werd de temperatuur van het proefdier, rectaal gemeten met een kwikthermometer, constant op de normale lichaamstemperatuur van 37 à 38 °C gehouden. Verwijdering van vocht, chlooramfenicol en fysiologisch zout (spoelvocht) uit het middenoor en speciaal van de ronde venstermembraan geschiedde via zeer dunne zuigbuisjes.

II.2. CHLOORAMFENICOL

II.2.1. Inleiding

Chlooramfenicol grijpt bij snel delende weefsels, zoals beenmerg, waarschijnlijk vooral aan op de mitochondriën (Martelo, Manyan en Smith, 1969; Yunis, Smith en Restrepo, 1970). Binnen de mitochondriën speelt zich vrijwel het gehele zuurstofverbruik van de cel af (Kroon, 1969). Sato, Mizukoshi en Daly (1969) vonden, dat het zuurstofverbruik van de membraanouse cochlea in vitro daalde door chlooramfenicol. Ook in de membraanouse cochlea grijpt chlooramfenicol dus waarschijnlijk aan op de mitochondriën.

II.2.2. Chlooramfenicol vorm

Chlooramfenicol kan als base of als zout toegediend worden. Chlooramfenicolbase kwam niet in aanmerking, omdat het slecht oplosbaar is in water en het in poeder-

vorm moeilijk te doseren is. Chlooramfenicolbase is wel goed oplosbaar in propyleenglycol. Het nadeel hiervan is echter, dat deze oplossing zeer visceus is, zodat het niet goed van de ronde venstermembraan te verwijderen is. De keus viel op chlooramfenicolsuccinaat in waterige oplossing.

Gegevens betreffende chlooramfenicolsuccinaat (Extra Pharmacopoeia, 1967):

1. Chlooramfenicolsuccinaat = chlooramfenicol α Nasuccinaat (van barnsteen-
zuur) = het Nazout van de 3-succinylester van chlooramfenicolbase = $C_{15}H_{15}Cl_2N_2NaO_8$
(een lichtgeel kristallijnpoeier met een moleculair gewicht van 445.19).
2. 1,38 gram succinaat $\approx$ 1 gram base.
3. 6,38% in water is een isotone oplossing.
4. het is goed oplosbaar in water en alcohol.

II.3. DE MEETPROCEDURE EN GEMETEN PARAMETERS

II.3.1. Meetprocedure

II.3.1.1. Gebruikte chlooramfenicolsuccinaatconcentraties

Er werd 0,025 cc chlooramfenicolsuccinaatoplossing met behulp van een tubercu-
linespuit op de ronde venstermembraan van de cavia geapplianceerd en na een half
uur weer verwijderd.

De gebruikte concentraties waren (omgerekend naar chlooramfenicolbase) 4, 8,
16 en 32%. Alleen de 32% oplossing is wat visceus.

II.3.1.2. De verrichte metingen:

1. CM en AP werden bepaald *voor* en *na* de aanwezigheid van chlooramfenicol-
succinaat op de ronde venstermembraan, bij frequenties van 1, 2, 4 en 8 kHz
en bij intensiteiten van 50, 60 en 70 dB SPL. De input-output curve van de
CM d.w.z. de CM amplitude in μ Volt op een log. schaal, als functie van de
stimulusintensiteit in dB SPL, heeft bij 50, 60 en 70 dB SPL nog een lineair
verloop.
2. CM en AP werden ook bepaald *tijdens* de aanwezigheid van chlooramfe-
nicolsuccinaat op de ronde venstermembraan en wel bij frequenties van
8 kHz en bij duidelijk toxische concentraties ook bij 4 kHz en bij een intensi-
teit van 70 dB SPL. Deze metingen werden, afhankelijk van de snelheid van
verandering van de amplitude van CM en AP en de latentie van de AP, om de
1 à 3 minuten verricht.
Duidelijk toxische concentraties werden ook naast de ronde venstermembraan
geapplianceerd en wel zodanig, dat geen contact met de ronde venstermembraan
ontstond. Ook hierbij werden deze frequente metingen verricht. De totale hoe-
veelheid chlooramfenicolsuccinaatoplossing, die hierbij werd geapplianceerd, was
4 $\times$ zo groot als de normale hoeveelheid, die op de ronde venstermembraan
werd gebracht. Omdat hierbij na een half uur nog geen invloed op de CM en
AP werd waargenomen, werd de chlooramfenicolsuccinaatoplossing geduren-
de 1 uur ter plaatse gelaten. Dit werd gedaan ter beantwoording van de vraag

of de porte d'entrée van het chlooramfenicolsuccinaat de middenoormucosa, het ovale venster en/of het ronde venster is.

3. Drempelmetingen en adaptatiemetingen van de AP voor en na de aanwezigheid van chlooramfenicolsuccinaat op de ronde venstermembraan.

Drempelmeting (fig. 2.1.).

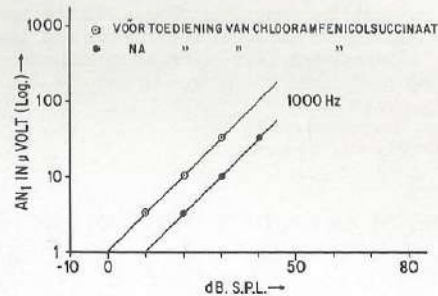


Fig. 2.1. Drempelbepaling. Input-output curven voor en na aanwezigheid van chlooramfenicolsuccinaat op de ronde venstermembraan. Het snijpunt van de input-output curve met de 1 μ Volt lijn wordt gekozen als drempelwaarde.

Drempelmetingen werden verricht voor en na toediening van chlooramfenicolsuccinaat bij 1, 2, 4 en 8 kHz. Als drempel in dB SPL werd het snijpunt genomen van de geëxtrapoleerde input-output curve met de 1 μ Volt lijn. De input-output curve heeft een lineair verloop voor de lagere intensiteiten als de A_{N1} logarithmisch wordt uitgezet (Spoor en Eggermont, 1971; Eggermont, 1972). *Adaptatiemeting* (fig. 2.2.).

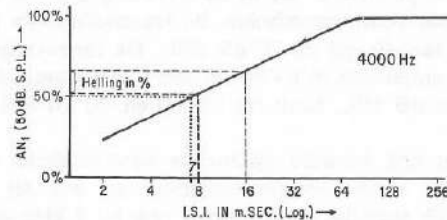


Fig. 2.2. Adaptatiebepaling. De A_{N1} als functie van het interstimulusinterval. De A_{N1} toont bij een interstimulusinterval boven de 100 msec. géén adaptatie. Het adaptatiegedrag wordt uitgedrukt in de helling (normaal 12 à 18% per octaaf) en in het 50% punt (normaal circa 7 msec. ISI).

Het adaptatiegedrag werd bepaald met repeterende stimulering met korte toonstoten, zoals aangegeven door Eggermont (1972). De adaptatietoestand is dan afhankelijk van het interstimulusinterval (ISI) en voor intensiteiten kleiner dan 30 dB van de stimulusintensiteit (Eggermont, 1972). Het ISI is weer afhankelijk van stimulusduur en stimulusherhalingsfrequentie. De A_{N1} toont bij een

ISI boven de 100 msec. géén adaptatie en werd gekozen als uitgangswaarde (100%; Eggermont, 1972). Voor een intensiteit van 50 dB SPL bij 4,6 en 8 kHz werd voor en na de chlooramfenicolsuccinaat toediening de afhankelijkheid van de A_{N1} van het ISI bepaald, welke dus een maat is voor de adaptatie. Deze afhankelijkheid kan worden gekarakteriseerd door 2 parameters, nl. de helling en het 50% punt van de A_{N1} -ISI relatie.

II.3.1.3. Het verloop van een meting

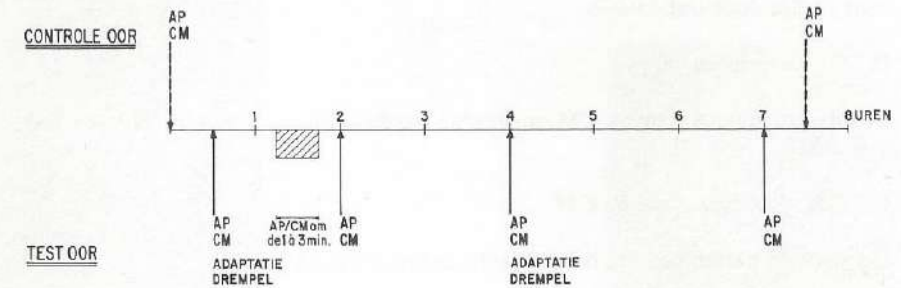


Fig. 2.3. Schematisch overzicht van het verloop van een experiment. Langs een lineaire tijdsas van 8 uren is, aan de bovenzijde voor het controleoor en aan de onderzijde voor het testoor, met pijlen het moment aangegeven, waarop de metingen van actiepotentiaal en cochleaire microfonie worden verricht. In een blok is de tijd aangegeven, dat de te testen stof zich op de ronde venstermembraan bevindt.

Het verloop van een meting bij één proefdier is schematisch weergegeven in fig. 2.3. Aan het begin en aan het eind van de metingen werden aan het controleoor de CM en AP bepaald. Daar een experiment namelijk in totaal ongeveer 8 uren duurde, was het belangrijk om zeker te zijn dat de CM en AP niet door de algemene conditie van het proefdier werden beïnvloed (zie voor een meer gedetailleerde beschrijving naar II.3.1.2. No. 1.).

Ongeveer een half uur na het begin was het dan mogelijk om aan het testoor, op soortgelijke wijze als aan het controleoor, CM- en AP metingen en bovendien drempel- en adaptatiemetingen uit te voeren, zoals beschreven onder II.3.1.2. No. 3. Circa 5 kwartier na het begin werd een bepaalde chlooramfenicolsuccinaatoplossing op de ronde venstermembraan van het testoor gebracht. Onmiddellijk na de applicatie werd de differente electrode, door de chlooramfenicolsuccinaatoplossing, weer op de ronde venstermembraan geplaatst. De gemeten amplitudewaarden waren dan t.g.v. het „vocht” gedaald, terwijl nog géén invloed van chlooramfenicolsuccinaat merkbaar was (géén verandering van de latentie van de AP). Gedurende de nu volgende 30 minuten werden om de 1 à 3 minuten de CM en AP aan dit oor gemeten, zoals beschreven is in II.3.1.2. No. 2. Hierna werd de chlooramfenicolsuccinaatoplossing weggezogen, de bulla 3 $\times$ gespoeld met fysiologisch zout en daarna zorgvuldig droog gezogen. Ook de differente electrode en de zuigbuisjes werden goed gereinigd. Vervolgens werden, respectievelijk 2, 4 en 7 uren na het begin van de metingen, opnieuw de CM en AP bepaald. Bovendien werden bij de meting na 4 uren ook weer drempel- en adaptatiemetingen verricht.

Tenslotte werden dan, zoals boven beschreven, aan het controleoor de CM en AP nog eens gemeten.

Nadat bij 10 proefdieren – waarvan bij 2 een 4% oplossing, bij 2 een 8% oplossing, bij 2 een 16% oplossing en bij 4 een 32% oplossing chlooramfenicolsuccinaat was geapplied in het testoor – uit de controlemetingen aan het controleoor gebleken was, dat de conditie van het proefdier ook na 8 uren géén belangrijke verandering van CM en AP veroorzaakte, werden géén controlemetingen meer verricht. Nu werden beide oren als testoor gebruikt. Enkele oren bleken onbruikbaar te zijn door otitis media.

II.3.2. Parameters

Enkele parameters van de CM en de AP werden gebruikt als criteria voor ototoxiciteit.

II.3.2.1. Parameter van de CM

De gemeten parameter van de CM is de amplitude in μVolt p.p.

II.3.2.2. Parameters van de AP

De van de ronde venstermembraan afgeleide AP heeft, bij de te gebruiken intensiteiten, in het algemeen twee negatieve deflecties, die de N_1 en de N_2 genoemd worden (fig. 2.4.).

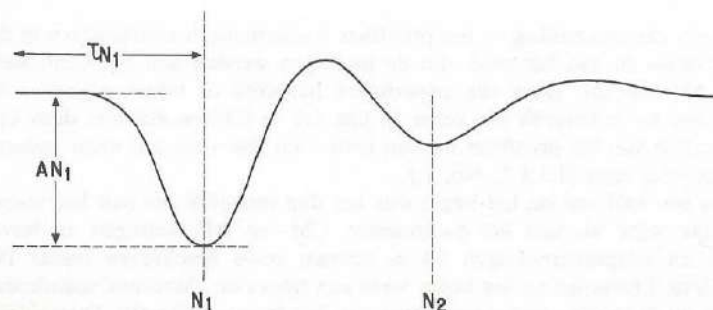


Fig. 2.4. Opbouw van een van de ronde venstermembraan afgeleide samengestelde actiepotentiaal.

In het algemeen kan men twee negatieve deflecties onderscheiden (N_1 en N_2). De gebruikte parameters zijn de amplitude van de N_1 in μVolt (A_{N1}) en de latentie van de N_1 (τ_{N1}) in msec.

De gemeten parameters van de AP:

1. De amplitude van de N_1 in μVolt (A_{N1}).
2. De latentie van de N_1 in msec. (τ_{N1}). De τ_{N1} is gedefinieerd als de tijd tussen het begin van het microfonisch effect en de top van de N_1 . Bij 4 kHz en 8 kHz is een nauwkeurige latentiebepaling mogelijk door de „scherpe” toppen van de negatieve deflecties.

De amplitude van CM en AP kunnen veranderen door een eventuele vocht-afzetting, die er voor zorgt, dat de electrode niet alleen met de ronde venstermembraan contact heeft, maar ook met de omgeving. Hierdoor kan nl. een shuntweerstand ontstaan van dezelfde grootte als de contactweerstand tussen electrode en ronde venstermembraan. De gemeten amplitude van CM en AP kunnen dan ook door deze vochtafzetting tot maximaal 50% van de „normale” waarde dalen (Eggermont, 1972). Deze verhoudingsgewijs gelijke daling van CM en AP wordt ook gezien bij de metingen tijdens de aanwezigheid van chlooramfenicolsuccinaat-oplossing op de ronde venstermembraan. Op de latentie van de AP heeft vocht op de ronde venstermembraan geen invloed.

II.4. STIMULATIE, RESPONSE-AFLEIDING EN RESPONSE-VERWERKING

II.4.1. Stimulatie

Als stimuli werden toonstoten gebruikt met een trapeziumvormige omhulling met een stijg- en afvaltijd van 2 msec. en een plateauduur van 10 msec. Bij de laagst gebruikte frequentie van 1000 Hz komt dit overeen met 2 perioden van de sinus in stijg- en afvaltijd en 10 perioden in het plateau.

De herhalingsfrequentie bedroeg 7,5 per seconde en het interstimulusinterval (ISI) 120 msec. Bij de adaptatiemetingen waren de stijg- en afvaltijd 0,33 msec. en de plateauduur 1 msec.

II.4.2. Response-afleiding en -verwerking

Er werd gekozen voor afleiding van de CM en de AP met één differente electrode van de ronde venstermembraan, omdat dit een eenvoudige methode is. Deze methode is echter wel minder selectief gericht op een bepaald cochleair gebied, dan de intracochleaire metingen met één of twee differente elektroden (Dallos, 1969). De ronde venstermembranaafleiding geeft bijvoorbeeld alleen informatie over de CM opgewekt in de basale cochleawinding (Tasaki en Fernandez, 1952). De AP is daarentegen ook bij de ronde venstermembranaafleiding afkomstig uit de hele cochlea (Teas, Eldredge en Davis, 1962). Dat bij de ronde venstermembranaafleiding alleen goede informatie wordt verkregen over de CM uit de basale cochleawinding, is echter bij deze experimenten minder belangrijk. Immers Proud, Mittelman en Seiden (1968; I.3.2.) konden, na locale applicatie van hoge concentraties chlooramfenicolsuccinaat op de ronde venstermembraan van cavia's, morfologische beschadiging van het orgaan van Corti alleen in de basale cochleawinding aantonen.

De zilvertrodelelektrode, die gebruikt werd als differente electrode, had een diameter van 0,2 mm en was aan het eind versmolten tot een bolletje van circa 0,4 mm diameter. De zilvertrodele was gecoat met een electrisch isolerende laag (Acrifix 92 verdund met aceton; Röhm en Haas, GmbH, Darmstadt).

De van de ronde venstermembraan afgeleide hoogohmige stoor gevoelige signalen werden, vlak bij de afleidingsplaats in de kooi van Faraday, 1000 $\times$ versterkt en getransformeerd tot laagohmige signalen d.m.v. een voorversterker met impedan-

tietransformator (Low Level Preamplifier, Tektronix 122 A), waarin het frequentiegebied tussen de 8 Hz en 40.000 Hz doorgelaten werd bij de gebruikte filterstanden. Buiten de kooi van Faraday werden de signalen indien nodig nog 1 à 50 × versterkt door de eindversterker en naar een averager geleid.

Voor detectie van een signaal (response) in ruis moet het signaal minstens even groot zijn als de ruis (S/R verhouding = 1). Om bij een ongunstige signaal-ruis verhouding het signaal van de ruis te onderscheiden, kan men gebruik maken van de zgn. middelingstechniek, waarbij repeterend gestimuleerd wordt. Hierbij worden signaal en ruis gedurende en vlak na de stimulatie punt voor punt vastgelegd in het geheugen van een computer. Bij elke volgende stimulatie worden het dan gemeten signaal en de ruis hier weer punt voor punt bij opgeteld en in het geheugen van de computer opgeslagen. Omdat iedere keer het gemeten signaal steeds in dezelfde fase voorkomt, zal de amplitude van het signaal na N stimulaties $N \times$ zo groot zijn. De ruis komt, omdat er géén vaste faserelatie is, met $\sqrt{N}$ vermenigvuldigd in het eindresultaat voor. Na het middelen is de signaal-ruis verhouding dus verbeterd met de factor $\sqrt{N}$ (Spoor, 1974).

Er werden door de averager 64 signalen gemiddeld. Het ruisniveau bedroeg circa 5 μ Volt p.p. Het is voldoende, voor deze vergelijkende metingen bij de te gebruiken intensiteiten, om een signaal van 1 μ Volt nog te kunnen onderscheiden, d.w.z. de signaal-ruisverhouding is 0,2, maar verbeterd door de middelingstechniek met factor 8 ($\sqrt{64}$).

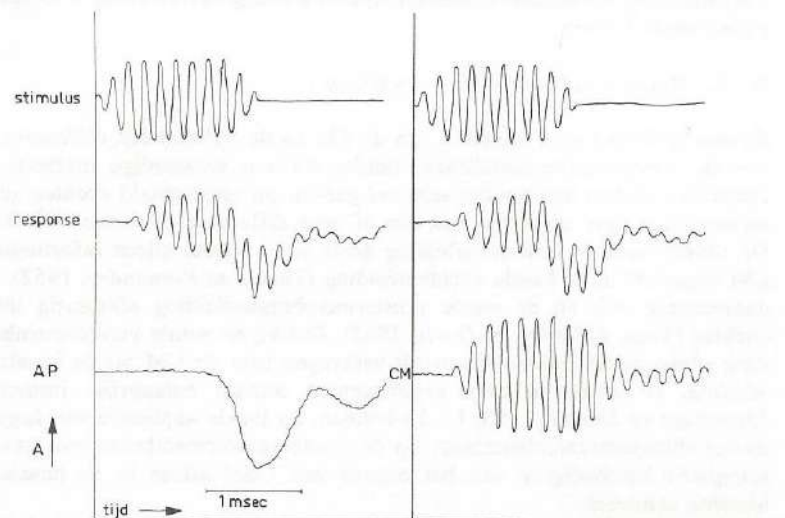


Fig. 2.5. Registratie van CM en AP.

De CM en AP komen beiden in de gemeten response voor. De CM volgt de fase van de stimulus, de AP blijft altijd negatief. Om de AP te registreren zonder bijmenging van de CM worden de toonstimuli altemnerend in fase en tegenfase aangeboden, zodat de CM uitgemiddeld wordt bij sommatie door de averager. Om de CM te registreren zonder bijmenging van de AP wordt de gemeten response altemnerend in tegenfase aangeboden aan de averager, zodat de AP uitgemiddeld wordt bij sommatie door de averager.

De CM en AP komen beide in de gemeten response voor. De CM volgt de fase van de stimulus, maar de AP blijft altijd negatief. Om de AP te registreren zonder bijmenging van de CM worden de toonstimuli altemnerend in fase en tegenfase aangeboden (commutator), zodat de CM uitgemiddeld wordt bij sommatie door de averager. Om de CM te registreren zonder bijmenging van de AP wordt de gemeten response altemnerend in tegenfase aangeboden (commutator) aan de averager, zodat de AP uitgemiddeld wordt bij sommatie door de averager (Spoor, 1974; fig. 2.5.).

De gebruikte averager (200 kanaals averager, Data Laboratories, type DL 102 S) heeft een minimaal analyse interval van 400 μ sec., wat neerkomt op 2 μ sec. per kanaal, zodat met zéér grote nauwkeurigheid de latenties van de AP bij 4 kHz en 8 kHz (II.3.2.2. No. 2.) bepaald kunnen worden. In verband met de CM registratie (∞ acoustisch signaal) werd voor 1000 Hz 10 msec. (bijvoorbeeld 2 msec. analyse interval bij 1000 Hz ∞ 100 punten = kanalen per periode en te weinig, nl. maar 2 perioden per analyse interval), voor 2000 en 4000 Hz 5 msec. en voor 8000 Hz een analyse interval van 2 msec. genomen (bijvoorbeeld 10 msec. analyse interval bij 8000 Hz ∞ te weinig, nl. slechts 2 à 3 punten = kanalen per periode en 80 perioden per analyse interval). Bij de metingen tijdens de aanwezigheid van chlooramfenicolsuccinaat op de ronde venstermembraan werd ook het analyse interval voor 4000 Hz 2 msec. i.v.m. de noodzakelijke grote snelheid, waarmee deze metingen verricht moeten worden. Bij de drempelmetingen en de adaptatiemetingen was het analyse interval 5 msec. (namelijk alleen AP metingen en géén CM metingen).

De in het geheugen van de averager opgeslagen informatie na 64 middelingen werd uitgeschreven op mm-papier met een zgn. XY recorder (HP 7035B). Een oscilloscoop (Tektronix type RM 561 A met Time-Base 2B67 en Four-Trace Amplifier 3A74) maakte een continue controle van stimulus- en responsesignalen mogelijk (fig. 2.6.).

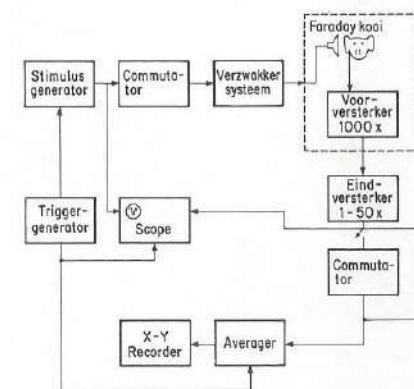


Fig. 2.6. Blokschema van de gebruikte meetopstelling.

De stimuli worden via een triggergenerator (deze bepaalt de herhalingsfrequentie van de toonstoot) gegenereerd in een stimulusgenerator (deze bepaalt de frequentie en de duur van de toonstoot). Door een ingebouwde trapeziumgenerator en multiplier kunnen trapeziumvormige toonstoten met variabele stijg- en afvaltijd en variabele plateau-duur worden opgewekt. De stimuli worden, door een elektronische commutator in de gewenste fase, via een verzwakkersysteem (de stimulus bedraagt nl. circa 20 Volt p.p. ∞ meer dan 100 dB SPL) naar de luidspreker gevoerd. De van het oor afgeleide signalen worden na versterking, al dan niet via een commutator, aan de averager aangeboden.

Hoofdstuk III

MEETRESULTATEN

III.1. INLEIDING (vergelijk II.3.1.3.)

De volgende metingen werden verricht:

1. Metingen *tijdens* aanwezigheid van chlooramfenicolsuccinaat op de ronde venstermembraan (III.2.).
2. Metingen *voor en na* aanwezigheid van chlooramfenicolsuccinaat op de ronde venstermembraan (III.3.).
3. Controlemetingen (III.4.).
4. Metingen tijdens aanvullende experimenten, vergelijk II.3.1.2. No. 2. (III.5.).

III.2. HET GEDRAG VAN CM EN AP TIJDENS DE AANWEZIGHEID VAN CHLOORAMFENICOLSUCCINAAT OP DE RONDE VENSTERMEMBRAAN

Er werden 22 cavia's (29 oren) gebruikt. De CM en AP werden, gedurende de een half uur durende aanwezigheid van verschillende concentraties chlooramfenicolsuccinaat op de ronde venstermembraan, gemeten. Dit gebeurde bij 4000 Hz en 8000 Hz.

Uitgezet werden de log. CM amplitude en de log. A_{N1} tegen de log. tijd in minuten, die verstreek vanaf het begin van chlooramfenicolsuccinaat applicatie. Als voorbeelden zijn representatieve curven van de CM amplitude en A_{N1} , voor de concentraties 4, 8, 16, 20 en 32%, weergegeven in fig. 3.1. A t/m E. Reeds bij oppervlakkige beschouwing blijkt, dat bij concentraties van 16% en hoger, de CM amplitude en de A_{N1} binnen de meettijd van 30 minuten belangrijk afnemen. Ook is duidelijk, dat de A_{N1} eerder en sneller afneemt dan de CM amplitude.

Uit de aard van de experimenten was het niet mogelijk de invloed van verschillende concentraties op éénzelfde oor te bestuderen. Hiertoe moesten verschillende oren worden gebruikt. De proefdieren onderling toonden verschillen, maar het algemene verloop was als weergegeven in deze representatieve curven. Teneinde toch kwantitatieve vergelijking mogelijk te maken, werden de gemiddelden van de gemeten oren, voor een bepaalde concentratie en frequentie, op de volgende manier bepaald.

Bij de CM amplitude- en A_{N1} curven werden bepaald:

1. Het kantelpunt in minuten na applicatie.
2. De helling in log. μ Volt/log. min.

Als voorbeeld zijn deze aangegeven in fig. 3.1.C. Voor de CM amplitude curve blijken 2 kantelpunten aanwezig te zijn, nl. bij 5 minuten en bij 18,5 minuten. Voor de A_{N1} curve wordt 1 kantelpunt gevonden bij 15 minuten. De helling na het kantelpunt van bijvoorbeeld de A_{N1} curve bedraagt 3,5 log. μ Volt/log.min.

Op gelijke wijze als de CM amplitude en de A_{N1} werd ook de τ_{N1} uitgezet tegen de log. tijd voor de concentraties 4, 8, 16 en 32%. Representatieve curven hiervan zijn weergegeven in fig. 3.2. A t/m D. Vergelijking van de figuren 3.1. met de

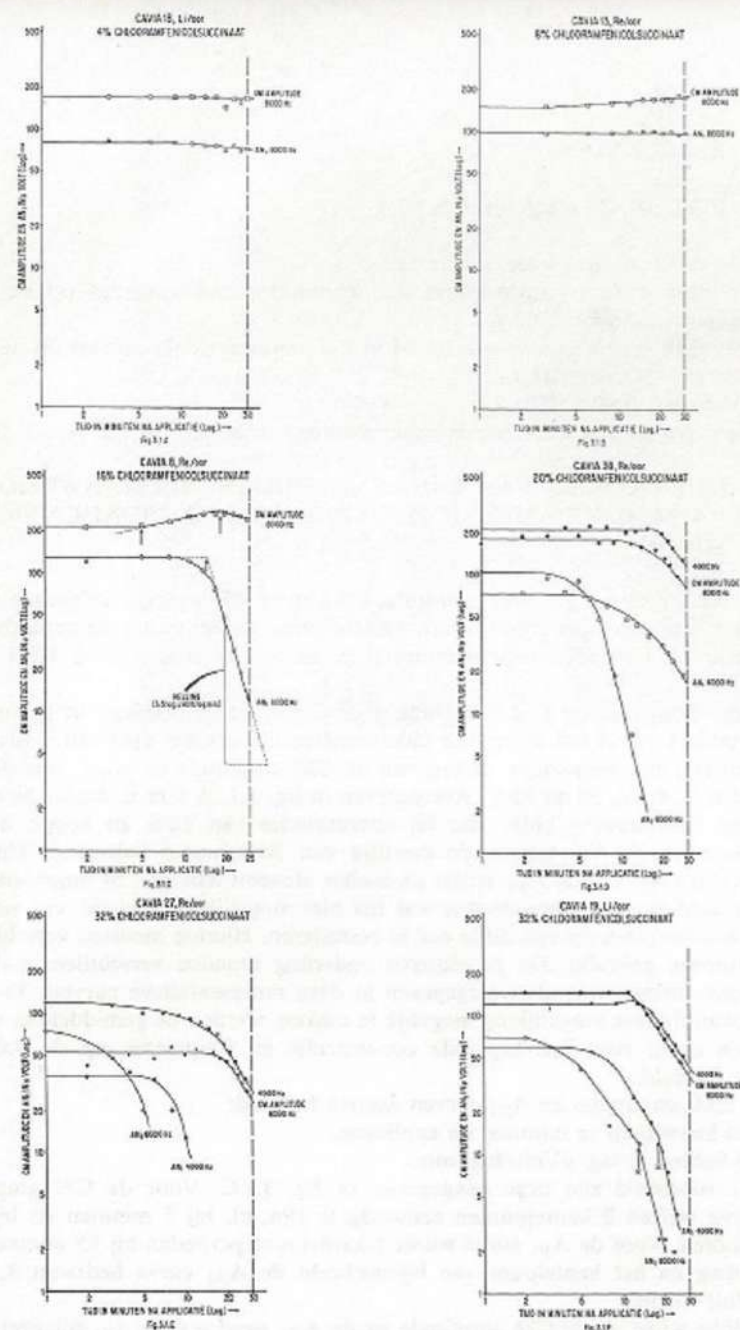


Fig. 3.1.A t/m F. Het gedrag van CM amplitude en A_{N1} tijdens de aanwezigheid van chlooramfenicolsuccinaat op de ronde venstermembraan. Representatieve curven voor 4, 8, 16, 20 en 32% oplossing. Uitgezet zijn de log. CM amplitude en log. A_{N1} tegen de log. tijd na chlooramfenicolsuccinaat applicatie. In fig. 3.1.C zijn de kantelpunten van de CM amplitude- en A_{N1} curven met pijlen aangegeven. De helling van de A_{N1} curve is uitgedrukt in log. μ Volt/log.min. In fig. 3.1.F zijn de kantelpunten (X) van het „getrapt” verloopende deel van de A_{N1} curven met pijlen aangegeven.

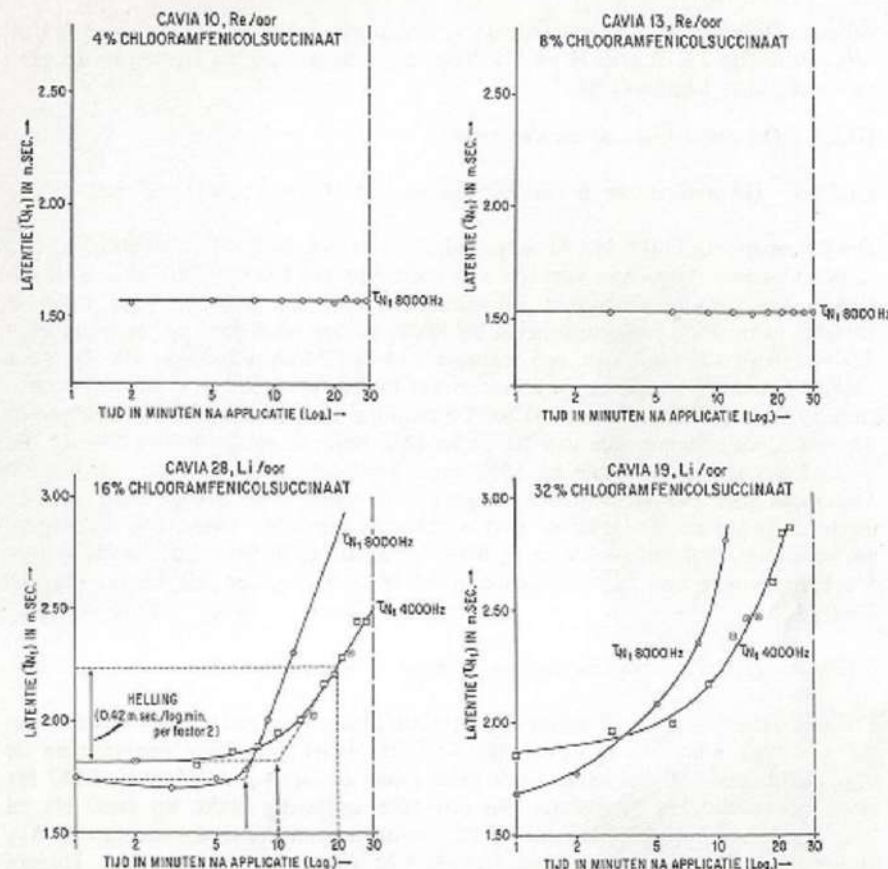


Fig. 3.2.A. t/m D. Het gedrag van de τ_{N1} tijdens de aanwezigheid van chlooramfenicolsuccinaat op de ronde venstermembraan. Representatieve curven voor 4, 8, 16 en 32% oplossing. Uitgezet is de τ_{N1} tegen de log. tijd na chlooramfenicolsuccinaat applicatie. In fig. 3.2.C zijn de kantelpunten van de τ_{N1} curven met pijlen aangegeven. De helling van de τ_{N1} curve bij 4000 Hz is uitgedrukt in msec./log. min. (per factor 2).

figuren 3.2. leert, dat de τ_{N1} toeneemt waar de A_{N1} afneemt. Om bovenvermelde redenen werden ook hier de gemiddelden van de gemeten oren berekend. Hiertoe werden berekend:

1. Het kantelpunt in minuten na applicatie.
2. De helling in msec./log.min. (per factor 2).

Als voorbeeld zijn deze aangegeven in fig. 3.2.C. Het kantelpunt en de helling na het kantelpunt, voor bijvoorbeeld 4000 Hz, worden respectievelijk gevonden bij 10 minuten en 0,42 msec./log.min. (per factor 2).

Voor iedere concentratie werd het gemiddelde kantelpunt en de gemiddelde helling van de CM amplitude-, de A_{N1} - en de τ_{N1} curven, bij 4 kHz en 8 kHz, be-

rekend. De zo gevonden gemiddelde waarden zijn weergegeven in tabel VI en uitgezet in fig. 3.3. A t/m H en 3.4. Voor onderlinge vergelijking werd uitgegaan van een gelijke beginwaarde.

III.2.1. De invloed van de concentratie

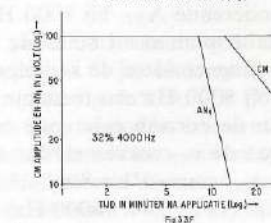
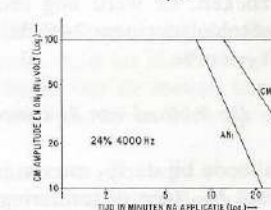
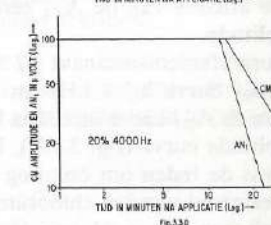
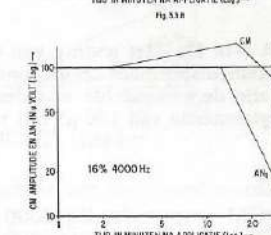
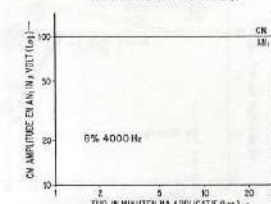
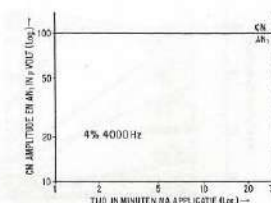
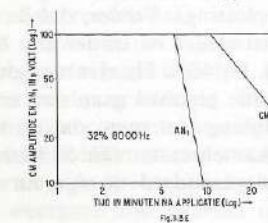
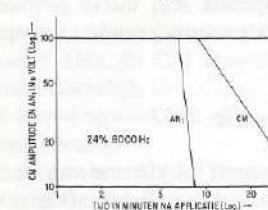
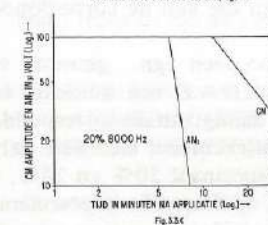
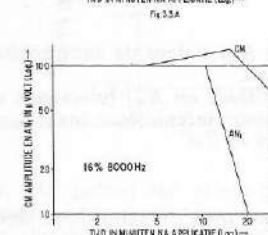
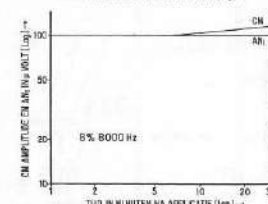
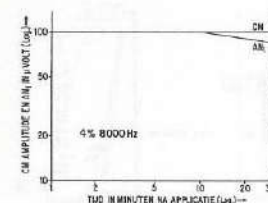
III.2.1.1. De invloed van de concentratie op de CM amplitude (fig. 3.3.G)

De 4% oplossing blijkt de CM amplitude, voor zowel 8000 Hz als 4000 Hz, niet te beïnvloeden. Applicatie van een 8% oplossing geeft voor 8000 Hz een lichte stijging van de CM amplitude. Bij 4000 Hz blijkt ook 8% nog geen effect te sorteren. Een 16% oplossing heeft bij 8000 Hz en 4000 Hz, na respectievelijk 4,5 minuten en 2,5 minuten, een toename van de CM amplitude tot gevolg. Voor beide frequenties wordt na 16 minuten een maximum bereikt, waarna de amplitude van de CM daalt en na 20 tot 24 minuten kleiner wordt dan de uitgangswaarde. Voor concentraties van 20, 24 en 32% blijkt de aanvankelijke stijging van de CM amplitude, zoals die bij 16% werd gevonden, niet meer voor te komen. De amplituden hiervan nemen na ongeveer 12 minuten af. De hellingen van de curven, die de afname van de CM amplitude beschrijft voor 16% en hogere concentraties, blijken zowel voor de 8000 Hz als de 4000 Hz vrijwel gelijk te zijn. De kantelpunten van deze curven zijn bij 8000 Hz echter wat eerder dan bij 4000 Hz.

III.2.1.2. De invloed van de concentratie op de A_{N1} (fig. 3.3.H)

De applicatie van een 4% oplossing blijkt na 10 minuten een geringe afname van de A_{N1} voor 8000 Hz te geven. Bij 4000 Hz blijft voor deze concentratie de A_{N1} gelijk. Een 8% oplossing heeft geen effect op de A_{N1} , noch voor 8000 Hz noch voor 4000 Hz. Applicatie van een 16% oplossing blijkt, bij 8000 Hz na 10,5 minuten en bij 4000 Hz pas na 12,5 minuten, een snelle afname van de A_{N1} te geven. Dit terwijl de corresponderende CM amplitude nog toeneemt. Hogere concentraties (20, 24 en 32%) doen bij 8000 Hz reeds na 6 à 7 minuten de A_{N1} snel verminderen. Opvallend is, dat zowel voor de 16% als voor de 20, 24 en 32%, de helling van de curven ongeveer gelijk is. Voor 4000 Hz is het verloop wat gecompliceerder. De 16% en 24% blijken een geringere helling te vertonen dan de 20% en 32%. Ook blijkt het moment waarop de A_{N1} gaat verminderen bij 16% en 20% eerst na 12 minuten, doch bij 24% en 32% reeds na 8 minuten te zijn bereikt. Het effect op de A_{N1} treedt wat later op en de helling is wat minder steil bij 4000 Hz dan bij 8000 Hz het geval is.

Vergelijking van het tijdstip waarop en de snelheid waarmee de CM amplitude en de A_{N1} veranderen leert, dat de A_{N1} duidelijk eerder en sneller afneemt dan de corresponderende CM amplitude bij 16% en hogere concentraties. Bij 8000 Hz begint, voor de concentraties 20, 24 en 32%, de A_{N1} reeds te verminderen na ongeveer 6 à 7 minuten. De corresponderende amplitude van de CM begint pas 2 tot 5 minuten later af te nemen. Ook voor de 16% blijkt de CM amplitude pas 5 minuten na de corresponderende A_{N1} in grootte te verminderen. De helling van de afname blijkt voor de A_{N1} 3 à 6 keer groter te zijn dan die voor de correspon-



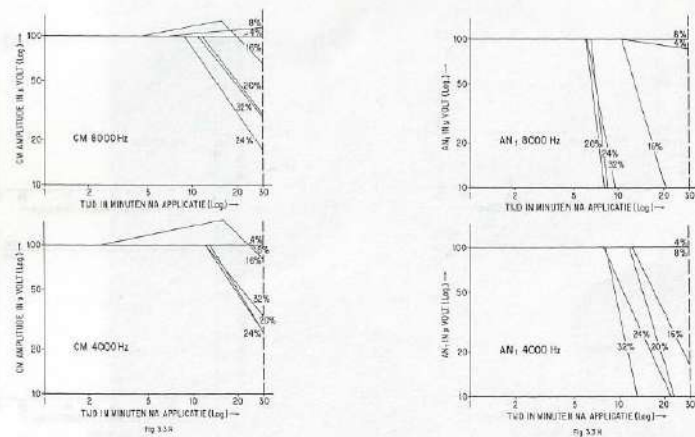


Fig. 3.3.A t/m H. Het gedrag van CM amplitude en A_{N1} tijdens de aanwezigheid van chlooramfenicolsuccinaat op de ronde venstermembraan. Uitgezet zijn de gemiddelde waarden van de CM amplitude en A_{N1} (uitgaande van dezelfde beginwaarde van 100 μ Volt) tegen de tijd na chlooramfenicolsuccinaat applicatie.

derende CM amplitude. Bij 4000 Hz is dit verband minder éénvoudig, doch ook hier is de afname van de A_{N1} eerder en sneller dan die van de corresponderende CM amplitude.

Bij chlooramfenicolsuccinaat 32% werd in één oor een zgn. „getrapt” verloop van de A_{N1} curve bij 4 kHz en 8 kHz gevonden. D.w.z. een duidelijk snellere daling van de A_{N1} curve direct na het begin van de daling van de corresponderende CM amplitude curve (fig. 3.1.F). Het opsporen van eventueel meerdere dergelijke curven was de reden om ook nog chlooramfenicolsuccinaat 20% en 24%, tijdens de aanwezigheid van het chlooramfenicolsuccinaat op de ronde venstermembraan, te onderzoeken. Er werd nog één „getrapt” verlopende A_{N1} curve gevonden bij chlooramfenicolsuccinaat 24% bij 4 kHz met een corresponderende „getrapt” verlopende τ_{N1} curve.

III.2.1.3. De invloed van de concentratie op de τ_{N1} (fig. 3.4.)

Het opvallende bij de τ_{N1} curven is, dat de τ_{N1} toeneemt bij afname van de corresponderende A_{N1} (een uitzondering is de constante τ_{N1} , bij de lichte afname van de corresponderende A_{N1} , bij 8000 Hz voor de 4% oplossing). Verder, dat de hellingen en kantelpunten bij 8000 Hz respectievelijk wat steiler en eerder zijn dan bij 4000 Hz (uitgezonderd de kantelpunten voor 20%). Bij 4000 Hz ziet men duidelijker dan bij 8000 Hz een toename van de concentratie gepaard gaan met een toename van de corresponderende helling. Bij vergelijking ziet men, dat de kantelpunten van de τ_{N1} curven eerder optreden dan de kantelpunten van de corresponderende A_{N1} curven bij 8000 Hz en 4000 Hz (uitgezonderd de τ_{N1} curven bij 20%/8000 Hz en 24%/4000 Hz).

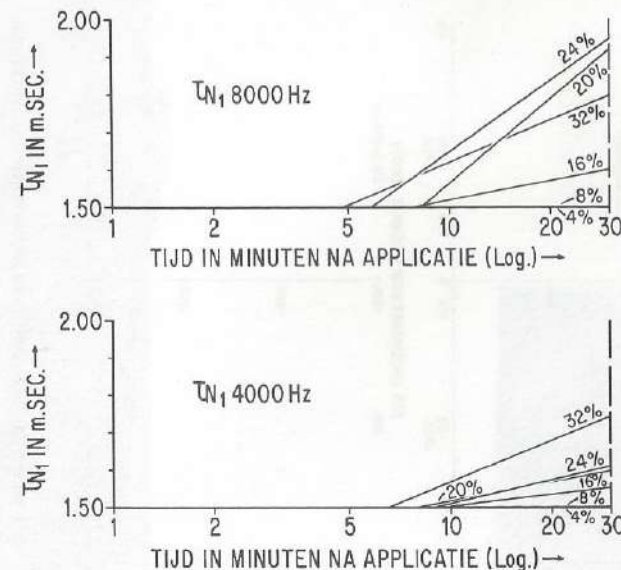


Fig. 3.4. Het gedrag van de τ_{N1} tijdens de aanwezigheid van chlooramfenicolsuccinaat op de ronde venstermembraan. Uitgezet zijn de gemiddelde waarden van de τ_{N1} (uitgaande van dezelfde beginwaarde van 1,5 msec.) tegen de tijd na chlooramfenicolsuccinaat applicatie.

III.3. VERGELIJKING VAN HET GEDRAG VAN CM EN AP VOOR EN NA AANWEZIGHEID VAN CHLOORAMFENICOLSUCCINAAT OP DE RONDE VENSTERMEMBRAAN

III.3.1. De amplitude van CM en AP

Voor de stimulusintensiteiten 50, 60 en 70 dB SPL werden, bij de frequenties 1, 2, 4 en 8 kHz, de CM amplitude en A_{N1} bepaald, voor en $\frac{1}{4}$, $\frac{2}{4}$ en $\frac{5}{4}$ uren (d.w.z. respectievelijk $1\frac{1}{2}$, $3\frac{1}{2}$ en $6\frac{1}{2}$ uren na het begin van de meting aan het test oor) na aanwezigheid van chlooramfenicolsuccinaat 4, 8, 16 en 32% op de ronde venstermembraan.

Per concentratie werden 5 oren (proefdieren) gemeten. Er was voor de cavia populatie géén correlatie aanwezig tussen de amplituden van AP en CM en het gewicht der proefdieren.

De CM amplitude en A_{N1} werden uitgedrukt in procenten van de vóór de applicatie bepaalde beginwaarden. De op deze wijze bij 5 proefdieren verkregen waarden werden gemiddeld. Als voorbeelden zijn in de fig. 3.5. A t/m D, voor de vier gebruikte concentraties, de CM amplitude en A_{N1} voor één frequentie uitgezet. Duidelijk blijkt hieruit, dat voor de drie stimulusintensiteiten onderling slechts geringe en géén systematische verschillen worden gemeten. Voor een overzichtelijke weergave zijn daarom in het vervolg ook hiervan weer de gemiddelden

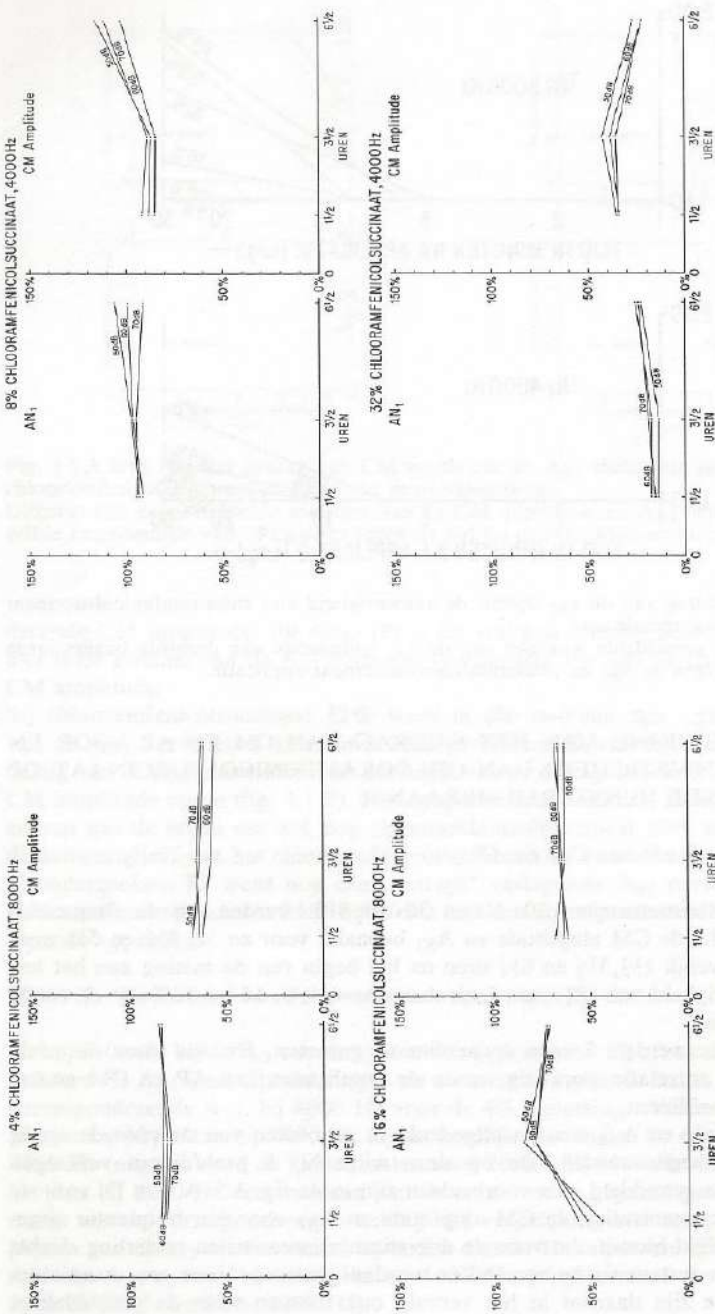


Fig. 3.5.A t/m D. Vergelijking van het gedrag van CM amplitude en A_{N1} voor en na aanwezigheid van chlooramfenicolsuccinaat op de ronde venstermembranen. De CM amplitude en A_{N1} zijn uitgedrukt in procenten van de vóór de applicatie bepaalde beginwaarden. Per concentratie werden 5 oren gemeten en de zo verkregen waarden werden gemiddeld. Voor de vier gebruikte concentraties zijn de CM amplitude en A_{N1} als voorbeeld voor één frequentie, uitgezet als functie van de tijd. Hieruit blijkt, dat voor de drie stimulensintensiteiten onderling slechts geringe verschillen gemeten worden.

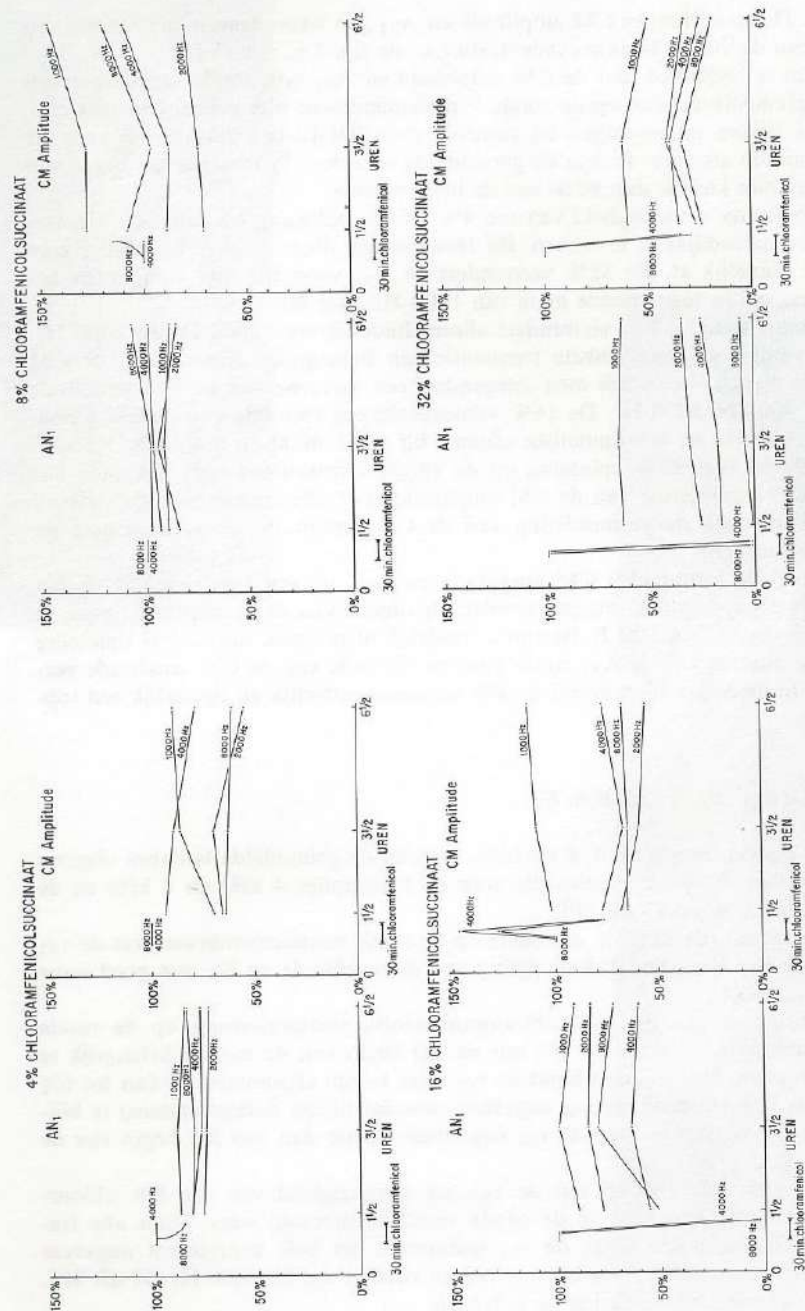


Fig. 3.6.A t/m D. Vergelijking van het gedrag van CM amplitude en A_{N1} voor en na applicatie van chlooramfenicolsuccinaat op de ronde venstermembranen. De gemiddelde CM amplitude en A_{N1} verkregen voor 5 oren, ieder bij 50, 60 en 70 dB SPL, zijn weergegeven als functie van de tijd voor de vier gebruikte concentraties en uitgedrukt in procenten van de voor de applicatie bepaalde beginwaarden.

gebruikt. De zo verkregen CM amplitude en A_{N1} zijn weergegeven, als functie van de tijd voor de vier gebruikte concentraties, in de fig. 3.6. A t/m D.

Men dient te bedenken, dat de CM amplitude en A_{N1} ook zonder applicatie van chlooramfenicolsuccinaat op de ronde venstermembraan niet geheel constant zijn. Zoals zal blijken uit metingen bij controle oren (III.4.) is echter zowel voor de CM amplitude als voor de A_{N1} de gemiddelde waarde, $7\frac{1}{2}$ uren na het begin van de meting, niet kleiner dan 80% van de beginwaarde.

De A_{N1} blijkt na aanwezigheid van een 4% en 8% oplossing op de ronde venstermembraan nauwelijks af te nemen. Bij 16% nemen alleen de A_{N1} bij 4000 Hz en 8000 Hz duidelijk af. Bij 32% vermindert de A_{N1} voor alle vier frequenties belangrijk en wel in toenemende mate van 1000 Hz naar 8000 Hz.

De CM amplitude bij 4% vermindert alleen duidelijk voor 2000 Hz en 8000 Hz. Bij 8% vindt voor geen enkele frequentie een belangrijke afname van de CM amplitude plaats. Hier vindt men integendeel een toename van de CM amplitude bij 1000, 4000 en 8000 Hz. De 16% veroorzaakt een toename van de CM amplitude bij 1000 Hz en een duidelijke afname bij 2000, 4000 en 8000 Hz. Na aanwezigheid van een 32% oplossing op de ronde venstermembraan ziet men een belangrijke vermindering van de CM amplitude voor alle frequenties. Evenals bij de A_{N1} wordt ook de vermindering van de CM amplitude groter naarmate de frequentie toeneemt.

Ook kunnen de gemiddelde CM amplitude en A_{N1} , op een bepaalde tijd na het begin van het experiment, uitgezet worden als functie van de concentratie, zoals te zien is in de fig. 3.7. A t/m F. Hieruit is duidelijk af te lezen, dat de 8% oplossing de kleinste afname van de A_{N1} en de grootste toename van de CM amplitude veroorzaakt. In beide gevallen neemt de 8% oplossing letterlijk en figuurlijk een toppositie in.

III.3.2. De τ_{N1} (fig. 3.8.A, B en C)

Voor drie concentraties, nl. 4, 8 en 16%, werden de gemiddelde latenties uitgezet als functie van de tijd. Dit gebeurde voor de frequenties 4 kHz en 8 kHz en de intensiteiten 50, 60 en 70 dB SPL.

Na aanwezigheid van de 32% oplossing op de ronde venstermembraan was de τ_{N1} vaak niet te bepalen, omdat door daling van de amplitude de N_1 niet goed meer te herkennen was.

Na aanwezigheid van de 16% chlooramfenicolsuccinaatoplossing op de ronde venstermembraan blijkt de τ_{N1} $1\frac{1}{2}$ uur na het begin van de meting belangrijk te zijn toegenomen. Na $3\frac{1}{2}$ uren blijkt de τ_{N1} weer te zijn afgenomen en dan tot $6\frac{1}{2}$ uren na het begin van de meting ongeveer constant (lichte dalingstendens) te blijven. Toch is ook na $6\frac{1}{2}$ uren de τ_{N1} nog steeds groter dan aan het begin van de meting.

Fig. 3.8.B geeft het verloop van de τ_{N1} , na aanwezigheid van een 8% chlooramfenicolsuccinaatoplossing op de ronde venstermembraan, weer. Voor alle frequenties en intensiteiten blijkt de τ_{N1} gedurende het hele experiment ongeveer gelijk (lichte dalingstendens) te blijven. Alleen voor de τ_{N1} bij 4000 Hz/50 dB SPL lijkt er een geringe vermindering op te treden.

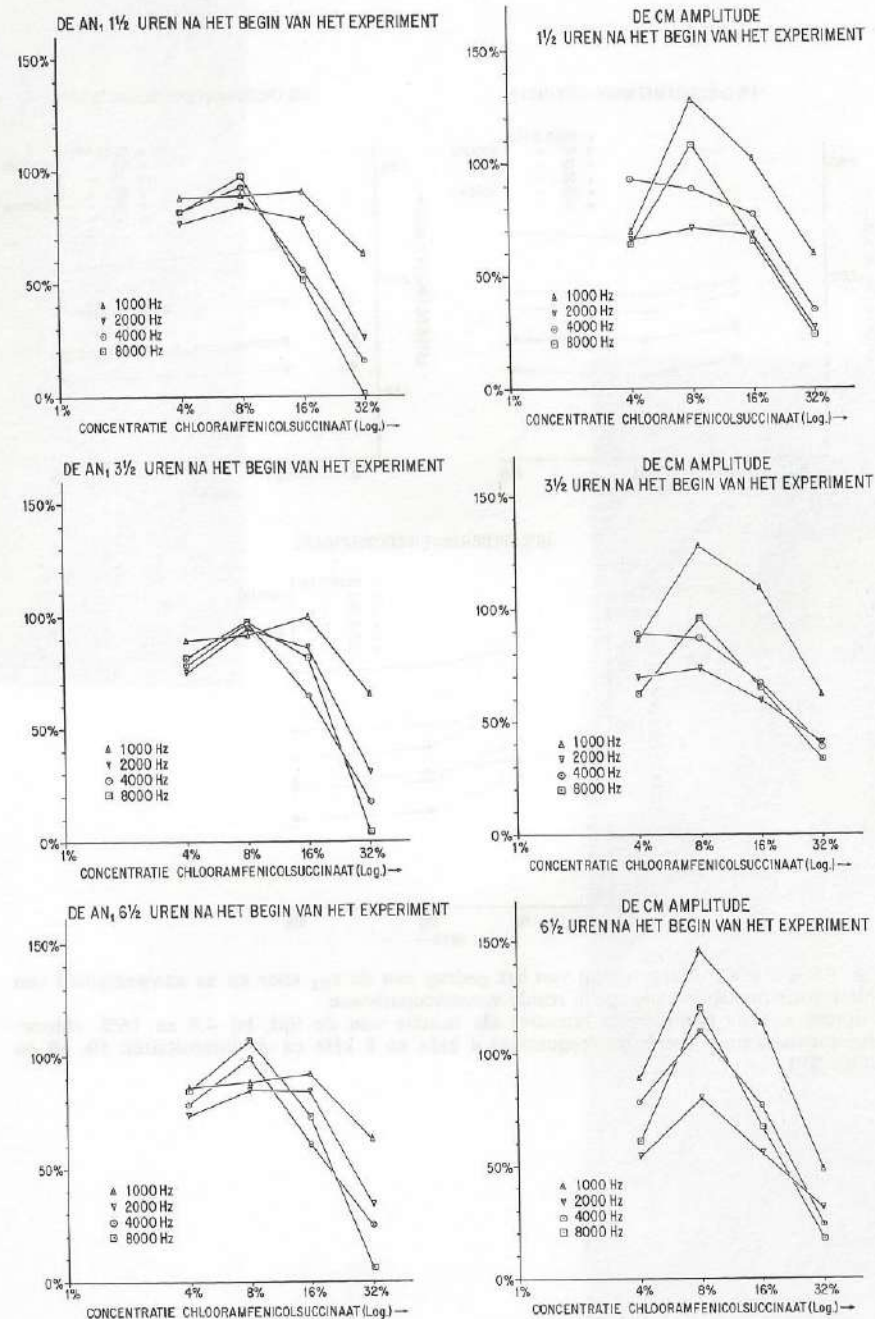


Fig. 3.7.A t/m F. Vergelijking van het gedrag van CM amplitude en A_{N1} voor en na aanwezigheid van chlooramfenicolsuccinaat op de ronde venstermembraan. De gemiddelde CM amplitude en A_{N1} verkregen voor 5 uren, ieder bij 50, 60 en 70 dB SPL, zijn weergegeven als functie van de concentratie op een bepaalde tijd en uitgedrukt in procenten van de voor de applicatie bepaalde beginwaarden.

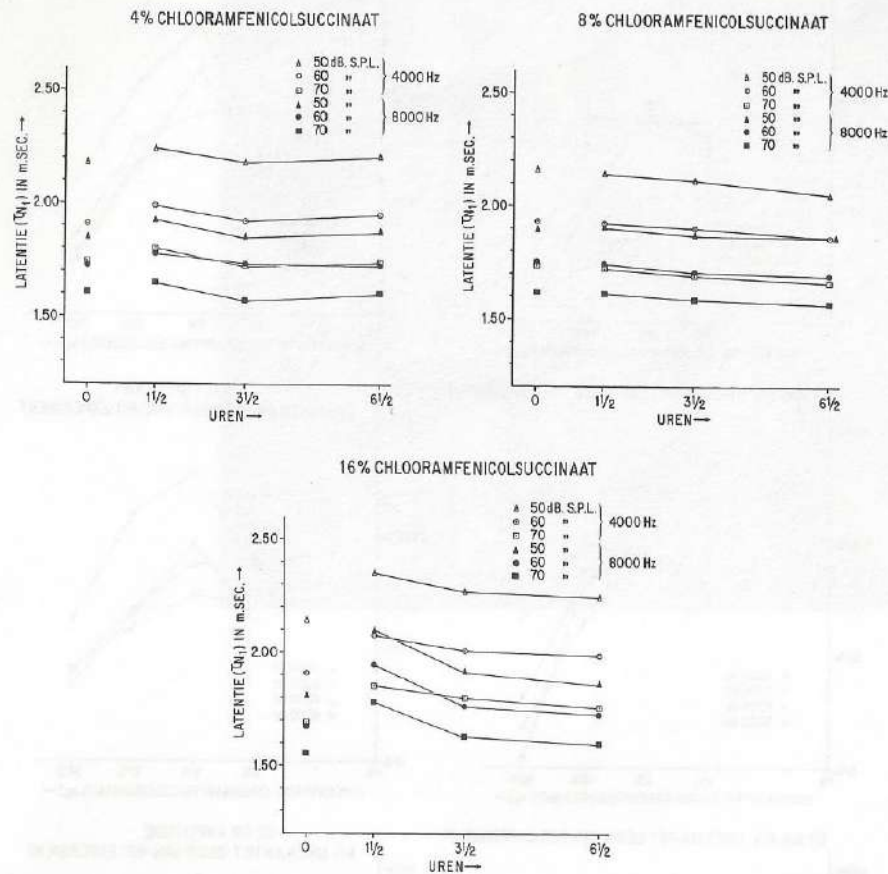


Fig. 3.8.A t/m C. Vergelijking van het gedrag van de τ_{N1} voor en na aanwezigheid van chlooramfenicolsuccinaat op de ronde venstermembraan. Uitgezet zijn de gemiddelde latenties als functie van de tijd, bij 4,8 en 16% chlooramfenicolsuccinaat, voor de frequenties 4 kHz en 8 kHz en de intensiteiten 50, 60 en 70 dB SPL.

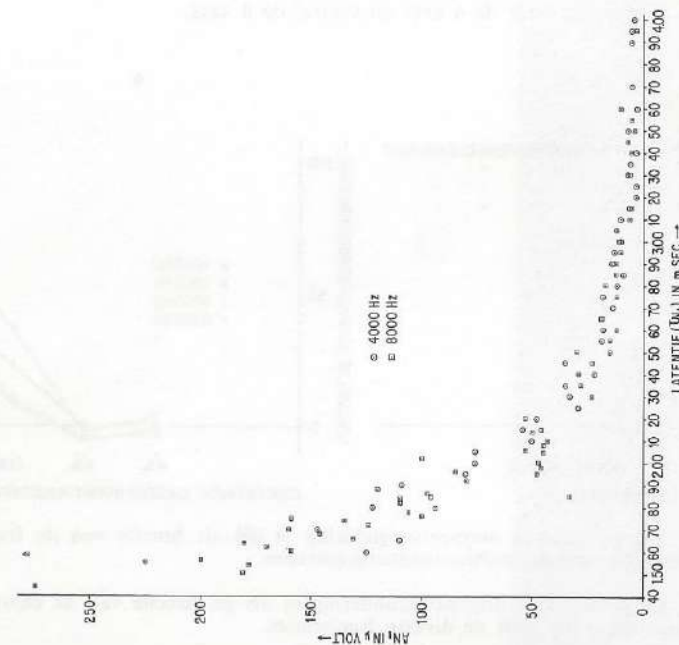


Fig. 3.9.A. Als „scattergram” uitgezette amplitude-latentie karakteristiek van de metingen verricht voor de applicatie van chlooramfenicolsuccinaat bij 50, 60 en 70 dB SPL en de bij de drempelmetingen gebruikte intensiteiten.

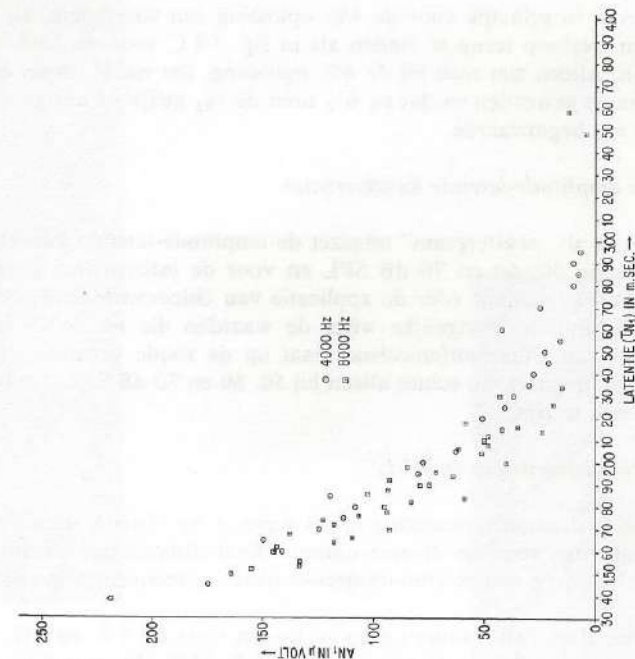


Fig. 3.9.B. Als „scattergram” uitgezette amplitude-latentie karakteristiek van de metingen verricht na de half uur durende aanwezigheid van chlooramfenicolsuccinaat op de ronde venstermembraan bij 50, 60 en 70 dB SPL.

In fig. 3.8.A is in principe voor de 4% oplossing een soortgelijk, zij het minder uitgesproken, verloop terug te vinden als in fig. 3.8.C voor de 16% oplossing is weergegeven. Alleen ziet men bij de 4% oplossing, dat na $3\frac{1}{2}$ uren de τ_{N1} gelijk of iets kleiner is geworden en dat na $6\frac{1}{2}$ uren de τ_{N1} gelijk of iets groter is geworden dan de τ_{N1} beginwaarde.

III.3.3. De amplitude-latentie karakteristiek

In fig. 3.9.A is als „scattergram” uitgezet de amplitude-latentie karakteristiek van de metingen, bij 50, 60 en 70 dB SPL en voor de intensiteiten gebruikt bij de drempelmetingen, verricht vóór de applicatie van chlooramfenicolsuccinaat.

In fig. 3.9.B zijn op soortgelijke wijze de waarden die na de $\frac{1}{2}$ uur durende aanwezigheid van chlooramfenicolsuccinaat op de ronde venstermembraan werden verkregen, uitgezet, nu echter alleen bij 50, 60 en 70 dB SPL. De beide curven blijken identiek te zijn.

III.3.4. Drempelmetingen (tabel I)

De gemiddelde drempelverandering in dB werd in fig. 3.10.A uitgezet als functie van de frequentie voor de diverse chlooramfenicolsuccinaatconcentraties en in fig. 3.10.B als functie van de chlooramfenicolsuccinaatconcentratie voor de diverse frequenties.

Er blijkt géén drempelverandering op te treden voor de 4% en 8%, echter wel een drempelverhoging voor de 16% en vooral de 32% chlooramfenicolsuccinaatoplossingen, met name voor de 4 kHz en vooral de 8 kHz.

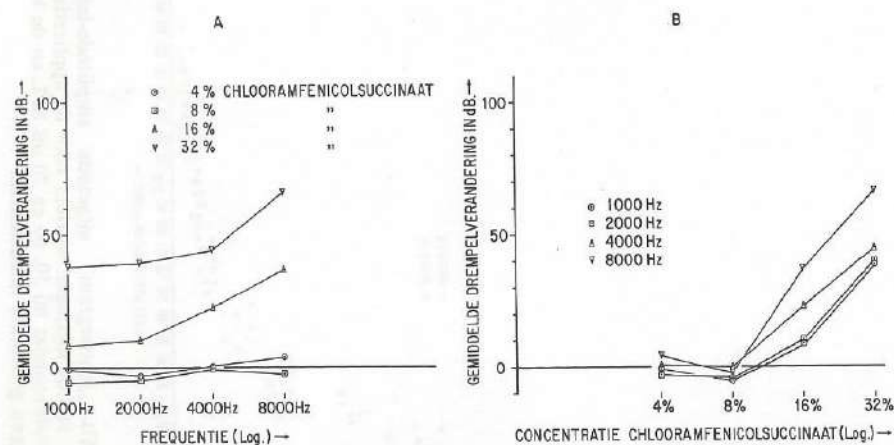


Fig. 3.10.A. De gemiddelde drempelverandering in dB als functie van de frequentie voor de diverse chlooramfenicolsuccinaatconcentraties.

Fig. 3.10.B. De gemiddelde drempelverandering in dB als functie van de chlooramfenicolsuccinaatconcentratie voor de diverse frequenties.

Tabel I. De gemiddelde drempelverandering in dB.

	1000 Hz	2000 Hz	4000 Hz	8000 Hz	Aantal oren
4%	— 1,0	— 3,25	+ 0,25	+ 4,0	3
8%	— 5,5	— 4,75	— 0,5	— 2,75	3
16%	+ 8,5	+ 10,0	+ 22,5	+ 36,5	5
32%	+ 38,0	+ 39,5	+ 44,5	+ 66,0	3

III.3.5. Adaptatiemetingen

Zoals in II.3.1.2. No. 3. werd uiteengezet, kan de adaptatie worden uitgedrukt in de helling en het 50% punt van de A_{N1} -ISI relatie. Tabel II geeft voor drie frequenties de gevonden gemiddelde waarden van de helling en van het 50% punt vóór de applicatie van chlooramfenicolsuccinaat. In tabel III zijn deze waarden eveneens weergegeven, doch nu na aanwezigheid van respectievelijk 4, 8, 16 en 32% chlooramfenicolsuccinaat op de ronde venstermembraan.

Er blijkt géén verandering op te treden van het 50% punt en van de helling door toediening van 4,8 en 16% chlooramfenicolsuccinaat. De 32% chlooramfenicolsuccinaatoplossing geeft voor 4,6 en 8 kHz een significante verschuiving van het 50% punt naar een kleinere ISI waarde en een significant kleinere helling voor 8 kHz. Dit kon echter slechts bij één oor gemeten worden. Voor 32% chlooramfenicolsuccinaat was de adaptatiemeting na de applicatie niet vaker mogelijk door de grote daling van de A_{N1} (vaste stimulusintensiteit van 50 dB SPL).

Tabel II. Adaptatie.

De gemiddelde waarden van de helling en van het 50% punt vóór de applicatie van chlooramfenicolsuccinaat op de ronde venstermembraan.

	Grootste variatie in 50% punt	Gemiddelde 50% punt	Grootste variatie in helling	Gemiddelde helling	Aantal oren
4000 Hz	4,26- 9,45	6,74	12-18	14,8	14
6000 Hz	4,56-10,15	7,34	12-15	13,7	14
8000 Hz	5,06- 9,45	7,61	12-16	14,2	14

Tabel III. Adaptatie.

De gemiddelde waarden van de helling en van het 50% punt na de half uur durende aanwezigheid van chlooramfenicolsuccinaat op de ronde venstermembraan.

	Fre- quentie in kHz.	Gemid- delde 50% punt	Vershil met ge- middelde 50% punt van tabel II	Gemid- delde helling	Vershil met ge- middelde helling van tabel II	Aantal oren
4%	4	6,84	+ 0,10	14,6	— 0,2	5
	6	6,99	— 0,35	14,2	+ 0,5	5
	8	7,53	— 0,08	14,6	+ 0,4	5
8%	4	7,22	+ 0,48	15,0	+ 0,2	4
	6	7,10	— 0,24	15,0	+ 1,3	4
	8	6,96	— 0,65	14,3	+ 0,1	4
16%	4	5,96	— 0,78	13,7	— 1,1	4
	6	6,86	— 0,48	14,5	+ 0,8	4
	8	6,46	— 1,15	14,0	— 0,2	4
32%	4	4,72	— 2,02	14,0	— 0,8	1
	6	2,38	— 4,96	12,0	— 1,7	1
	8	1,15	— 6,46	11,0	— 3,2	1

III.4. CONTROLE OREN (fig. 3.11.)

Voor 10 controle oren, waarbij dus niets op de ronde venstermembraan werd geapliceerd, werden de CM amplitude, de A_{N1} en de τ_{N1} bepaald aan het begin van het experiment en 7½ uren later (II.3.1.3.). De latentie bleek niet te zijn veranderd. De gemiddelde CM amplitude en A_{N1} waren na 7½ uren niet kleiner dan 80% van de beginwaarde.

Bij 2 extra oren werd, i.p.v. chlooramfenicolsuccinaat, 0,025 cc van een 7,4% diNasuccinaatoplossing in aqua dest. op de ronde venstermembraan gebracht. Deze concentratie werd gekozen, daar ze isotoon was met een 32% chlooramfenicolsuccinaatoplossing in aqua dest. Gedurende de 45 minuten durende aanwezigheid van deze oplossing op de ronde venstermembraan werden om de 3 minuten de CM amplitude, de A_{N1} en de τ_{N1} voor 4 kHz en 8 kHz en bij 70 dB SPL bepaald. Voor géén van deze parameters trad een verandering op. Dit dus in tegenstelling tot de verandering van deze parameters tijdens de 30 minuten durende aanwezigheid van 32% chlooramfenicolsuccinaat op de ronde venstermembraan. Nog opgemerkt dient te worden, dat sterk hypertoonische Nasuccinaatoplossingen, geapliceerd op de ronde venstermembraan van cavia's, géén morfologische cochleaveranderingen veroorzaken (I.3.2.; Proud, Mittelman en Seiden, 1968).

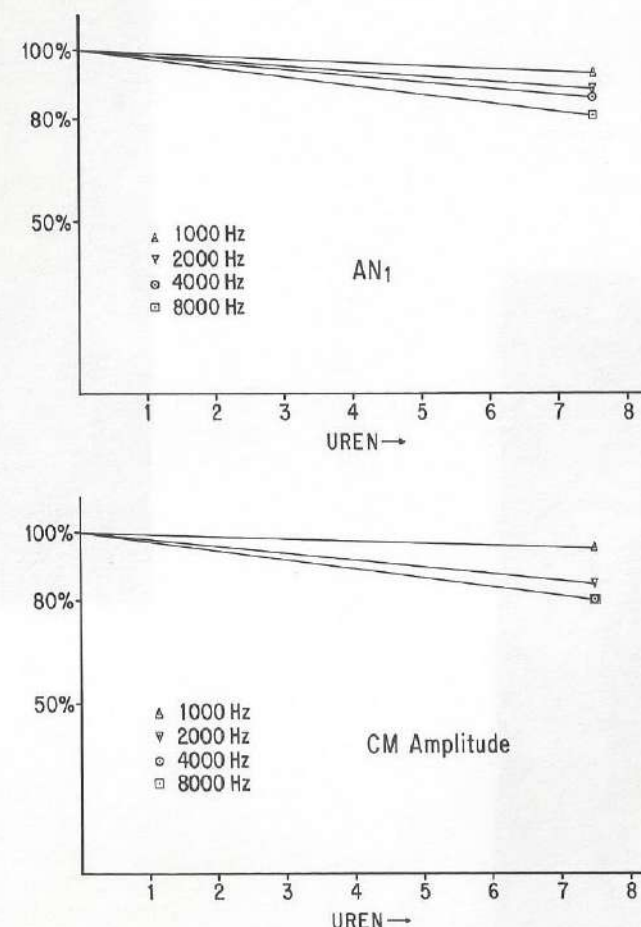


Fig. 3.11. De gemiddelde CM amplitude en A_{N1} verkregen voor 10 controle oren, ieder bij 50, 60 en 70 dB SPL, zijn weergegeven als functie van de tijd en uitgedrukt in procenten van de voor de applicatie bepaalde beginwaarden.

III.5. METINGEN TIJDENS AANVULLENDE EXPERIMENTEN

Voor de beantwoording van de vraag of de porte d'entrée van het chlooramfenicolsuccinaat de middenoormucosa, het ovale venster en/of de ronde venstermembraan is, werd bij 2 oren 32% chlooramfenicolsuccinaat naast de ronde venstermembraan geapliceerd en wel zodanig dat geen contact ontstond met de ronde venstermembraan (II.3.1.2. No. 2.). Gedurende de 60 minuten durende aanwezigheid van 0,1 cc 32% chlooramfenicolsuccinaat veranderden de CM amplitude, de A_{N1} en de τ_{N1} niet.

Hoofdstuk IV

BESPREKING VAN DE MEETRESULTATEN EN BEANTWOORDING VAN DE VRAAGSTELLING

IV.1. BEREIKT HET CHLOORAMFENICOLSUCCINAAT IN AQUA DEST. DE COCHLEA VANUIT HET MIDDENOOR VIA DE MIDDENOORMUCOSA, VIA HET OVALE VENSTER EN/OF VIA HET RONDE VENSTER?

Alhoewel de hoeveelheid chlooramfenicolsuccinaat in aqua dest. op de ronde venstermembraan zeer klein was (0,025 cc), liep toch een deel uit de ronde venster nis langs de basale winding naar beneden en kwam zodoende in contact met de middenoormucosa. Het is denkbaar, dat hier chlooramfenicolsuccinaat zou worden geresorbeerd. Daarom werd 0,1 cc van een 32% oplossing, die na applicatie op de ronde venstermembraan duidelijk toxisch is, gedurende 1 uur alleen in contact gebracht met de middenoormucosa en het ovale venster. De CM- en AP parameters veranderden in het geheel niet tijdens dit uur, zodat geconcludeerd kan worden, dat de porte d'entrée alleen gevormd wordt door de ronde venstermembraan. Dit verklaart mogelijk ook, dat na locale applicatie op de ronde venstermembraan alleen de basale winding wordt getroffen, zoals blijkt uit de histologische studies van *Proud, Mittelman* en *Seiden* (1968; I.3.2.).

IV.2. IS ER IETS TE ZEGGEN OVER DE SUCCESSIEVE AANGRIJPINGS-PUNTEN IN DE COCHLEA?

IV.2.1. Inleiding

Uit de figuren 3.10.A en B blijkt, dat chlooramfenicolsuccinaat in aqua dest. en wel met name de 16% en 32% oplossingen, een drempelverhoging van de AP veroorzaken. Dit komt overeen met:

- A. De twee identieke amplitude-latentie curven voor en na aanwezigheid van chlooramfenicolsuccinaat op de ronde venstermembraan (III.3.3. en fig. 3.9. A en B).

Immers, vóór de applicatie worden de hogere latenties geleverd door lage dB waarden (drempelintensiteiten), maar na de applicatie worden die hogere latenties geleverd bij 50, 60 en 70 dB SPL (drempelverhoging).

- B. De verandering van de adaptatiecurve na de aanwezigheid van 32% chlooramfenicolsuccinaat op de ronde venstermembraan t.o.v. de adaptatiecurve voor de applicatie van 32% chlooramfenicolsuccinaat (III.3.5.). Men krijgt na de applicatie een significante verschuiving van het 50% punt naar links en een significant minder grote helling, wat overeenkomt met een effectief geringere stimulering (drempelverhoging). Bij lagere intensiteiten krijgt men bij normale cochlea's namelijk progressief een verschuiving van het 50% punt naar links en een minder grote helling (*Eggermont*, 1972).

De metingen die de meeste inlichtingen gaven, bleken de drempelmetingen en vooral de metingen tijdens de aanwezigheid van chlooramfenicolsuccinaat op de

ronde venstermembraan te zijn. De adaptatie- en latentiemetingen (voor en na aanwezigheid van chlooramfenicolsuccinaat op de ronde venstermembraan) zijn daarbij vergeleken een stuk minder gevoelig.

IV.2.2. Beantwoording van de vraagstelling

Chlooramfenicolsuccinaat komt alleen in de perilymphe van de scala tympani door diffusie door de ronde venstermembraan (IV.1.). De hoeveelheid is afhankelijk van de concentratie (IV.4. en fig. 3.1. A t/m E). In de perilymphe van de scala tympani komt het chlooramfenicol alleen in de basale winding (I.4.), met een afnemende concentratie naar apicaal toe. Immers de 8000 Hz wordt eerder en zwaarder getroffen dan de 4000 Hz voor zowel de AP als de CM (III.2.1. en III.3.1.). Het chlooramfenicol dringt door de basilair membraan (I.4.), hiervoor pleit ook de primaire afname van de AP en de secundaire verandering van de CM (III.2.). Primair wordt de AP getroffen, hetgeen betekent dat het chlooramfenicol primair de haarcel-dendriet synaps of de zenuw moet treffen. De haarcellen (CM) worden daarna pas getroffen. Volgens *Proud, Mittelman en Seiden* (1968) zonder onderscheid tussen buitenste en binnenste haarcellen, volgens *Koide, Hata en Hando* (1966) worden primair de buitenste haarcellen getroffen. Het registreren van enkele „getrapt” verlopende A_{N1} curven bij metingen tijdens de aanwezigheid van chlooramfenicolsuccinaat op de ronde venstermembraan (III.2.1.2.), d.w.z. een duidelijk snellere daling van de A_{N1} curve, direct na het begin der daling van de corresponderende CM amplitude curve, demonstreert mogelijk de rol, die de CM vervult in de excitatie van de gehoorzenuw (*Davis*, 1965; inleiding).

IV.3. WELKE IS DE MAXIMALE CONCENTRATIE VAN CHLOORAMFENICOLSUCCINAAT IN AQUA DEST., DIE VEILIG TOEGEDIEND KAN WORDEN IN HET MIDDEN OOR VAN DE CAVIA EN KAN MEN DAARUIT DE MAXIMAAL TOELAATBARE CONCENTRATIE BIJ KLINISCH GEBRUIK EXTRAPOLEREN?

IV.3.1. Inleiding

Arslan (1969) plaatste NaCl kristallen, die sterk hypertoonisch t.o.v. perilymphe zijn, op de ronde venstermembraan van katten en zag, dat perilymphevocht door de membraan naar buiten kwam. Na circa 15 seconden werd het eerste vocht zichtbaar en na 3 minuten liep het vocht over de rand van de ronde venster. Het kristal loste, afhankelijk van de grootte, na kortere of langere tijd op. Wanneer het kristal was opgelost, stopte de uitvloed van perilymphevocht. Gelijktijdig werden CM metingen verricht van de rand van de ronde venster bij 250, 1000, 2000, 4000 en 8000 Hz. Er werden géén AP metingen verricht. Alle frequenties, speciaal de hogere frequenties, toonden achtereenvolgens een stijging (in de eerste 1 à 2 minuten), een daling, een stijging, een daling en weer een stijging van de CM tot de uitgangswaarde. De laatste CM stijging trad na 30 minuten tot 5 uren op, afhankelijk van de grootte van het kristal. Proefmonsters perilymphe en endolymphe, 3 minuten na applicatie van NaCl genomen, toonden o.a. een stijging

van Na in de endolymphe en vooral de perilymphe aan. De stijging van Na in de perilymphe zou ontstaan door passage van Na door de ronde venstermembraan naar de perilymphe en onttrekken van vocht aan de perilymphe. De kleinere stijging van Na in de endolymphe zou daarna op soortgelijke wijze ontstaan, doch nu door passage via de membraan van Reissner.

Sohmer en Feinmesser (1967) appliceerden 0,03 ml van verscheidene „niet toxische” oplossingen met verschillende toniciteiten op de ronde venstermembraan van katten, waarbij gelijktijdig CM- en AP metingen van de rand van de ronde venster werden verricht.

Hypotone oplossingen (sucrose in Ringeroplossing met aqua dest.) toonden een lichte stijging van de AP en een niet veranderende CM.

Isotone oplossingen (100 mg/ml sucrose in aqua dest., Ringeroplossing en 23 mg/ml choline chloride in aqua dest.) veroorzaakten in het algemeen een licht stijgende of een niet veranderende AP en een niet veranderende CM.

Hypertone oplossingen (sucrose in Ringeroplossing, sucrose in aqua dest. en choline chloride in aqua dest.) toonden pas een daling van de AP, meestal gevolgd door partieel herstel, bij een toniciteit van 2 of groter dan 2. De CM veranderde niet, zelfs niet na toediening van een verzadigde oplossing van sucrose in Ringeroplossing met een toniciteit van 20. Een zeer sterk hypertoonische oplossing van NaCl in aqua dest. met een toniciteit van 20 gaf daarentegen een snelle daling van de AP en ook van de CM.

Samenvattend: Na applicatie van hypertoonische oplossingen wordt vocht aan de perilymphe onttrokken en na applicatie van hypotonische oplossingen wordt vocht aan de perilymphe toegevoegd. Hypotone oplossingen geven een lichte stijging van de AP en hypertone oplossingen geven bij een toniciteit van ≥ 2 een daling van de AP. De CM verandert niet o.i.v. de toniciteit.

IV.3.2. Beantwoording van de vraagstelling

De 4% chlooramfenicolsuccinaatoplossing in aqua dest. blijkt wat meer effect te hebben dan de 8% oplossing, die vrijwel geen enkel effect veroorzaakt, getuige de metingen tijdens de aanwezigheid van chlooramfenicolsuccinaat op de ronde venstermembraan en de vergelijkende metingen voor en na applicatie o.a. de drempel-metingen. De 4% oplossing (IV.3.1.) veroorzaakt door zijn hypotoniteit een waterverplaatsing naar de perilymphe.

De 8% in aqua dest. (IV.3.1.) onttrekt, door zijn geringe hypertoniciteit, juist water aan de perilymphe. Deze waterverplaatsing, naar buiten (cavum tympani) door de ronde venstermembraan, zal een concentratievermindering van chlooramfenicolsuccinaat op de ronde venstermembraan veroorzaken, zodat bij deze concentratie vrijwel niets „gebeurt”.

De 16% in aqua dest. met een toniciteit van 2,3 (tabel IV) geeft een duidelijke vermindering van de AP, wat dus overeenkomt met de bevindingen van *Arslan* (1969) en *Sohmer en Feinmesser* (1967) wat de toniciteit van deze oplossing betreft. De toniciteit van de gebruikte hogere concentraties alleen kan, omdat ook de CM afneemt, niet de veroorzaakte schadelijke effecten verklaren. Dit moet dus door het chlooramfenicolsuccinaat als zodanig worden veroorzaakt. Bij een bepaalde concentratie chlooramfenicolsuccinaat is het schadelijk effect maximaal.

Tabel IV. Osmotische waarde van de verschillende chlooramfenicolsuccinaat-oplossingen.

Bepaling geschiedde met een „Advanced Osmometer” via vriespuntsverlaging ($\pm 0,5\%$ nauwkeurig). De osmotische waarde van 32% chlooramfenicolsuccinaat was niet te bepalen door de te grote viscositeit van deze oplossing. Chlooramfenicolsuccinaat 6,38% is een isotone oplossing (met Ringer oplossing).

	Oplosmiddel	Toniciteit	Osmotische waarde in milliosmols per kg oplosmiddel
	Ringer oplossing	1,0	300
	Fysiologisch zout	0,93	280
	Aqua dest.	0	0
4%	Aqua dest.	0,76	229
8%	Aqua dest.	1,4	425
16%	Aqua dest.	2,3	689
20%	Aqua dest.	2,7	800
24%	Aqua dest.	3,0	902
32%	Aqua dest.	3,75	onbekend

Immers na de applicatie van chlooramfenicolsuccinaat 20, 24 en 32% wordt vrijwel hetzelfde effect gemeten (III.2.). Dit komt ook overeen met het feit, dat er morfologisch géén verschil in beschadiging was, tussen de 22,9% en de 45,7% chlooramfenicolsuccinaatoplossingen en tussen de postoperatieve overlevingen van 3, 6, 9 of 24 uren, in de studies van *Proud*, *Mittelman* en *Seiden* (1968; I.3.2.).

Er kan geconcludeerd worden, dat een isotone tot licht hypertone chlooramfenicolsuccinaatoplossing in aqua dest. de maximaal toelaatbare concentratie vormt.

Uit de in dit proefschrift beschreven experimenten blijkt, dat bij caviae een 8% oplossing van chlooramfenicolsuccinaat in aqua dest. niet ototoxisch en een 16% oplossing daarentegen duidelijk wel ototoxisch is. Theoretische overwegingen, dat bij de mens een lagere concentratie al ototoxisch zou zijn, zijn er niet. Te verwachten is dus (en de klinische ervaring is hiermee in overeenstemming), dat een

Dat het locale gebruik van chlooramfenicol om andere redenen (sensibilisatie) niet wenselijk is, wordt hier buiten beschouwing gelaten.

8% chlooramfenicolsuccinaatoplossing in aqua dest. niet ototoxisch is. Op grond van de ototoxiciteit van de hogere concentraties moet het gebruik van chlooramfenicolpoeder worden ontraden. Ook het gebruik van chlooramfenicolopdruppels bij perilymphe fistels is niet juist.

IV.4. IS DE IN DE LITERATUUR BESTAANDE DISCREPANTIE TUSSEN HET EFFECT VAN CHLOORAMFENICOLOORDRUPPELS BIJ KLINISCH GEBRUIK EN NA LOCALE APPLICATIE IN HET ACUTE DIEREXPERIMENT TE VERKLAREN?

A. Chlooramfenicolbase 40% (onbekend oplosmiddel, niet visceuse oplossing) is duidelijk minder ototoxisch bij katten van bij caviae. Chlooramfenicolsuccinaat 40% (onbekend oplosmiddel, zeer visceuse oplossing) is zeker even toxisch voor katten als chlooramfenicolbase 40% voor cavia's (I.3.1.; *Patterson* en *Gulick*, 1963; *Gulick* en *Patterson*, 1964). Mogelijk is de grotere toxiciteit van chlooramfenicolsuccinaat 40% bij de kat te wijten aan de grote viscositeit van deze oplossing, waardoor de ronde venstermembraan, na de half uur durende aanwezigheid van chlooramfenicolsuccinaat 40% op de ronde venstermembraan, niet goed gereinigd kon worden („blijft plakken”). Dat chlooramfenicolbase 40% duidelijk minder toxisch is bij katten dan bij caviae, zou dus kunnen betekenen, dat bij katten per volume-eenheid perilymphe minder chlooramfenicolbase naar de perilymphe van de scala tympani diffundeert. Hierbij is dan aangenomen, dat de passage van chlooramfenicolbase van scala tympani door o.a. de basilairmembraan naar de haarcellen voor de kat en de cavia dezelfde is en dat de haarcellen van beide dieren even gevoelig zijn voor chlooramfenicolbase.

Met behulp van de wet van Fick kan men de invloed nagaan van het oppervlak van de ronde venstermembraan op de passage van stoffen door de ronde venstermembraan naar de cochlea. De wet van Fick voor diffusieprocessen luidt:

$$\frac{\Delta m}{\Delta t} = D \cdot q \cdot \frac{\Delta c}{\Delta x}, \text{ waarin:}$$

Δm = de hoeveelheid stof, die het grensvlak (de ronde venstermembraan) gedurende een bepaalde tijd Δt passeert.

D = de diffusieconstante (een materiaalconstante) = de hoeveelheid stof, die door een bepaalde oppervlakte-eenheid, in een bepaalde tijdseenheid en bij een bepaalde concentratiegradient diffundeert. Het is redelijk te veronderstellen, dat deze constante voor de ronde venstermembranen van cavia en kat niet belangrijk verschilt.

q = het oppervlak van het scheidingsvlak (de ronde venstermembraan).

$$\frac{\Delta c}{\Delta x} = \text{de concentratiegradient over de ronde venstermembraan.}$$

Tabel V.

	Aantal cochleawindingen	Oppervlakte ronde venstermembraan (Wever en Lawrence, 1954).	Perilymphe volume (scala tympani + scala vestibuli)
MENS	2¾	2 mm²	18 µl (Rauch, 1964).
KAT	3	3,01 mm²	15 µl (Silverstein, 1966).
CAVIA	4	1,02 mm²	4,5 µl (Rauch, 1964).

Het belangrijkste verschil tussen de cavia en de kat bij bovenstaande beschouwing is het verschil in oppervlak van de ronde venstermembranen (q). Doordat de oppervlakte van de ronde venstermembraan van de kat circa 3× zo groot is als die van de cavia (tabel V), zal bij de kat per tijdseenheid een grotere hoeveelheid chlooramfenicolbase in de perilymphe kunnen geraken. Daar de hoeveelheid perilymphe van de kat echter ook ongeveer 3× zo groot is als die van de cavia (tabel V), zal de *concentratie* chlooramfenicolbase in de perilymphe van beide dieren ongeveer dezelfde zijn. De verschillende grootte van de ronde venstermembraan en de verschillende hoeveelheid perilymphe van de kat en de cavia zijn dus géén verklaring van het feit, dat chlooramfenicolbase 40% minder toxisch is bij katten dan bij cavia's.

De ronde venstermembraan van de mens is 2× zo groot als van de cavia, terwijl het perilymphe volume van de mens 4× zo groot is als van de cavia (tabel V). Mogelijk, dat deze laatste verhoudingen iets verklaren van de geringe binnenoorschadiging bij klinisch gebruik van chlooramfenicolopdruppels.

- B. Bij een vergelijking tussen de cochleabeschadiging van mens en proefdier, ten gevolge van de applicatie van een medicament in het middenoor, dient men ook rekening te houden met het feit, dat de ronde venstermembraan bij de mens in een diepe nis beter beschermd ligt dan die van bijvoorbeeld cavia of kat. Ook blijft de mens na toediening van chlooramfenicolopdruppels niet een half uur lang in een zodanige positie liggen, dat de chlooramfenicoloplossing niet van de ronde venstermembraan kan aflopen. Anderzijds wordt bij het proefdier, in tegenstelling tot de mens, de chlooramfenicol slechts éénmalig toegediend en na een half uur weer zorgvuldig verwijderd. Bij proefdieren werden echter ook veel hogere concentraties geapliceerd dan klinisch gebruikelijk is.

Tabel VI. Het gedrag van CM amplitude, A_{N1} en τ_{N1} tijdens de aanwezigheid van chlooramfenicolsuccinaat op de ronde venstermembraan.

Gemiddelde kantelpunt en gemiddelde helling van de CM amplitude-, A_{N1} - en τ_{N1} curven.

K = kantelpunt.

H = helling.

K.X. = kantelpunt X („getrapt” verloop). Als waarden zijn de waarden van de kleinere helling genomen (voor het algemeen gemiddelde zijn de waarden van de grotere helling genomen).

— = geen verandering.

Kantelpunt X:

1. 32% chlooramfenicolsuccinaat bij 8000 Hz 12,8 minuten (corresponderende CM kantelpunt 12 minuten).
2. 32% chlooramfenicolsuccinaat bij 4000 Hz 17,8 minuten (corresponderende CM kantelpunt 15 minuten).
3. 24% chlooramfenicolsuccinaat bij 4000 Hz 16,0 minuten (corresponderende CM kantelpunt 14,3 minuten).

	8000 Hz				4000 Hz				8000 Hz		4000 Hz		Aantal oren 4000 Hz	Aantal oren 8000 Hz
	A_{N1}		CM amplitude		A_{N1}		CM amplitude		τ_{N1}		τ_{N1}			
	K	H	K	H	K	H	K	H	K	H				
4%	9,8	0,1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	5	—
8%	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4	—
8% „toename begin”	—	—	7,1	-0,1	—	—	—	—	—	—	—	—	4	—
16%	10,6	3,5	15,5	1,0	12,4	2,1	16,0	1,0	7,8	0,5	9,1	0,3	6	6
16% „toena- me begin”	—	—	4,3	-0,2	—	—	2,4	-0,2	—	—	—	—	6	6
20%	6,0	7,6	11,5	1,3	11,8	3,4	13,0	1,6	8,2	2,2	7,8	0,5	4	4
24%	6,5	8,8	8,8	1,4	8,0	2,2	12,2	1,5	5,9	1,9	8,9	0,6	4	4
24% K.X.	—	—	—	—	2,6	1,0	—	—	—	—	10,8	0,9	—	1
32%	6,1	5,2	10,7	1,2	8,2	4,7	12,1	1,2	4,8	1,1	6,6	1,1	6	6
32% K.X.	4,0	1,4	—	—	7,3	1,6	—	—	—	—	—	—	1	1
32% „ernaast”	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	2

SAMENVATTING

In dit proefschrift wordt verslag gedaan van een onderzoek naar het effect van chlooramfenicolsuccinaat in aqua dest., bij locale toediening op de ronde venster-membraan van caviae, op de cochleaire microfonie en de samengestelde actiepotentiaal van de n. acusticus.

In de *inleiding* worden in het kort beschreven: de anatomie en fysiologie van het binnenoor. Hierna worden de cochleapotentiaal en de samengestelde actiepotentiaal van de n. acusticus besproken.

In *hoofdstuk I* wordt het begrip ototoxiciteit besproken, evenals methoden om ototoxiciteit van stoffen in dierexperimenten te onderzoeken. Daarna wordt een literatuuroverzicht gegeven, waaruit blijkt, dat na klinisch gebruik van chlooramfenicol géén ototoxische werking bekend is. Bij morfologisch en electrofysiologisch dierexperimenteel onderzoek, na locale applicatie van chlooramfenicol op de ronde venstermembraan, blijkt echter wél een ototoxische werking aanwezig te zijn. Het feit, dat chlooramfenicol in de kliniek gebruikt wordt in de vorm van oordruppels, was de aanleiding tot dit onderzoek. Discussie over de literatuurgegevens leidt tot de volgende vraagstelling:

1. Bereikt het chlooramfenicolsuccinaat de cochlea vanuit het middenoor via de middenoormucosa, via het ovale venster of via het ronde venster?
2. Is er iets te zeggen over de successieve aangrijpingspunten in de cochlea?
3. Welke is de maximale concentratie van chlooramfenicolsuccinaat, die veilig toegediend kan worden in het middenoor van de cavia en kan men daaruit de maximaal toelaatbare concentratie bij klinisch gebruik extrapoleren?
4. Is de in de literatuur bestaande discrepantie tussen het effect van chlooramfenicoloordruppels bij klinisch gebruik en dat van locale applicatie in het acute dierexperiment te verklaren?

In *hoofdstuk II* worden beschreven: het proefdier, de narcose- en operatietechniek, de te onderzoeken chlooramfenicolvorm en -concentraties, de meetopstelling, de meetmethoden met de gebruikte parameters van de cochleaire microfonie en de samengestelde actiepotentiaal en de meetprocedure.

In *hoofdstuk III* worden de meetresultaten besproken.

De invloed van de concentratie chlooramfenicolsuccinaat, na de $\frac{1}{2}$ uur durende aanwezigheid op de ronde venstermembraan, op het input-output gedrag van cochleaire microfonie (CM) en samengestelde actiepotentiaal (AP) bij de verschillende frequenties wordt nagegaan. Het blijkt, dat voor concentraties van 16% en hoger de AP amplitude tussen de 1e en de 10e minuut na applicatie begint af te nemen, terwijl de corresponderende CM amplitude constant blijft of toeneemt (16%). Enkele minuten later begint ook de corresponderende CM amplitude af te nemen. De snelheid van afname is voor de AP groter dan voor de CM. Bovendien is er een duidelijk frequentie-afhankelijkheid, nl. de CM en AP nemen eerder en sneller af voor de hogere frequenties dan voor de lagere frequenties.

De latentie (τ_{N1}) van de eerste negatieve deflectie van de AP (N_1) neemt toe bij afname van de amplitude van de N_1 (A_{N1}).

De CM- en AP amplitude blijken circa 6 uren na de applicatie van een 16% oplossing voor de hogere frequenties afgenomen en bij een 32% oplossing van chlooramfenicolsuccinaat voor alle gemeten frequenties (1, 2, 4 en 8 kHz) belangrijk afgenomen te zijn en wel progressief voor een hogere frequentie.

De amplitude-latentie curven vóór en na de applicatie van chlooramfenicolsuccinaat blijken identiek te zijn.

Voor de 16% en vooral 32% oplossing van chlooramfenicolsuccinaat wordt een drempelverhoging van de AP gemeten voor de 4 kHz en vooral voor de 8 kHz.

De adaptatiemetingen blijken na chlooramfenicolsuccinaat applicatie géén veranderingen te zien te geven, uitgezonderd bij de 32% chlooramfenicolsuccinaat-oplossing, waar een verschuiving van het 50% punt naar een kleinere interstimulusinterval waarde (bij 4, 6 en 8 kHz) en een kleinere helling (alleen bij 8 kHz) optreden.

Zoals blijkt uit metingen bij controle oren is zowel voor de CM- als voor de AP amplitude de gemiddelde waarde, $7\frac{1}{2}$ uren na het begin van de meting, niet kleiner dan 80% van de beginwaarde.

De 45 minuten durende aanwezigheid van 7,4% diNasuccinaatoplossing in aqua dest. (isotoon met 32% chlooramfenicolsuccinaatoplossing in aqua dest.) op de ronde venstermembraan van 2 extra controle oren geeft géén verandering van CM- en AP parameters.

De 60 minuten durende aanwezigheid van 32% chlooramfenicolsuccinaat naast de ronde venstermembraan (zodanig dat géén contact met de ronde venstermembraan ontstond) van 2 oren geeft géén verandering van CM- en AP parameters.

In *hoofdstuk IV* wordt de vraagstelling beantwoord.

1. Het chlooramfenicolsuccinaat kan de cochlea alleen bereiken vanuit het middenoor via diffusie door de ronde venstermembraan.
2. De route die chlooramfenicolsuccinaat volgt is: diffusie door de ronde venstermembraan naar de perilymphe van de scala tympani van de basale winding en dan door de basilairmembraan van de basale winding naar de haarcel-dendriet synaps of de zenuw.
3. Met behulp van de studies van Arslan (1969) en Sohmer en Feinmesser (1967) kan beredeneerd worden, dat een 8% chlooramfenicolsuccinaatoplossing in aqua dest. niet ototoxisch is voor de mens na locale applicatie in de vorm van oordruppels.
4. De in de literatuur bestaande discrepantie tussen het effect van chlooramfenicoloordruppels bij klinisch gebruik en dat van locale applicatie in het acute dierexperiment wordt m.b.v. de wet van Fick voor diffusieprocessen getracht te verklaren. De anatomie van het middenoor, verschil tussen kliniek en proefopstelling en het verschil in geapliceerde concentraties zijn waarschijnlijk van belang.

SUMMARY

In this thesis an account is given of an investigation into the effect of an aqueous solution of chloramphenicol succinate, after local application to the round window membrane of guinea pigs, on the cochlear microphonics and the compound action potential of the acoustic nerve.

In the *Introduction* the anatomy and physiology of the inner ear are briefly described, and the cochlear potentials and the compound action potential of the acoustic nerve are discussed.

In *Chapter I* the concept of ototoxicity is discussed, as well as methods to investigate the ototoxicity of materials in animal experiments. A review of the literature is given, from which it is evident that no ototoxic effects after the clinical use of chloramphenicol have been reported. Nonetheless, morphological and electrophysiological investigations in animals after local application of chloramphenicol to the round window membrane, show that an ototoxic effect can indeed occur. The fact that chloramphenicol is used clinically in the form of ear drops, led to this investigation. The data in the literature raise the following questions:

1. Does chloramphenicol succinate reach the cochlea from the middle ear via the middle ear mucosa, the oval window, or the round window?
2. What are the successive points at which the drug takes effect in the cochlea?
3. What is the maximum concentration of chloramphenicol succinate that can be safely applied to the middle ear of the guinea pig, and is it possible to derive from this dose the maximum admissible concentration for clinical use?
4. Is it possible to explain the difference found in the literature between the effect of chloramphenicol ear drops in clinical practice and that of local application in the acute animal experiment?

Chapter II describes the experimental animal, the anaesthesia and the surgical technique, the form and concentrations of chloramphenicol investigated, the experimental set up, the recording methods, the parameters used for the cochlear microphonics and the compound action potential, and the recording procedure.

Chapter III concerns the experimental data. The study of the influence of the concentration of chloramphenicol succinate applied for 30 minutes to the round window membrane, on the input-output behaviour of the cochlear microphonics (CM) and the compound action potential (AP) at the frequencies used, showed that at concentrations of 16% and higher the AP amplitude starts to decrease between the first and tenth minute after application, whereas the corresponding CM amplitude remains stable or increases (16%). A few minutes later, the corresponding CM amplitude starts to decrease too. The rate of decrease is faster for the AP than for the CM. In addition, there is a clear frequency dependency: the CM and AP decrease earlier and faster for the higher frequencies than for the lower frequencies.

The latency (τ_{N1}) of the first negative deflection of the AP (N_1) increases during the decrease of the N_1 amplitude (A_{N1}).

For the higher frequencies, the CM and AP amplitudes decreased about 6 hours after the application of a 16% solution and were considerably decreased for all recorded frequencies (1, 2, 4, and 8 kHz) after the application of a 32% solution of chloramphenicol succinate, progressively the higher the frequency.

The amplitude-latency scattergrams based on recordings made before and after the application of chloramphenicol succinate are identical.

For the 16% and even more so for the 32% solution of chloramphenicol succinate, an AP threshold elevation is measured at 4 kHz and to a higher degree at 8 kHz stimulation.

Adaptation of the AP does not change after application of chloramphenicol succinate except with the 32% solution, after which the 50% point shifts to a smaller interstimulus interval value (for 4, 6, and 8 kHz) and a less steep slope appears (only for 8 kHz).

Recordings from control ears show that the average value of the amplitude of both the CM and the AP recorded 7½ hours after the start of the measurements, is within 80-100% of the initial value.

The presence (lasting 45 minutes) of 7.4% disodiumsuccinate in aqueous solution (having the same tonicity as 32% chloramphenicol succinate in aqueous solution) on the round window membrane of two additional control ears, does not change the values of the parameters of the CM and AP.

The presence for 60 minutes of 32% chloramphenicol succinate beside the round window membrane (placed such that no contact with the round window membrane occurred) of two ears does not change the values of the parameters of the CM and AP.

Chapter IV gives the answers to the questions posed in Chapter I:

1. Chloramphenicol succinate can only reach the cochlea from the middle ear by diffusion through the round window membrane.
2. The route of chloramphenicol succinate is: diffusion through the round window membrane to the perilymph of the scala tympani of the basal turn and then through the basilar membrane of the basal turn to the hair cell-neuron synaps or the nerve.
3. On the basis of the findings of *Arslan* (1969) and *Sohmer* and *Feinmesser* (1967) and those of the present study, it may be concluded that an 8% aqueous solution of chloramphenicol succinate is not ototoxic for man after local application in the form of ear drops.
4. An attempt is made to explain the divergence in the literature between the reports on the effect of chloramphenicol ear drops in clinical practice and that of local application in the acute animal experiment on the basis of Fick's law for diffusion processes. The anatomy of the middle ear, the difference between clinical and experimental conditions, and differences in the concentrations applied, are probably important factors.

LITERATUUR

- Akivoshi, M., Sato, K., Shoji, T., Sugahiro, K.: Pattern of hair cell damage of the organ of Corti due to ototoxic antibiotics. *Audiol. Jap.* 14 : 530, 1971.
- Anderson, H., Wedenberg, E.: A new method for hearing tests in the guinea-pig. *Acta Oto-Laryng.*, 60 : 375, 1965.
- d'Angelo, E. P., Patterson, W. C., Morrow, R. C.: Chloramphenicol. Topical application in the middle ear. *Arch. Otolaryngol.*, 85 : 682, 1967.
- Arslan, M.: Modifications of the osmotic pressure of perilymph and endolymph. *Acta Oto-Laryng.*, 67 : 360, 1969.
- v. Békésy, G.: Über die Resonanzkurve und die Abklingzeit der Verschiedene Stellen der Schneckenwand. *Akust. Zeits.*, 8 : 66, 1943.
- v. Békésy, G.: Microphonics produced by touching the cochlear partition with a vibrating electrode. *J. Acoust. Soc. Amer.*, 23 : 29, 1951 (1).
- v. Békésy, G.: D.c. potentials and energy balance of the cochlear partition. *J. Acoust. Soc. Amer.*, 23 : 576, 1951 (2).
- v. Békésy, G.: D.c. resting potentials inside the cochlear partition. *J. Acoust. Soc. Amer.*, 24 : 72, 1952 (1).
- v. Békésy, G.: Gross localisation of the place of origin of the cochlear microphonics. *J. Acoust. Soc. Amer.*, 24 : 399, 1952 (2).
- v. Békésy, G.: Experiments in hearing. McGraw-Hill Book Company, Inc., 1960.
- Butler, R. A.: Some experimental observations on the d.c. resting potentials in the guinea pig cochlea. *J. Acoust. Soc. Amer.*, 37 : 429, 1965.
- Crifò, S.: Shiver-audiometry in the conditioned guinea-pig (simplified Anderson-Wedenberg test). *Acta Oto-Laryng.*, 75 : 38, 1973.
- Crifò, S.: Identification of ototoxic drugs by guinea-pig shiver-audiometry. *Audiology*, 13 : 302, 1974.
- Dallos, P.: Comments on the differential-electrode technique. *J. Acoust. Soc. Amer.*, 45 : 999, 1969.
- Dallos, P., Billone, M. C., Durrant, J. D., Wang, C.-y., Raynor, S.: Cochlear inner and outer haircells: Functional differences. *Science*, 177 : 356, 1972.
- Dankbaar, W. A.: De beweging van de stapes. Proefschrift (Leiden) 1972.
- Davis, H., Deatherage, B. H., Rosenblut, B., Fernandez, C., Kimura, R., Smith, C. A.: Modifications of cochlear potentials produced by streptomycin poisoning and by extensive venous obstruction. *Laryngoscope*, 68 : 596, 1958.
- Davis, H.: A model for transducer action in the cochlea. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 30 : 181, 1965.
- Eggermont, J. J.: De tijdsafhankelijke eigenschappen van cochleaire actiepotentiaalen bij de cavia. Proefschrift (Leiden) 1972.
- Engström, H., Kohonen, A.: Cochlear damage from ototoxic antibiotics. *Acta Oto-Laryng.*, 59 : 171, 1965.
- Engström, H., Ades, H. W., Andersson, A.: Ototoxic drugs. In: Structural pattern of the organ of Corti (page 120). *Almqvist-Wicksell*, Stockholm, 1966.
- Extra Pharmacopoeia. Martindale. Edited by R. G. Todd, The Pharmaceutical Press, London, 1967.
- Furukawa, T., Ishii, Y.: Neurophysiological studies on hearing in goldfish. *J. Neurophysiol.*, 30 : 1377, 1967.

- Gulick, W. L.: The effects of hypoxemia upon the electrical response of the cochlea. *Ann. Otol.*, 67 : 148, 1958.
- Gulick, W. L., Cutt, R. A.: The effects of abnormal body temperature upon the ear: cooling. *Ann. Otol.*, 69 : 35, 1960.
- Gulick, W. L., Cutt, R. A.: The effects of Epinephrine upon the ear. *Ann. Otol.*, 71 : 105, 1962.
- Gulick, W. L., Patterson, W. C., Myers, D.: The effects of Epinephrine upon the ear. II. Intracochlear application. *Ann. Otol.*, 71 : 110, 1962.
- Gulick, W. L., Patterson, W. C.: The effects of chloramphenicol upon the electrical action of the ear. (II. Long term data). *Ann. Otol.*, 73 : 204, 1964.
- Hennebert, D., Fernandez, C.: Ototoxicity of quinine in experimental animals. *Arch. Otolaryngol.*, 70 : 321, 1959.
- Honrubia, V., Ward, P. H.: Longitudinal distribution of the cochlear microphonics inside the cochlear duct (guinea pig). *J. Acoust. Soc. Amer.*, 44 : 951, 1968.
- Honrubia, V., Ward, P. H.: Dependence of the cochlear microphonics and the summating potential on the endocochlear potential. *J. Acoust. Soc. Amer.*, 46 : 388, 1969.
- Hussey, H. H.: Chloramphenicol induced bone marrow suppression. *JAMA*, 213 : 1183, 1970.
- Ishii, Y., Matsuura, S., Furukawa, T.: Quantal nature of transmission at the synapse between haircells and eighth nerve fibers. *Jap. J. Physiol.*, 21 : 79, 1971.
- Kohonen, A.: Effect of some ototoxic drugs upon the pattern and innervation of cochlear sensory cells in the guinea pig. *Acta Oto-Laryng. Suppl.*, 208, 1965.
- Koide, Y., Hata, A., Hando, R.: Vulnerability of the organ of Corti in poisoning. *Acta Oto-Laryng.*, 61 : 332, 1966.
- Konishi, T., Yasuno, T.: Summating potential of the cochlea in the guinea pig. *J. Acoust. Soc. Amer.*, 35 : 1448, 1963.
- Kroon, A. M.: Een onderzoek naar de invloed van chlooramfenicol en andere antibiotica op cellen van hogere organismen. *Ned. T. Geneesk.*, 133 : 162, 1969.
- Kuypers, W., Bonting, S. L.: The cochlear potentials (I en II). *Pflügers Archiv.*, I : 320 : 348, 1970; II : 320 : 359, 1970.
- Lawrence, M., Nuttall, A. L.: Electrophysiology of the organ of Corti. In: *Biochemical mechanisms in hearing and deafness*. Edited by Paparella, M. M.; Publisher, C. C. Thomas, Springfield, Illinois, USA, 1970.
- Martelo, O. J., Manyan, D. R., Smith, U. S.: Chloramphenicol and bone marrow mitochondria. *J. Lab. Clin. Med.*, 74 : 927, 1969.
- Patterson, W. C., Gulick, W. L.: The effects of chloramphenicol upon the electrical activity of the ear. *Ann. Otol.*, 72 : 50, 1963.
- Pestalozza, G., Davis, H.: Electric responses of the guinea pig ear to high audio-frequencies. *Am. J. Physiol.*, 185 : 595, 1956.
- Portmann, M., Aran, J.-M., Le Bert, G.: Mise en place définitive d'une electrode sur la fenêtre ronde du Cobaye. *Comptes rendus des séances de la Société de Biologie*. Extract du Tome, 160 : 551, 1966.
- Proud, G. O., Mittelman, H., Seiden, G. O.: Ototoxicity of topically applied chloramphenicol. *Arch. Otolaryngol.*, 87 : 580, 1968.
- Rahm, W. E. (Jr.), Strother, W. F., Gulick, W. L.: The stability of the cochlear response through time. *Ann. Otol.*, 67 : 972, 1958.
- Rahm, W. E. (Jr.), Strother, W. F., Crump, J. F., Parker, D. E.: The effects of anesthetics upon the ear. IV. Lidocaine hydrochloride. *Ann. Otol.*, 71 : 116, 1962.
- Rauch, S.: *Biochemie des Hörorgans*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1964.
- Rice, E. A., Shinabarger, W.: Studies on the endolymphatic d.c. potential of the guinea pig's cochlea. *J. Acoust. Soc. Amer.*, 33 : 922, 1961.
- Ruedi, L., Furrer, W., Luthy, F., Nager, G., Tschirren, B.: Further observations concerning the toxic effects of streptomycin and quinine on the auditory organ of guinea pigs. *Laryngoscope*, 62 : 333, 1952.
- Sato, Y., Mizukoshi, O., Daly, J. F.: Microrespirometry of the membranous cochlea and ototoxicity in vitro. *Ann. Otol.*, 78 : 1201, 1969.
- Silverstein, H.: Biochemical studies of the inner ear fluids in the cat. *Ann. Otol.*, 75 : 48, 1966.
- Sohmer, H., Feinmesser, M.: Effect of the osmotic pressure of solutions applied to the cochlea of guinea pigs and cats on cochlear potentials. *Acta Oto-Laryng.*, 64 : 55, 1967.
- Spoendlin, H.: The organisation of the cochlear receptor. *Adv. in Otorhinolaryng.*, 13 : 1, 1966.
- Spoor, A., Eggermont, J. J.: Action potentials in the cochlea: Masking, adaptation and recruitment. *Audiology*, 10 : 340, 1971.
- Spoor, A.: Apparatus for electrocochleography. *Acta Oto-Laryng. Suppl.*, 316, 1974.
- Strelieff, D., Haas, G., Honrubia, V.: Sound-induced electrical impedance changes in the guinea pig cochlea. *JASA*, 51 : 617, 1972.
- Tasaki, I., Davis, H., Legoux, J.: The space time pattern of the cochlear microphonics (guinea pig), as recorded by differential electrodes. *J. Acoust. Soc. Amer.*, 24 : 502, 1952.
- Tasaki, I., Fernandez, C.: Modification of cochlear microphonics and action potentials by KCl solution and by direct currents. *J. Neurophysiol.*, 15 : 497, 1952.
- Tasaki, I., Davis, H., Eldredge, D. H.: Exploration of cochlear potentials in guinea pig with a microelectrode. *J. Acoust. Soc. Amer.*, 26 : 765, 1954.
- Tasaki, I.: Nerve impulses in individual auditory nerve fibers of guinea pig. *J. Neurophysiol.*, 17 : 97, 1954.
- Tasaki, I., Spyropoulos, C. S.: Stria vascularis as source of the endocochlear potential. *J. Neurophysiol.*, 22 : 149, 1959.
- Wang, C.-y.: Thesis, Northwestern University, 1971.
- Teas, D. C., Eldredge, D. H., Davis, H.: Cochlear responses to acoustic transients: An interpretation of whole nerve action potentials. *J. Acoust. Soc. Amer.*, 34 : 1438, 1962.
- Ward, W. D., Duvall, A. J.: Behavioral and ultrastructural correlates of acoustic trauma. *Ann. Otol.*, 80 : 881, 1971.
- West, B. A., Brummett, R. E., Himes, D. L.: Interaction of kanamycin and ethacrynic acid. Severe cochlear damage in guinea pigs. *Arch. Otolaryngol.*, 98 : 32, 1973.

- Wever, E. G., Lawrence, M.: Physiological acoustics. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, 1954.
- Wever, E. G., Rahm, W. E. (Jr.), Strother, W. F.: The lower range of the cochlear potentials. *Proc. Natl. Acad. Sci. US.*, 45 : 1447, 1959.
- Wever, E. G.: Electrical potentials of the cochlea. *Physiol. Rev.*, 46 : 102, 1966.
- Yunis, A. A., Smith, U. S., Restrepo, A.: Reversible bone marrow suppression from chloramphenicol. A consequence of mitochondrial injury. *Arch. Intern. Med.*, 126 : 272, 1970.

Stellingen behorende bij het proefschrift van E. N. Brons

1. Indien een stof na parenterale of orale toediening niet ototoxisch blijkt te zijn, kan na locale toediening in de vorm van oordruppels toch een ototoxisch effect optreden.
2. Indien oordruppels met een opgeloste ototoxische stof het middenoor kunnen bereiken, moet de oplossing niet visceus en zeker niet hypertoon t.o.v. Ringer oplossing zijn.
3. De Schirmertest is slechts betrouwbaar bij dubbelzijdige uitvoering.
Hanson, J. et al.: *Arch. Otolaryngol.*, 101 : 293, 1975.
4. Acute perceptieslechthorendheid "e.c.i." is doorgaans het gevolg van een virale labyrinthitis.
v. Dishoeck, H. A. E., Bierman, Th. A.: *Ann. Otol.*, 66 : 963, 1957.
Schuknecht, H. F. et al.: *Acta Oto-Laryng.*, 76 : 75, 1973.
5. Het niet of wel uitgevallen zijn van de buitenste haarcellen in de cochlea is van géén belang voor het optreden van recruitment.
Schmidt, P. H. et al.: *Acta Oto-Laryng. Suppl.*, 316, 1974.
Kiang, N.Y.S., Moxon, E. C.: *J. Acoust. Soc. Am.*, 55 : 620, 1974.
6. Uit de door Kontula e.a. vermelde gegevens omtrent de relatieve bindingsaffiniteit en biologische activiteit van onderzochte steroïden blijkt, in tegenstelling tot wat opgegeven wordt, géén redelijke overeenstemming tussen vitro en vivo waarden te bestaan.
Kontula, K. et al.: *Acta Endocrinologica*, 78 : 574, 1975.
7. Preventie van aangeboren afwijkingen is in ons land op grotere schaal mogelijk dan thans plaatsvindt.
8. Bij duraplaatdefecten met prolaps van de dura (met of zonder inhoud) in het mastoid of middenoor bij chronische otitis media moet de neurochirurg primair een cranioplastiek ter sluiting van het duraplaatdefect via een craniotomie verrichten, voordat het oor definitief gesaneerd kan worden.
9. Vliko bakken dienen met reflectoren uitgerust te worden.