

Samenvatting

Om gehoor te geven aan een verzoek van de Leidse universiteit volgt hier een samenvatting van het proefschrift in de Nederlandse taal. Voor een groot deel is dit stuk een vertaling van hoofdstuk I, *General introduction*, en van hoofdstuk VIII, *Summary and conclusions*. Dit proefschrift is getiteld "Effekten van abnormale responsies van afzonderlijke vezels op de samengestelde aktiepotentiaal in beschadigde cochlea's", en beschrijft dierexperimenteel onderzoek in de electrocochleografie (ECoG). De ECoG is een audiometrische techniek waarmee een diagnose kan worden gesteld van de (pathologische) toestand van de cochlea. Deze techniek waarbij met geluidsstimuli elektrische zenuwpotentialen worden opgewekt en gemeten met behulp van een electrode dicht bij de cochlea of gehoorzenuw, is eind '60-er jaren ontwikkeld met het oog op klinische toepassing. Al spoedig is de ECoG toegepast aan de Keel-, Neus-, en Oorheelkunde afdeling van het Academisch Ziekenhuis te Leiden onder impulsen van J.J. Eggermont en P.H. Schmidt. Een deel van het experimenteel onderzoek in de Leidse audiologie is sindsdien gericht op verbetering van interpretatie van de ECoG signalen en ontwikkeling van nieuwe stimulusparadigma's. Het recente onderzoek is geïnitieerd door V.F. Prijs en heeft ondermeer geleid tot dit proefschrift.

De hoofdkomponent van de opgewekte ECoG signalen is de samengestelde aktiepotentiaal (verder aangeduid met CAP, afkorting van de Engelse term *Compound action potential*), een signaal dat is samengesteld uit aktiepotentialen van gehoorzenuwvezels. De interpretatie van de CAP is voornamelijk gebaseerd op statistiek over een grote kollektie van experimentele CAP gegevens in mens en dier, zowel voor goede als slechte oren. Om tevens een mathematische onderbouwing van de CAP analyse te verkrijgen zijn modelstudies verricht waarbij gebruik gemaakt wordt van responseeigenschappen van afzonderlijke neuronen van de gehoorzenuw. Opvallend genoeg is slechts weinig gedaan aan modellering van CAPs voor beschadigde cochlea's. In dit proefschrift zijn experimenten beschreven waarbij CAPs en responsies van afzonderlijke zenuwvezels zijn gemeten in cavia's met gebruik van kliks als geluidsstimuli. Met behulp van een empirisch model is onderzocht welke veranderingen in vezelresponsies ten grondslag liggen aan afwijkingen in de CAP in beschadigde cochlea's. Alvorens in te gaan op de resultaten van dit onderzoek, volgen inleidingen over het oor, en over de ECoG.

Inleiding

Cochlea en gehoorzenuw

Voor visuele ondersteuning bij de uitleg over de cochlea in deze paragraaf zijn figuren 1, 2 en 4 van Hoofdstuk I aanbevolen. De cochlea is het deel van het

gehoororgaan waar de transduktie van akoestische trillingen naar elektrische signalen van de gehoorzenuw plaatsvindt. De cochlea bestaat uit drie compartimenten die gevuld zijn met vloeistof en die van elkaar worden gescheiden door het membraan van Reissner en door het basilaire membraan. De cochlea is spiraalvormig gewonden, en heeft $2\frac{1}{2}$ (mens) tot 4 (cavia) windingen. Vanwege de vorm wordt de cochlea ook wel slakkehuis genoemd.

De geluidstrillingen worden via de gehoorgang, het trommelvlies en de gehoorbeentjes (hamer, aambeeld en stijgbeugel) overgebracht op bewegingen van de vloeistof in de cochlea en op bewegingen van het basilaire membraan. Het basilaire membraan is tonotopisch georganiseerd: de frequenties waarvoor het membraan meest gevoelig is, variëren langs het membraan, en dit is aldus bij de stapes afgestemd op hoge tonen en bij de apex (top van de cochlea) op lage. Op het basilaire membraan bevinden zich de zintuigcellen, de haarcellen, te onderscheiden, zowel qua plaats, qua vorm als qua functie, in binnenste en buitenste haarcellen (*inner, outer hair cells*, IHCs, OHCs). Ten gevolge van de beweging van het basilaire en het tectoriële membraan gaan de haartjes, de cilia, van de haarcellen heen en weer. Er ontstaan daardoor ionenstromen in de haarcellen met als gevolg dat biochemicalïen, neurotransmitters, uit de haarcel naar de zenuwuiteinden bewegen, waar vervolgens aktiepotentialen gegenereerd worden. Langs de zenuwvezel wordt de aktiepotentiaal (vanwege de vorm ook *spike* genoemd) voortgeleid naar volgende zenuwkernen en uiteindelijk naar de hersenen leidend tot een gehoorsensatie. De informatie van het geluid (frequentieinhoud, volume) is gecodeerd door een specifiek tijdspatroom waarin de aktiepotentialen gegenereerd worden, en in een specifieke groep van vezels die geactiveerd worden. De informatiestroom naar de hersenen loopt primair langs de binnenste haarcellen (IHCs), die fungeren als mechano-electrische transducers. Per octaaf langs het basilaire membraan bevinden zich ongeveer 200 IHCs, en ongeveer 20 zenuwvezels zijn gekoppeld aan één IHC. Per binnenste zijn er drie buitenste haarcellen. Over de rol van die buitenste haarcellen is veel beweging in gehooronderzoekersland, de algemene opvatting is dat ze fungeren als electromotoren die een positieve terugkoppeling verzorgen naar het basilaire membraan om zo de detectie-gevoeligheid te vergroten en de frequentieafstemming te verbeteren.

Bij het gehooronderzoek kan informatie verkregen worden over het functioneren van de cochlea ondermeer door de responsies van de gehoorzenuwvezels te meten. Met behulp van zeer fijne micro-electroden kunnen metingen worden verricht aan de gehoorzenuwvezels in proefdieren. Lokale frequentiekaracteristieken in de cochlea worden weerspiegeld door de frequentieafstemming in een vezel, welke wordt bepaald uit frequentie-drempelkurven (*frequency threshold curves*, FTCs). Van een FTC wordt de karakteristieke frequentie (*characteristic frequency*, CF) en de responsdrempel afgeleid. Een andere responseigenschap die de vezel typeert, is de spontane vuurfrequentie (*spontaneous discharge rate*, SR). Het gedrag van de neurale respons als functie van tijd wordt afgeleid uit post-stimulus-tijd-histogrammen (*poststimulus time histograms*, PSTHs).

Electrocochleografie

De aktiviteit van de gehoorzenuw kan globaal bepaald worden door bij de cochlea een macro-electrode te plaatsen. Indien in respons op een geluidsstimulus in een voldoende aantal zenuwvezels gelijktijdig een aktiepotentiaal gegenereerd wordt, tellen die aktiepotentialen dusdanig op dat op de plaats van de macro-electrode een elektrische potentiaal meetbaar is. Deze samengestelde aktiepotentiaal geeft een indicatie van de (eventueel verslechterde) toestand van de cochlea. De methode waarbij de CAP wordt gemeten, is de ElectroCochleoGrafie (ECoG). De ECoG kan enerzijds dienen voor diagnose van gehoorstoornissen van een patiënt, anderzijds kan kennis worden verkregen over de werking van de cochlea (in een proefdier of specifiek in de mens).

De opbouw van de CAP uit de responsbijdragen van de verschillende zenuwvezels (totaal aantal vezels in gehoorzenuw is ongeveer 40.000) wordt mathematisch weergegeven als een convolutie van de som van de neurale vuurkansen met de eenheidsbijdrage. Deze eenheidsbijdrage (*unit response*, UR) is de potentiaalverandering ter plaatse van de macro-electrode die het gevolg is van een enkele aktiepotentiaal van een zenuwvezel. De vuurkans van de vezel wordt geschat uit het PSTH. De UR is in goede benadering gelijk voor alle vezels en is onafhankelijk van de geluidsstimulus. Het PSTH is vezelspecifiek en hangt af van de stimulus. De convolutievergelijking is uitgangspunt in modellering van CAPs, en in geval van dit proefschrift wordt die als volgt weergegeven:

$$C(L_0, m; t) = \int_{-\infty}^t \left\{ \sum_{f_c, r_s} P(f_c, r_s, L_0, m; \tau) \right\} U(t-\tau) d\tau \quad (1)$$

waar $C(L_0, m; t)$ de CAP voorstelt als functie van stimulus nivo (*level*) L_0 , klik polariteit m en tijd t , en waar $P(f_c, r_s, L_0, m; \tau)$ het model-PSTH is met f_c en r_s de vezelvariabelen CF en SR. Voorbeelden van een CAP, PSTH en UR zijn afgebeeld in figuur 5 van Hoofdstuk I.

De ECoG kan worden toegepast ten behoeve van de diagnostiek, omdat de CAPs afgeleid van slechte oren significante afwijkingen vertonen. Afwijkingen in de CAP kunnen op verschillende wijzen tot stand komen. Bij een aandoening aan de gehoorzenuw kan de UR veranderen, en aldus, zoals we eenvoudig begrijpen uit bovenstaande vergelijking, de CAP. Meer voorkomend (bij voorbeeld als gevolg van ouderdom of te veel lawaai) zijn cochleaire aandoeningen, die gewoonlijk bestaan uit schade aan de haarcellen. In een vroeg stadium van een haarcelkwetsuur zijn de cilia, de haartjes, aangedaan. Een functioneel gevolg van schade aan binnenste haarcellen varieert van een verhoging van de responsdrempel (onafhankelijk van de stimulusfrequentie) tot een complete uitschakeling. Een gevolg van kapotte buitenste haarcellen is een verandering van frequentieafstemming en van gevoeligheid (meestal uiteraard een verslechtering). Een preciezer verband tussen morfologische afwijkingen en dysfuncties is voorgesteld door Liberman, die verschillende beschadigingen aan IHCs en/of OHCs relateerde aan abnormale typen van FTCs (*Hfdst. I, figuur 6*). Een

verandering in een haarcel betekent een verandering in de transduktieketen buitenwereld-gehoorzenuw, en leidt tot veranderingen in de responsies van de zenuwvezels. Als gevolg van een verhoging van responsdrempels zullen bij lage geluidsnivo's minder vezels bijdragen tot de CAP. Bij hoge geluidsnivo's kunnen de vezelresponsies ($P(f_c, r_s, L_0, m; \tau)$ in vergelijking (1)) gewijzigd zijn en aldus de CAP.

Onderzoeksvragen

Het doel van het onderzoek is een betere basis te verschaffen voor interpretatie van CAPs in beschadigde cochlea's. Daartoe zijn experimenten uitgevoerd in cavia's met normale en met lawaai-beschadigde cochlea's. CAPs en PSTHs zijn simultaan gemeten op klikstimuli. In deze korte geluidspulsen (duur 0.1 ms) zijn alle frequenties vertegenwoordigd, zodat vrijwel alle vezels reageren. De kliks zijn gevarieerd in intensiteit en in polariteit (verdichting of verdunning, analoog aan blazen versus zuigen). In dezelfde vezels waarbij PSTHs zijn gemeten, zijn de FTC en SR gemeten en is, indien de micro-electrode nog in contact was met de vezel, de UR afgeleid. De volgende vragen zijn onderzocht. Ten eerste, zijn de klik-PSTHs van vezels die beschadigde cochleaire gebieden innervieren, veranderd, en hoe zijn veranderingen gerelateerd aan veranderingen in FTCs. Ten tweede, verandert de UR ten gevolge van een cochleaire aandoening? Ten derde, zijn naast een afname in bijdragen volgend uit drempelverhogingen van vezels, ook abnormale vezelresponsies verantwoordelijk voor afwijkingen in de CAP, en zo ja, in welke mate? Ten slotte, is het mogelijk om uit abnormale klik-CAPs afwijkingen in responsies van afzonderlijke vezels af te leiden en zo informatie te verkrijgen over lokale dysfuncties in de cochlea?

Resultaten voor de normale cochlea

Responsies van afzonderlijke vezels

De gehoorzenuwvezels van de cavia kunnen op grond van de spontane activiteit (weergegeven in SR) worden onderverdeeld in drie groepen. Vezels met een hoge SR (groter dan 30 spikes/s) hebben een lagere responsdrempel dan vezels met een lage SR (kleiner dan 5 spikes/s), en middel-SR vezels hebben een drempel daartussenin (*Hfdst. II, figuur 1*). Een verdere onderverdeling is aangebracht tussen vezels met hoge en die met lage CF en is gestoeld op twee verschillende temporele patronen in de klikresponsies (*Hfdst. II, figuur 5; Hfdst. III, figuur 3*). Vezels met hoge CF (boven 3 kHz) vertonen nagenoeg identieke responsies op verdichtings- en verdunnings-klikstimuli, en de PSTHs tonen een of twee pieken met een korte latentie. Daarentegen zijn de klikresponsies van vezels met lage CF sterk afhankelijk van klikpolariteit: de PSTHs hebben verscheidene pieken die in tegengestelde fase verschijnen als de klikpolariteit wordt omgewisseld, de latentie is relatief lang en neemt af als functie van CF. Deze resultaten komen overeen met bevindingen in zoogdieren van andere gehooronderzoekers.

Ten behoeve van het empirisch CAP model (*Hfdst. III, VII*) zijn de klikresponsies van de afzonderlijke zenuwvezels (de vuurkansen) geschat op grond van de experimenteel gevonden waarden van specifieke parameters van het PSTH: de latentie, amplitude en synchronisatie van de grootste piek. Deze parameters zijn afhankelijk van vezelvariabelen CF en SR, en van stimulusvariabelen intensiteit (L_0) en klikpolariteit (m). De SR-afhankelijkheid van de PSTH-parameters is gemodelleerd met behulp van een effectieve intensiteit L die varieert met SR: $L = L_0 - \delta L(r_s)$. Zo wordt zeer redelijk beschreven, dat vezels met een lagere SR (dus lagere L , hogere drempel) een langere latentie en een kleinere amplitude hebben.

Eenheidsbijdrage

De eenheidsbijdrage van afzonderlijke vezels is experimenteel bepaald met behulp van vuring-volgend middelen (*spike-triggered averaging*). In deze methode is het spontane elektrische signaal aan het ronde venster (waar gewoonlijk de CAP wordt afgeleid) in tijdsintervallen voor en na het optreden van een actiepotentiaal opgenomen en gemiddeld per optreden. Na minimaal 5000 middelingen wordt een potentiaal-golfvorm verkregen met redelijke signaal-ruis verhouding. De meest gevonden UR-golfvorm (meestal in vezels met hoge SR) is bifasisch en de amplitude van de eerste, negatieve piek is 0.12 μV (*Hfdst. IV*). Dit bevestigt spaarzame eerdere bevindingen verkregen met dezelfde methode. De UR-amplitude schattingen die gedaan konden worden in vezels met lage en middelhoge SR, bleken meestal groter uit te komen dan 0.3 μV . Een verklaring van E.F. Evans (1987, Brit. J. Audiol. 21:103-104) dat zulke grote golfvormen het resultaat zijn van synchronie van spontane vuringen van verscheidene vezels (elk met een UR van ongeveer 0.12 μV), is aannemelijk. Een model-UR, gelijk voor alle vezels van de gehoorzenuw, is beschreven als volgt:

$$\begin{aligned} U(t) &= U_N/\sigma_N(t-t_0)\exp\{1/2-(t-t_0)^2/2\sigma_N^2\} & \text{als } t < t_0 \\ U(t) &= U_P/\sigma_P(t-t_0)\exp\{1/2-(t-t_0)^2/2\sigma_P^2\} & \text{als } t \geq t_0 \end{aligned} \quad (2)$$

met $U_{N(P)}$ de amplitude en $\sigma_{N(P)}$ de breedte van de negatieve (N) en positieve (P) UR piek, en t_0 de nuldoorgang van de bifasische golfvorm, en met parameter waarden als volgt: $U_N = 0.12 \mu V$, $\sigma_N = 0.12 \text{ ms}$, $U_P = 0.09 \mu V$ en $\sigma_P = 0.16 \text{ ms}$, $t_0 = -0.06 \text{ ms}$.

Samengestelde actiepotentiaal

Gelijkertijd met de responsies van afzonderlijke vezels op klikstimuli is de samengestelde respons aan het ronde venster afgeleid. Deze CAPs zijn gesimuleerd met een empirisch model dat gebaseerd is op de convolutie vergelijking (zie vergelijking (1)). De model-PSTHs ($P(f_c, r_s, L_0, m; \tau)$ in (1)) zijn berekend voor een hypothetische populatie van gehoorzenuwvezels (voor CFs tussen 250 Hz en 34 kHz), waarbij elke vezel gerepresenteerd is met een CF en een SR-kategorie. De model-PSTHs zijn bij elkaar opgeteld, en vervolgens is de som geconvolveerd met de model-UR met als resultaat een CAP. Volgens dit concept zijn CAPs voor beide klikpolariteiten en voor verschillende intensiteiten gesimuleerd.

Voor normale oren komen de gesimuleerde klik-CAPs goed overeen met de experimenteel bepaalde CAPs (*Hfdst. VII, figuur 2*). De overeenkomst geldt de latentie en amplitude van de eerste CAP piek (N_1), het gedrag van deze parameters als functie van klikpolariteit, en de golfvorm van de CAP met inbegrip van de tweede piek (N_2). Het enige aspect dat niet naar tevredenheid is gesimuleerd, betreft de toename van de N_1 -amplitude als functie van intensiteit bij hoge intensiteiten.

Beschadigde cochlea's

Om cochleaire beschadigingen te bewerkstelligen zijn een aantal cavia-oren blootgesteld aan een langdurige, luide toon (2 uur, ongeveer 120 dB SPL). Drempelverhogingen in de orde van 20 tot 40 dB werden gevonden over een bepaald frequentiegebied. Ook de enkele gevallen waar al voor aanbidding van het lawaai drempelverhogingen aanwezig waren, zijn gebruikt voor de metingen.

Responsies van afzonderlijke vezels

In een totaal van 89 gehoorzenuwvezels in beschadigde cochlea's vonden we diverse afwijkende drempelkurven (FTCs) die konden worden ingedeeld in 5 klassen. De typering van de FTCs was gedefinieerd op grond van de identifikatie van een CF tip in de kurve en op grond van de drempel van de zogenoemde staart welke de FTC heeft bij frequenties kleiner dan de CF (*Hfdst. V*). Drie van de vijf typen abnormale FTCs vertonen nauwe gelijkenis met de kurven zoals door Liberman geschetst in relatie met bepaalde haarcelbeschadigingen (*Hfdst. I, figuur 6*). Twee typen FTCs vertonen het intrigerende verschijnsel van vergrote gevoeligheid voor lage frequenties, ook wel geduid als de hypersensitieve staart.

De klikresponsies van abnormale vezels vertonen een éénduidige relatie met de typen FTCs. Laten we enkele voorbeelden noemen (*Hfdst. V, figuren 4, 5*). Een vezel met brede frequentieafstemming rond de CF (type II) toont een korte responsduur. Een vezel met dubbele frequentieafstemming (W-vormige FTC, type III), namelijk op CF en op overgevoelige staart, toont zowel een hoogfrequent karakter met een korte responslatentie, als een laagfrequent karakter met een veelheid aan pieken en een sterke variatie met klikpolariteit. Klikresponsies van vezels waar een afstemming rondom CF praktisch verdwenen is (type IV of V), hebben vaak een korte latentie en een zeer grote piekamplitude. Dergelijke afwijkende responspatronen kunnen in grote lijn worden verklaard op grond van de abnormale frequentiekenmerken. Dit is bijvoorbeeld evident in de nauwe overeenkomst tussen de FTC staart en het Fourier amplitude-spectrum van de klik-PSTHs voor vezels met FTC type III of V (*Hfdst. V, figuren 8, 9*). Andere evidentie blijkt uit de simulatieresultaten van een cochleair model. Gegeven een willekeurige FTC produceert dit computermodel neurale klikresponsies. De klik-PSTHs die berekend zijn op grond van type II en type III FTCs, toonden vele aspecten van gelijkenis met de experimentele PSTHs (*Hfdst. VI*).

Eenheidsbijdrage

De eenheidsbijdrage in abnormale vezels is niet in belangrijke mate veranderd ten opzichte van normaal, zij het, dat er een trend tot versmalling van de golfvorm en tot toename in de amplitude van de positieve piek was waar te nemen. Deze minimale veranderingen, die overigens geen korrelatie met de drempelverhoging vertoonden, zijn verwaarloosd in de modelsimulaties.

Samengestelde aktiepotential

De klik-CAPs in lawaaigetraumatiseerde cochlea's vertonen significante afwijkingen van normaal (*Hfdst. VII*). Voorbeelden zijn steile N_1 -amplitude/intensiteitskurven met relatief grote N_1 -amplitudes voor hoge intensiteiten, een abnormaal korte N_1 -latentie, en een grote polariteitsafhankelijkheid van de totale golfvorm. De meeste afwijkingen komen systematisch voor bij bepaalde toonaudiogrammen.

Twee variaties van het empirisch CAP model hebben we uitgevoerd om klik-CAPs te simuleren. Variant M1: als pathologische veranderingen zijn alleen drempelverschuivingen in het toonaudiogram meegenomen in berekening, en de responsies van vezels met verhoogde drempels zijn berekend alsof de klikintensiteit overeenkomstig de drempelverhoging verlaagd was, ofwel de I/O curven van de PSTH parameters zijn verschoven langs de intensiteitsas; variant M2: ook de specifieke afwijkende responspatronen van vezels met verhoogde drempels zijn verdisconteerd. Nota bene: M1 en M2 zijn identiek voor lage intensiteiten waar abnormale vezels niet responderen.

Samengestelde aktiepotentialen zijn nagebootst voor vier oren met verschillende toonaudiogrammen. Uit de modelexercities blijkt dat voor lage intensiteiten de meeste verschijnselen voorspeld kunnen worden op grond van het audiogram. Daarentegen kunnen voor hoge kliknivo's, waar het M1 model namelijk faalt, CAP-afwijkingen niet verklaard worden uit het audiogram. De simulaties met het M2 model waren aanzienlijk beter dan met de M1 variant. Indien juist die typen van abnormale FTCs in het model verdisconteerd werden die voorkwamen in de cochlea waarvoor CAPs werden nagebootst, waren de simulaties optimaal (*Hfdst. VII, tabel II*). Daarenboven toonden in enkele gevallen de berekende golfvormen op zich een treffende gelijkenis met de fysiologische werkelijkheid (*Hfdst. VII, figuren 3, 5*). De konklusie luidt, dat abnormale responsies van afzonderlijke vezels significant bijdragen aan afwijkingen in CAPs op luide klikstimuli.

Slotkonklusies

Abnormale klikresponsies van afzonderlijke gehoorzenuwvezels zijn bepalend voor een simulatie van de gemeten klik-CAP. Dit betekent, dat men op grond van een toonaudiogram en van klik-CAPs zou kunnen afleiden welke typen van abnormale vezelresponsies voorkomen. Om op deze wijze informatie te onttrekken over cochleair dysfunctioneren, is het van belang klikstimuli te gebruiken van hoge intensiteit, omdat daar abnormale vezels responderen. Ook dienen de CAPs voor beide klikpolariteiten

afzonderlijk gemeten te worden. Informatie zou verkregen kunnen worden over de veranderde frequentieselectiviteit in het frequentiegebied waar het gehoor slecht is. Dit soort informatie zou, in geval van toepassing in de klinische electrocochleografie, behulpzaam kunnen zijn om problemen in het spraakverstaan te begrijpen. Als de soort van abnormale frequentieafstemming geschat kan worden, lijkt het zelfs mogelijk te zijn een idee te krijgen van de aard van de beschadiging aan haarcellen.

De EHC is in het algemeen een goede indicator van de aard van de beschadiging aan haarcellen. Het is echter niet mogelijk om de aard van de beschadiging te bepalen op basis van de EHC alleen. Het is daarom belangrijk om de EHC te combineren met andere tests, zoals de audiogram, om een beter beeld te krijgen van de aard van de beschadiging aan haarcellen.

De EHC is een belangrijke test om de aard van de beschadiging aan haarcellen te bepalen. Het is echter niet mogelijk om de aard van de beschadiging te bepalen op basis van de EHC alleen. Het is daarom belangrijk om de EHC te combineren met andere tests, zoals de audiogram, om een beter beeld te krijgen van de aard van de beschadiging aan haarcellen.

De EHC is een belangrijke test om de aard van de beschadiging aan haarcellen te bepalen. Het is echter niet mogelijk om de aard van de beschadiging te bepalen op basis van de EHC alleen. Het is daarom belangrijk om de EHC te combineren met andere tests, zoals de audiogram, om een beter beeld te krijgen van de aard van de beschadiging aan haarcellen.