

Het doel van dit proefschrift

In deze dissertatie wordt een speurtocht beschreven naar de oorsprong van de cochleaire SommatiePotentiaal (SP). Tijdens stimulatie met een zuivere toon (een sinus) kan deze gelijkspanning in de extracellulaire vloeistoffen van de cochlea gemeten worden. Dit maakt de SP per definitie een niet-lineaire receptorpotentiaal. De relatie tussen stimulus en SP is complex: de polariteit van de SP hangt af van zowel de frequentie als de intensiteit van de stimulus. Dit heeft er voor gezorgd dat de SP tot nu toe de minst begrepen cochleaire respons is. Waar komt de SP vandaan, en wat vertelt zij ons over het signaal-transductie proces in de cochlea? Meer kennis omtrent de oorsprong van de SP zou kunnen leiden tot een beter inzicht in cochleaire aandoeningen waarbij een afwijkende SP gemeten wordt, zoals de ziekte van Ménière.

In vivo metingen hebben een paar belangrijke aanwijzingen omtrent de oorsprong van de SP opgeleverd. Ten eerste, de SP is gerelateerd aan de DC receptorpotentialen die in de binnenste en buitenste haarcellen gemeten kunnen worden. Ten tweede, de DC receptorpotentiaal in de haarcel is op zijn beurt weer gerelateerd aan een globale verandering in de weerstand van de haarcelmembraan tijdens stimulatie. *In vitro* metingen aan geïsoleerde haarcellen van de cavia hebben aangetoond dat de membraan verschillende variabele conductanties bevat. De basolaterale membraan van de haarcellen bevat voornamelijk kanalen die specifiek permeabel zijn voor K^+ ionen, de zogenoemde spanningsafhankelijke K^+ kanalen. De conductantie van deze kanalen voor K^+ is niet constant maar hangt af van de spanning over de membraan waarin deze kanalen zich bevinden. De relatie tussen membraan spanning en conductantie is niet lineair, maar kan beschreven worden door een sigmoïdale curve, de Boltzmann curve. De apicale membraan van de haarcel bevat een aspecifiek ionkanaal waarvan de conductantie varieert met de door de stimulus opgewekte afbuiging van de haarbundel. De relatie tussen apicale conductantie en afbuiging van de haarbundel kan ook beschreven worden met een Boltzmann curve. Het apicale kanaal wordt het mechano-elektrische transductie kanaal genoemd.

Zowel de kanalen in de apicale als basolaterale membraan van de haarcel zouden verantwoordelijk kunnen zijn voor de op niet-lineaire wijze aan de stimulus gerelateerde verandering in membraanconductantie, en dus voor het opwekken van de SP. Het doel van deze dissertatie is dan ook het bepalen van de bijdragen van deze niet-lineaire conductanties aan de SP *in vivo*.

Samenvatting van de experimentele resultaten

In de eerste experimenten hebben we ons geconcentreerd op de basolaterale K^+ kanalen. *In vitro* is aangetoond dat elk type K^+ kanaal selectief geblokkeerd kan worden door het toedienen van een blokkeerder aan de vloeistof waarin de geïsoleerde haarcel zich bevindt. Op basis hiervan hebben wij getracht de bijdragen van de verschillende typen K^+ kanalen aan de SP te bepalen door ze selectief uit te schakelen met blokkeerders. De blokkeerders werden m.b.v. de perilymfatische perfusietechniek in de cochlea van de cavia gebracht.

Hoofdstuk 2 beschrijft wat er met de SP gebeurt na het toedienen van de K^+ kanaal blokker tetraethylammonium (TEA). TEA veroorzaakte een geringe afname, zo'n 25%, in de grootte van de SP. Deze afname werd alleen bij de hoogste test-frequenties (8-12 kHz) waargenomen, zowel bij de afleidingen in scala vestibuli als scala tympani. Bij deze stimuluscondities domineren de binnenste haarcellen de SP. Daarom nemen wij aan dat het TEA-gevoelige K^+ kanaal in de binnenste haarcel verantwoordelijk is voor het effect van TEA op de SP. De geringe afname in SP duidt er op dat de bijdrage van het TEA-gevoelige K^+ kanaal aan de SP gering is. Niet-lineaire processen op een andere locatie in de transductie keten, zoals het apicale mechano-elektrische transductie proces, zijn waarschijnlijk van groter belang voor het ontstaan van de SP.

Hoofdstuk 3 rapporteert over de effecten van de K^+ -kanaal blokker 4-aminopyridine (4-AP) op de SP. De effecten van 4-AP op de SP waren tweeledig. 4-AP veroorzaakte een substantiële afname (50%) van de SP wanneer hoog-frequente (8-12 kHz) tonen op een laag tot middelmatig geluidsdruk niveau (70 dB SPL) werden aangeboden. Bij hogere niveaus (> 70 dB SPL) sloeg de afname om in een toename. De toename in SP werd duidelijker bij het verlagen van de stimulusfrequentie, zodat bij de laagste frequenties (2-4 kHz) de toename van de SP bij alle geluidsdruk niveaus voorkwam.

We concludeerden, conform de TEA-resultaten, dat de substantiële afname van de SP het gevolg was van het blokkeren van het 4-AP gevoelige K^+ kanaal in de basolaterale membraan van de binnenste haarcel. Dit wijst erop dat dit 4-AP gevoelige K^+ kanaal een grotere bijdrage levert aan de SP dan het TEA gevoelige K^+ kanaal. Op grond van de eigenschappen van het 4-AP gevoelige kanaal werd echter een geringere bijdrage van dit kanaal verwacht.

De stimuluscondities waarbij de SP toenam zijn ruwweg gelijk aan de condities waarbij de buitenste haarcellen de SP domineren. Hieruit maakten wij

op dat de toename van de SP het gevolg was van het blokkeren van het 4-AP gevoelige K^+ kanaal in de buitenste haarcel. Een toegenomen DC receptorstroom valt echter niet te rijmen met een verminderde basolaterale conductantie. Waarschijnlijk treden er additionele veranderingen op in de fysiologie van de buitenste haarcel die zorgen voor een verhoogde bijdrage van deze cel aan de SP. Blokkeren van het 4-AP kanaal zal ongetwijfeld leiden tot een depolarisatie van de buitenste haarcel. Het is bekend dat depolarisatie van de buitenste haarcel leidt tot een verminderde apicale conductantie. Dus, een geblokkeerd 4-AP kanaal kan zorgen voor een verminderde apicale conductantie. Dit zou de asymmetrie in het apicale mechano-elektrische transductie proces verhogen, en dus ook de SP.

De resultaten van hoofdstuk 2 en 3 laten zien dat de basolaterale K^+ kanalen niet de belangrijkste bron van de SP zijn. Een grotere bijdrage aan de SP kan komen van het apicale transductiekanaal. Omdat blokkeren van dit kanaal het transductie proces stopzet hebben we de conductantie van het apicale transductiekanaal geleidelijk veranderd tijdens het meten van de SP. Wij hebben geprobeerd de conductantie ofwel het werkpunt van de apicale transducer via een tijdelijke verlaging van de endocochleaire potentiaal (EP) te veranderen. Wij kwamen op dit idee omdat bekend was dat de apicale conductantie van de buitenste haarcel in rust afhankelijk is van de membraanpotentiaal, en de membraanpotentiaal afhangt van de EP. De EP werd tijdelijk onderdrukt door cavia's een intraveneuse injectie met furosemide te geven.

Hoofdstuk 4 beschrijft de effecten van de EP onderdrukking op de SP en de aan de SP verwante tweede harmonische component van de cochleaire microfonie ($2F_0$). Het verschuiven van het werkpunt van de cochleaire transducer middels een reversibele EP onderdrukking veroorzaakte drastische veranderingen in de SP. De meest opvallende verandering was een ommekeer in de polariteit van de SP. Op hetzelfde moment dat de SP van teken veranderde, bereikte de amplitude van $2F_0$ een absoluut minimum en de fase van $2F_0$ verschoof 120° . De veranderingen in SP en $2F_0$ kunnen verklaard worden door een verschuiving in het werkpunt van een sigmoïdale Boltzmann-achtige overdrachtsfunctie. Wij schrijven de sigmoïdale overdrachtsfunctie toe aan het apicale mechano-elektrische transductiekanaal.

De gevoeligheid van de SP voor een verandering in het werkpunt van de apicale transducer impliceert dat de oorsprong van de SP ligt bij deze apicale niet-lineariteit.

Een andere manier om de bijdrage van de conductanties in de membraan aan de SP te schatten is via de ontwikkeling van een cochleair

model. Wij zijn uitgegaan van het wiskundige model dat Peter Dallos ontwikkelde om de elektrische activiteit in een sectie van het orgaan van Corti te kunnen simuleren. Met dit model is het mogelijk om zowel de intra- als de extracellulaire receptorpotentialen te berekenen. De eerste wijziging die we aanbrachten in het model was het incorporeren van de eigenschappen van het apicale transductiekanaal. Daarna hebben we de spannings- en tijdsafhankelijke eigenschappen van de basolaterale K^+ kanalen ingebouwd.

Hoofdstuk 5 laat zien dat de apicale niet-lineariteit de DC receptorpotentiaal genereert en de basolaterale niet-lineariteiten de DC receptorpotentiaal modifieren. Na het implementeren van een Boltzmann-functie, om de overdrachtsfunctie van het apicale transductiekanaal te simuleren, waren we in staat om realistische intra- en extracellulaire DC receptorpotentialen op te wekken. De grootte en polariteit van de SP hingen sterk af van het werkpunt van de Boltzmann-functie, ofwel van het percentage apicale kanalen dat open is tijdens rust. Kozen we voor 9% activatie, een waarde die *in vitro* is gevonden, dan zorgde sinusoidale stimulatie voor een grote positieve DC potentiaal in de haarcel en een negatieve DC potentiaal in de scala media (de respons in scala vestibuli is rechtstreeks gekoppeld aan die in scala media).

Na een paar milliseconden nam de conductantie van de basolaterale K^+ kanalen in ons model toe. De toename in basolaterale conductantie zorgde ervoor dat de potentiaal in de cel verschoof in de richting van de negatieve K^+ evenwichtspotentiaal. Omdat de potentiaal in de haarcel via het apicale transductiekanaal gekoppeld is aan de potentiaal in scala media verschoof ook deze potentiaal in negatieve richting. De verschuiving van de potentialen in de negatieve richting tijdens stimulatie zorgde voor een afname van de positieve DC respons in de cel en een geringe toename in de grootte van de SP. Kortom, de K^+ kanalen modificeerden de DC receptorpotentiaal die opgewekt werd door het apicale transducer kanaal.

Wanneer wij één van de basolaterale K^+ kanalen in ons model uitschakelden dan veroorzaakte dat een geringe afname van de SP, vergelijkbaar met het effect van TEA op de SP. In hoofdstuk 3 vermeldde wij dat het blokkeren van het 4-AP gevoelige K^+ kanaal in de binnenste haarcel verantwoordelijk was voor de forse afname van de SP bij stimulatie met hoog-frequente tonen van laag niveau. Het model voorspelt echter een veel geringere afname van de SP na blokkeren van het 4-AP kanaal. Wij zijn er nog steeds van overtuigd dat de forse afname van de SP na het toedienen van 4-AP te maken heeft met een verminderde bijdrage van de binnenste haarcel aan de SP. Maar, gebaseerd op de voorspelling van het model, denken we nu dat nog andere factoren een rol spelen bij deze verminderde bijdrage.

In hoofdstuk 3 rapporteerden wij dat de effecten van 4-AP op de SP frequentie- en niveau afhankelijk waren. Bij het aanbieden van hoog-frequente tonen op een laag niveau zorgde 4-AP voor een forse afname van de SP. Bij het aanbieden van laag-frequente tonen en hoog-frequente tonen op een hoog niveau zorgde 4-AP voor een toename van de SP. De afname in SP schreven wij toe aan een verminderde bijdrage van de binnenste haarcel, en de toename aan een verhoogde bijdrage van de buitenste haarcel. Volgens ons kon de verhoogde bijdrage van de buitenste haarcel na perfusie met 4-AP verklaard worden door depolarisatie van de membraanpotentiaal en de daarop volgende mechanische veranderingen. De terugkoppeling van elektrisch naar mechanisch wordt omgekeerde transductie genoemd en is uniek voor de buitenste haarcel. Dit proces van omgekeerde transductie zit nog niet in ons model. Het zou interessant zijn om na te gaan of we met het inbouwen van omgekeerde transductie in staat zijn de vergrote SP, na het toedienen van 4-AP, te verklaren. Of 4-AP het werkpunt van de buitenste haarcel verandert kan experimenteel onderzocht worden door het karakteriseren van veranderingen in distorsie-produkt-otoakoestische-emissies na toediening van 4-AP. Distorsie-produkt-otoakoestische-emissies zijn namelijk een uiting van het omgekeerde transductieproces in de buitenste haarcel.

Het is bekend dat een verandering in het werkpunt van de buitenste haarcel resulteert in een forse afname van de DC receptorpotentiaal in de nabijgelegen binnenste haarcellen. Dit soort resultaten onderbouwt het concept dat de buitenste haarcellen energie terugvoeren naar de beweging van het basilair membraan, via omgekeerde transductie, en zo de respons van de nabijgelegen binnenste haarcellen versterken. Daarom willen we nog modelmatig onderzoeken of de verminderde bijdrage van de binnenste haarcellen aan de SP, bij stimulatie met hoog-frequente tonen op een laag niveau, een gevolg is van een verandering in het werkpunt van de buitenste haarcel.