

Wpływ niedokrwienia pochodzącego z tętnic kręgowych na ultrastrukturę komórek słuchowych zewnętrznych u świnek morskich

The influence of experimental ischemia on the outer hair cells ultrastructure in guinea pigs

JUREK OLSZEWSKI ^{1/}, JAROSŁAW MIŁOŃSKI ^{1/}, MIROŚLAW STARNAWSKI ^{2/}

^{1/} Klinika Otolaryngologiczna Instytutu Chirurgii WAM ul. Żeromskiego 113, 90-546 Łódź

^{2/} Oddział Laryngologiczny Powiatowego Szpitala Specjalistycznego, ul. Staszica 4, 37-450 Stalowa Wola

Wprowadzenie. Komórki słuchowe zewnętrzne są jednymi z najbardziej wrażliwych komórek ustroju człowieka na niedotlenienie, a ich zniszczenie jest nieodwracalne.

Cel. Celem pracy była ocena jakościowa i ilościowa zmian ultrastrukturalnych komórek słuchowych zewnętrznych po doświadczalnym niedokrwieniu, spowodowanym drażnieniem tętnicy kręgowej u świnek morskich.

Materiał i metody. W grupie doświadczalnych zwierząt, po znieczuleniu ogólnym Ketalem i Fentanylem operacyjnie wprowadzono do wyrostka poprzecznego II kręgu szyjnego klips naczyniowy drażniący spłot okołotętniczy tętnicy kręgowej. Ocenę ultrastrukturalną tkanek ślimaka przeprowadzono w 50 dobie od zabiegu. Porównywano zmiany jakościowe komórek rzęsatych oraz ilościowe mitochondriów tych komórek u świnek doświadczalnych i kontrolnych, u których stosowano jedynie znieczulenie ogólne.

Wyniki. Stwierdzono zmiany niedokrwienne komórek słuchowych zewnętrznych po stronie drażnienia tętnicy kręgowej pod postacią wielopokładowych ciałek lamelarnych, częściowo rozdętych. Rzęski tych komórek były zwykle maczugowato rozdęte. W grupie doświadczalnej obserwowano zmniejszenie liczby pęcherzyków synaptycznych i mitochondriów. Średnie pole powierzchni przekroju mitochondriów oraz względna objętość kompartmentu zewnętrznego były istotnie większe u świnek doświadczalnych niż kontrolnych.

Wnioski. Drażnienia spłotu okołotętniczego tętnicy kręgowej powoduje możliwe zarówno do oceny jakościowej jak i ilościowej zmiany niedokrwienne komórek słuchowych zewnętrznych u świnek morskich.

Otolaryngologia, 2003, 2(1), 40-43

Słowa kluczowe: badania ultrastrukturalne, tętnice kręgowe, czynność komórek słuchowych zewnętrznych, świnki morskie

Introduction. The outer hair cells of the cochlea are very sensitive to hypoxia and their damage is irreversible.

Aim. The aim of the study was to evaluate qualitative and quantitative ultrastructural changes of outer hair cells due to experimental ischemia after clipping vertebral arteries.

Material and methods. The experimental guinea pigs were anaesthetized with Ketalar and Fentanyl, and after the incision of neck skin muscles, the vertebral artery was exposed and a vascular clip was inserted into the foramen of the transverse process of the 2nd cervical vertebra. The ultrastructural changes in the cochlea were assessed 50 days after the surgery. The qualitative changes of the outer hair cells and quantitative changes to their mitochondria in the experimental animals were compared to the control guinea pigs that underwent anesthesia only.

Results. The ischemic changes of the outer hair cells were found on the operated side. They consisted of the presence of multilayer partly expanded lamellar bodies. Stereocilia of hair cells were blown up and club-like in the shape. A decrease in the number of the synaptic vesicles and mitochondria in comparison to the control group was observed. The mean section area of mitochondria and their relative volume were significantly greater in the experimental guinea pigs than in the controls.

Conclusions. Prolonged irritation of periarterial plexus of vertebral artery causes ischemic changes of outer hair cells, that could be assessed both qualitatively and quantitatively.

Otolaryngologia, 2003, 2(1), 40-43

Key words: ultrastructural studies, ischemia, vertebral arteries, function of external hair cells, guinea pigs

Mechanizmy niedokrwienia ucha wewnętrznego nie są do końca wyjaśnione pomimo przeprowadzenia wielu prac, zarówno doświadczalnych jak i klinicznych [1,2,3,4,5,6,7]. Glassenapp [1] stwierdził, że jednostronne zamknięcie tętnicy kręgowej nie powoduje zmian morfologicznych po 1-3 dniach od wykonanego zabiegu. Perlmann i wsp. [5] w swych badaniach stwierdzili natomiast brak wpływu przecięcia nerwów współczulnych na sprawność narządu spiralnego. Największe rozbieżności badawcze dotyczą wpływu układu wegetatywnego (w przypadku zmian zwyrodnieniowych odcinka szyjnego kręgosłupa) na czynność ucha wewnętrznego.

We wcześniejszych doniesieniach [8,9] badano wpływ jednostronnego drażnienia lub podwiązania tętnicy kręgowej u świnek morskich na słuchowe potencjały wywołane z pnia mózgu oraz jakościowe zmiany ultrastrukturalne narządu spiralnego oceniane w mikroskopie elektronowym.

Celem niniejszej pracy była ocena jakościowa i ilościowa zmian ultrastrukturalnych komórek słuchowych zewnętrznych zachodzących po doświadczalnym niedokrwieniu, spowodowanym drażnieniem tętnicy kręgowej u świnek morskich.

MATERIAŁ I METODYKA

Materiał badań stanowiło 20 świnek morskich obu płci, o masie 250-300g, które podzielono na dwie grupy (po 10 świnek):

- I – kontrolną – którą znieczulano jedynie Ketalarem w dawce 100 mg/kg i Fentanylem 0,1 cm³/kg),
- II – badaną – w której po znieczuleniu Ketalarem i Fentanylem w tej samej dawce, jak w grupie kontrolnej, i nacięciu skóry oraz mięśni karku odstawiano prawą lub lewą tętnicę kręgową, a następnie wprowadzano do wyrostka poprzecznego II kręgu szyjnego klips naczyniowy, drażniący spłot okołotętniczy. Czas trwania znieczulenia był jednakowy i wynosił około 30 min.

W 50 dobie po zabiegu świnki usypiano dootrzewnym podaniem 35% roztworu wodzianu chloralu (w dawce 1 ml/kg masy ciała). Następnie, po otwarciu klatki piersiowej dokonywano perfuzji dosercowej. Łożysko naczyniowe przepłukiwano przez około 2-3 minuty 3,6% roztworem aldehydu glutarowego pod ciśnieniem 110 mm Hg. Czynności od momentu otwarcia klatki piersiowej do rozpoczęcia perfuzji wykonywano w czasie nie dłuższym niż 3 minuty. Po perfuzji naczyniowej dokonywano perfuzji doślimakowej. W tym celu otwierano szczyt ślimaka i wstrzykiwano pod niewielkim ciśnieniem (20 cm H₂O) 3,6% roztwór aldehydu glutarowego w 0,113 M buforze kakodylanowym. Następnie metodą mikropreparowania obustronnie pobierano do

badania mikroskopowo-elektronowych ślimak błoniasty. Po czym w sposób typowy [10,11,12] preparaty utrwalano w 1% roztworze czterotlenku osmu oraz zatapiano w eponie i krojono na ultramikrotomie LKB III. Zmiany jakościowe oceniano na podstawie preparatów ultracienkich komórek słuchowych zewnętrznych, które oglądano w mikroskopie elektronowym Philips EM 300 w stałym powiększeniu 15000x.

Badania morfometryczne dotyczyły mitochondriów, zawartych na 100 elektronogramach z każdej grupy [13,14,5]. Oceniano pole powierzchni przekroju mitochondriów w piks², za pomocą analizatora obrazu Microscan oraz objętość względną kompartmentu zewnętrznego mitochondriów w oparciu o siatkę kwadratową Weibla [15], o gęstości 53,8 punkta/ m² i następujący wzór:

$$V_{oc} = \frac{P_{oc}}{P_m} \times 100\%$$

gdzie:

V_{oc} – objętość względną kompartmentu zewnętrznego,

P_{oc} – liczba punktów mieszcząca się w kompartmentie zewnętrznym,

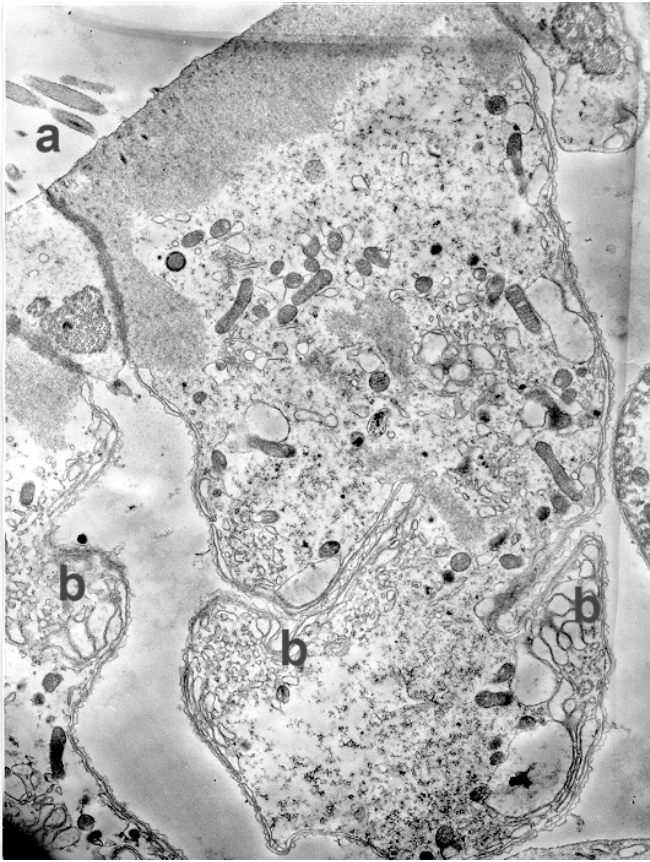
P_m – profil mitochondriów.

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej, oceniając wartości minimum, maksimum, średnią arytmetyczną (\bar{x}) oraz odchylenie standardowe (SD). Dla porównania wartości średnich w grupach zastosowano test Manna-Whitney'a. Różnice przyjęto za statystycznie znamienne przy $p < 0,05$.

WYNIKI

W badaniach jakościowych mikroskopowo-elektronowych u świnek morskich grupy II stwierdzono nieco większe zmiany niedokrwienne komórek słuchowych zewnętrznych po stronie drażnienia tętnicy kręgowej, niż po stronie przeciwnej i występowały one pod postacią: w biegunie receptorowym, pod błoną komórkową oraz wewnątrz komórki występowały wielopokładowe ciała lamelarne w postaci cystern, częściowo rozdętych (ryc. 1). Ciała te niekiedy odpychały mitochondria, które w grupie kontrolnej najczęściej położone były w pobliżu błony komórkowej. Rzęski komórek słuchowych zewnętrznych były zwykle maczugowato rozdęte. Ponadto w grupie badanej stwierdzono w synapsie dośrodkowej komórek słuchowych zewnętrznych obrzmienie mitochondriów w koltbach synaptycznych. Nie obserwowano tych zmian w grupie kontrolnej.

Wyniki badań morfometrycznych, dotyczących pola powierzchni przekroju mitochondriów u badanych świnek przedstawiono w tabeli I.



Ryc. 1. Elektronogram komórek słuchowych zewnętrznych u świnki morskiej grupy II (po stronie drażnienia tętnicy kręgowej). Widoczne maczugowato rozdęte włoski komórek słuchowych zewnętrznych (a) i ciała lamelarne w postaci cystern (b). Pow. ok. 15000x

Tabela I. Pole powierzchni przekroju mitochondriów komórek słuchowych zewnętrznych u badanych świnek (P – strona prawa, L – strona lewa, A – strona drażniona, B – strona przeciwna)

Grupa	Pole powierzchni przekroju mitochondriów w piks ²								Liczba świnek
	min		max		X		SD		
	P	L	P	L	P	L	P	L	
I - kontrolna	114,0	136,0	1406,0	1572,0	362,1	392,6	235,9	212,7	10
II - badana	A	B	A	B	A	B	A	B	10
	257,0	96,0	1320,0	2124,0	622,3	518,6	326,1	414,0	

I tak średnie pole powierzchni przekroju mitochondriów komórek słuchowych zewnętrznych w grupie kontrolnej wynosiło: $362,1 \pm 235,9$ piks² po stronie prawej i $392,6 \pm 212,7$ piks² po stronie lewej, natomiast w grupie II, odpowiednio $622,3 \pm 326,1$ piks² po stronie drażnienia tętnicy kręgowej i $518,6 \pm 414,0$ piks² po stronie przeciwniej.

Z kolei objętość względna kompartmentu zewnętrznego mitochondriów w grupie I (tab. II) przedstawiała się następująco: $0,1523 \pm 0,0794\%$ po stronie prawej i $0,1496 \pm 0,0837\%$ po stronie lewej, a w grupie II $0,2176 \pm 0,0624\%$ po stronie drażnienia tętnicy kręgowej i $0,1935 \pm 0,0735\%$ po stronie przeciwniej.

Tabela II. Objętość względna kompartmentu zewnętrznego mitochondriów komórek słuchowych zewnętrznych u badanych świnek (P – strona prawa, L – strona lewa, A – strona drażniona, B – strona przeciwna)

Grupa	Objętość względna kompartmentu zewnętrznego w %								Liczba świnek
	min		max		X		SD		
	P	L	P	L	P	L	P	L	
I - kontrolna	0,0436	0,0396	0,1824	0,1721	0,1523	0,1496	0,0796	0,0837	10
II - badana	A	B	A	B	A	B	A	B	10
	0,0524	0,0473	0,2574	0,2389	0,2176	0,1935	0,0634	0,0735	

Stwierdzono znamienne statystycznie różnice wartości, zarówno średniego pola powierzchni przekroju mitochondriów, jak i objętości względnej kompartmentu zewnętrznego między grupą I i II ($p < 0,05$) oraz między stroną drażnienia a przeciwną w grupie II ($p < 0,05$).

DYSKUSJA

Dane z piśmiennictwa [6] wskazują na to, że ucho wewnętrzne świnki morskiej (podobnie jak i człowieka) posiada „doskonałe” mechanizmy autoregulacyjne przepływu krwi. Autoregulacja przepływu krwi w pniu mózgu nie zawsze jednak zabezpiecza ucho wewnętrzne przed niedokrwieniem. Potwierdzeniem tego faktu są uzyskane jakościowe i ilościowe wyniki badań ultrastrukturalnych.

Wykazano bowiem, że u świnek, po jednostronnym drażnieniu splotu tętnicy kręgowej (grupa II) występują jakościowe i ilościowe zmiany niedokrwienne komórek słuchowych zewnętrznych, większe po stronie drażnienia.

W badaniach jakościowych histopatologicznych u świnek morskich grupy II stwierdzono: w komórkach słuchowych zewnętrznych wielopokładowe, częściowo rozdęte ciała lamelarne oraz rozdęcie rzęsek i obrzmienie mitochondriów. Zmian takich nie stwierdzono u świnek grupy kontrolnej [2,12].

Ultrastrukturalne badania ilościowe ultrastrukturalne dotyczyły jedynie wybranych parametrów morfometrycznych mitochondriów [13,14]. Różnice średniego pola powierzchni przekroju mitochondriów, jak i objętości względnej kompartmentu zewnętrznego u świnek morskich grupy II w porównaniu do grupy kontrolnej były statystycznie znamienne.

Wykonany w niniejszej pracy zabieg na tętnicy kręgowej może odpowiadać w niektórych założeniach modelowi doświadczalnemu tzw. „migreny szyjnej”. Opracowanie doskonałego modelu doświadczalnego „migreny szyjnej” nie jest możliwe, ponieważ etiologia tego zespołu jest bardzo złożona [8,9].

Reasumując, otrzymane wyniki badań jakościowe jak i ilościowe, uzyskane w mikroskopie elektronowym, wskazują na zmiany niedokrwienne komórek słuchowych zewnętrznych u świnek morskich, będące następstwem długotrwałego drażnienia splotu okołotętniczego tętnicy kręgowej.

Piśmiennictwo

1. Glassenapp GB. Zaburzenia ukrwienia obszaru *arteria vertebralis* i jego wpływ na narząd Cortiego w doświadczeniach na zwierzętach. *Otolaryngol Pol* 1966; 20 (1): 35-36.
2. Hall JG. The cochlea and the cochlear nuclei in neonatal asphyxia. A histological study. Universitetsforlaget, Oslo 1965.
3. Mura M, Sando J, Hirsch BE. Analysis of spiral ganglion cell populations in children with normal and pathological ears. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2002; 111 (12): 1059-1065.
4. Orita Y, Sando J, Mura M. Cochleosaccular pathology after perinatal and postnatal asphyxia; histopathologic findings. *Otol Neurotol* 2002; 23 (1): 34-38.
5. Perlmann HB, Kimura RS, Fernandez C. Experiments on temporary obstruction of the internal auditory artery. *Laryngoscope* 1959; 69: 591-613.
6. Wayoff M. Ischemie et oreille interne. *Cahiers d'Oto-Rhino-Laryngol* 1987; 22: 9-16.
7. White JA, Burgess BJ, Hell RD. Pattern of degeneration of the spiral ganglion cell and its processes in the C57BL/6J mouse. *Hear Res* 2000; 141 (1-2): 12-18
8. Olszewski J. Experimental ischemia of the vertebral artery and its impact on the brain stem auditory evoked responses in guinea pigs. *Folia Morphol (Praga)* 1990; 38(2): 134-138.
9. Olszewski J. Influence of experimental ischemia on the acoustic organ of guinea pigs in electron microscopic studies. *Gegenbaurs morphol Jahrb (Leipzig)* 1990; 136 (3): 243-252.
10. Anniko M, Lundquist PG. The influence of different fixative and osmolality on the ultrastructure of the cochlear neuro-epithelium. *Arch Otolaryngol* 1977; 218: 67-68.
11. Drury RAB, Wallington EA. *Histological technique*. Carleton's, Oxford - New York 1967.
12. Iurato S. Submicroscopic structure of the membranous labyrinth. The epithelium of Corti's organ. *Z Zellforsch* 1961; 53: 259-265.
13. Cieciora L, Rydzyński K, Klitończyk W. Stereologic studies on mitochondrial configuration in different organs of the rat. *Cell Tissue Res* 1979; 196: 347-360.
14. Cieciora L, Rydzyński K, Klitończyk W, Haraźna J. Stereology of mitochondria in different metabolic steady states. *Acta Med Pol* 1977; 18: 291-292.
15. Weibel ER, Bolender RP. *Stereological techniques for electron microscopic morphometry*. W: Principles and techniques of electron microscopy. Biological application. MA Hayat, Van Nostrand Reinhold Company, New York 1973.