

DUKTUS KOKLEARİSTE SPİRAL LİMBUSTA YER ALAN DENDRİTİK FİBROBLASTLARIN MORFOLOJİSİ: FARELERDE TARAMALI VE GEÇİRİMLİ ELEKTRON MİKROSKOPİK İNCELEME

DENDRITIC FIBROBLASTS IN THE SPIRAL LIMBUS OF THE MOUSE COCHLEAR DUCT : A SCANNING AND TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPIC STUDY

Dr. Babür KÜÇÜK (*),

ÖZET: Koklear duktusta, spiral limbus stromasında yer alan fibroblastlar bağ dokusu içine çok sayıda sitoplazmik uzantılar vermektedir. Bu çalışmada, spiral limbus bağ dokusu kimyasal yöntemle eritilerek fibroblastların yüzeyleri ortaya çıkarılmış ve fibroblastların spiral limbustaki şekil ve organizasyonları taramalı elektron mikroskopu ile incelenmiştir. Fibroblastların çok sayıda dendritik uzantılar içerdiği ve bunların dallanıp komşu dendritlerle anastomoz yaparak, limbus stromasında ve işitme dişlerine uzanan 3-boyutlu hücresel bir retikülüm oluşturduğu gözlenmiştir. Geçirimli elektron mikroskopik incelemede dendritlerin arasında bol 'gap junction' görülmüştür. Dendritik fibroblastlar dişlerin ve limbusun iskeletini oluşturabilirler ve intersellüler transport sistemleri ile kokleamın kimyasal fonksiyonlarında rol oynayabilirler.

Anahtar Sözcükler: Duktus koklearis, Spiral limbus, fibroblast, taramalı elektron mikroskopu.

SUMMARY: In the cochlear duct, spiral limbus contains many fibroblasts that give numerous cytoplasmic projections into the connective tissue of the limbus. In this study, using chemical maceration techniques, we dissolved the connective tissue of the limbus, exposed the surfaces of the fibroblasts and examined their shape and arrangement in the limbus by scanning electron microscopy. The fibroblasts possessed several dendritic projections that branched and anastomosed with those of neighbouring fibroblasts, thus forming a three-dimensional cellular reticulum in the auditory teeth and spiral lumbus. Transmission electron microscopy revealed presence of many gap junctions between the dendritic processes. Dendritic fibroblasts in the spiral limbus, may act as a skeleton for the auditory teeth and the entire spiral limbus and take part in the local chemical and physiological functions of the cochlea.

Key Words: Cochlear duct, spiral limbus, fibroblast, scanning electron microscopy.

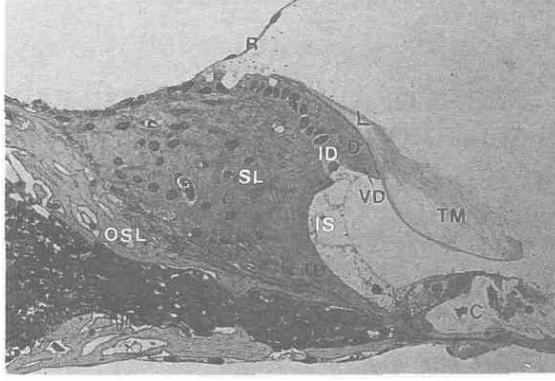
GİRİŞ

Duktus kokleariste, primer osseöz spiral lamina üzerinden dalga şeklinde yükselen spiral limbusun, Reissner membranının tabanı ile vestibüler dudağın serbest kenarı arasında kalan konveks yüzeyinde işitme dişleri (dentes auditiva) ve interdental hücreler bulunur ve üzerinde tektoriyal membranım limbal kısmı oturur (Resim I). Tektoriyal membranım serbest parçası spiral limbustan Corti organının üzerinde uzanarak duyu hücrelerindeki stereosilialara dokunmakta ve vibrasyonlar sırasında bu hücreleri stimüle etmektedir. Sıkı bağ dokusundan oluşan spiral limbus ve dişler, tektoriyal membrana ve bu membranı sek-

rete ettiği inanan interdental hücrelere mekanik destek sağlarlar (5,7). Spiral limbusun osseöz spiral laminaya komşu olan bazal kısmında çok sayıda fibroblast vardır ve bağ dokusu stroma içine ve işitme dişlerine bir çok sitoplazmik uzantılar gönderirler (9). Bu fibroblastların, spiral limbus ve dişlerin mekanik desteğini sağlayan sıkı bağ dokusu matriksinin yapım ve idamesinde ve sıvı transportunda rol oynadıkları düşünülmektedir (9), ancak fibroblastların şekilleri, spiral limbustaki 3-boyutlu organizasyonları ve fonksiyonları hemen hiç bilinmemektedir. Bu çalışmada, fare kokleasında bağ dokusu matriksi kimyasal yöntemlerle eritip, hücresel elemanları ortaya çıkararak, spiral limbus fibroblastlarının 3-boyutlu morfolojisini taramalı elektron mikroskopu ile inceledik. Geçirimli (transmisyon) elektron mikroskopisi

(*) Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi KBB Anabilim Dalı,
ANKARA

ile fibroblastlar arasındaki ilişkileri ve spiral limbusun fonksiyonlarındaki rolünü anlamaya çalıştık.



Resim 1: Spiral limbusun ışık mikroskopik yan kesiti. Spiral limbus stroması (SL), Vestibüler dudak (VD), timpanik dudak (TD), iç spiral sulkus (IS), interdental hücreler (ID), işitme dişleri (D), Reissner membranı (R), osseöz spiral lamina (OSL), tektoriyal membran (TM) ve limbil parçası (L), Corti organı (C).

YÖNTEM VE GEREÇLER

Çalışmada 20 tane 3-6 aylık dd-fareden 40 tane koklea kullanılmıştır.

Taramalı elektron mikroskopisi

Bu çalışmada aşağıda yazılan kimyasal yöntemleri kullanarak, önce spiral limbus bağ dokusu yüzeylerini ortaya çıkarmak için tektoriyal membran ve Corti organını erittik, daha sonra interdental hücreler ve fibroblastları ortaya çıkarmak için spiral limbus ve işitme dişlerinin bağ dokusunu erittik ve sonunda interdental hücreleri stereomikroskop altında mekanik yöntemlerle kaldırarak fibroblastları taramalı elektron mikroskop altında görüntüledik.

Spiral limbus bağ dokusu yüzeylerinin ortaya çıkarılması (7): Fare koklealarından 5 tanesi %1 Borik Asit içinde 12 saat bırakıldıktan sonra stereomikroskop altında kokleaların dış duvarı kaldırıldı, spesimenler %2 Osmik asitte de 48 saat bırakıldıktan sonra etanolde dehidrate edildi ve 2-3 dakika süre ile bir ultrasonik temizleyicide muamele edilerek isoamil asetatı konuldu. Kritik noktada kurutulduktan sonra platin-paladium ile kaplandı ve taramalı elektron mikroskop ile gözlem yapıldı.

Spiral limbus fibroblast yüzeylerinin ortaya çıkarılması (12): Fare koklealarından 30 tanesi %2 glutaraldehit içerisinde 48 saat fikse edildikten sonra

%30 KOH solüsyonu içerisinde 62 derece santigratta 8 dakika bırakıldı. Daha sonra 37 derecede 1/1000 kollogenaz solüsyonunda 24 saat tutulduktan sonra %2 osmik asit ile 48 saat boyandı ve yukarıda yazıldığı gibi kurutulup kaplanarak taramalı mikroskopi yapıldı.

Geçirimli elektron mikroskopisi

Fare koklealarından 5 tanesi tamponlanmış %2 glutaraldehit solüsyonu içerisinde 2 saat fikse edildikten sonra dekalsifikasyon için %5 EDTA çözeltisinde 24 saat bırakıldı ve %2 osmik asit ile postfiksasyon yapıldıktan sonra %0.5 uranil asetatı 12 saat boyandı. Daha sonra etanolde dehidrate edilerek epoksi resine gömüldü.

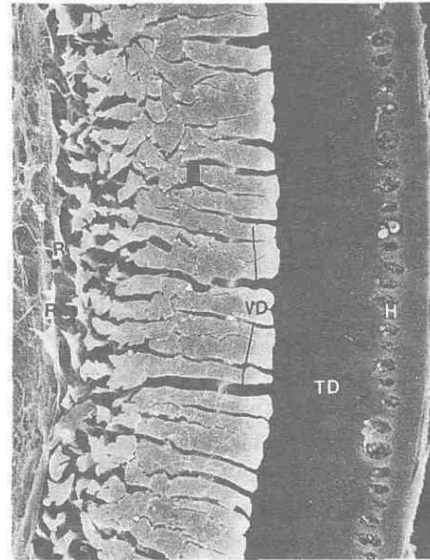
Kokleanın modiolar eksenine paralel ultra ince kesitler alındı ve kurşun sitrat ile boyandıktan sonra geçirimli elektron mikroskopta incelendi.

BULGULAR

Taramalı elektron mikroskopisi

Spiral limbusun bağ dokusu yüzeyleri (7):

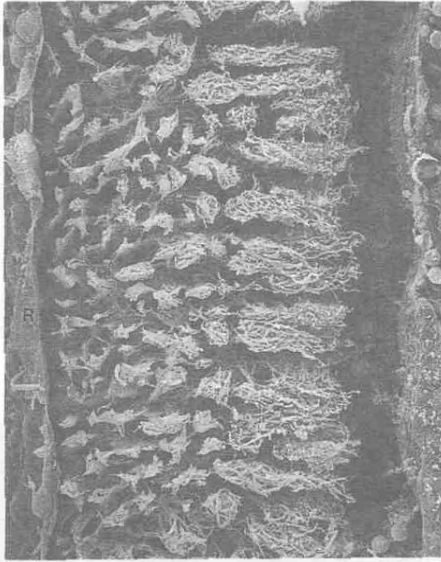
Duktus koklearisin epitelial elemanları ve tektoriyal membran kimyasallarla kaldırıldıktan sonra spiral limbusunun bağ dokusu yüzeyleri koklear spiral boyunca ortaya çıkarıldı (Resim 2).



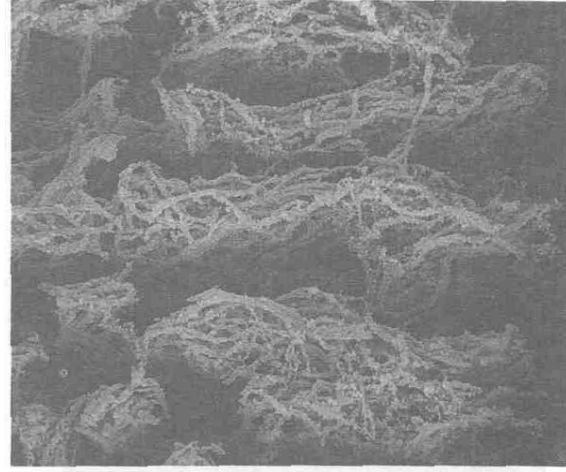
Resim 2: Spiral limbusun üstten görüntüsü. Limbusun yüzeyinde tektoriyal membran ve interdental hücreler kaldırılmış ve bağ dokusu yüzeyleri ortaya çıkarılmıştır. İşitme dişleri vestibüler dudakta (VD) piano tuşları gibi dizilmiştir. Reissner membranı (R) tabanına doğru dişler yıldız şeklinde ve seyrekler. Timpanik dudak (TD), habenular delikleri (H). Mikroskoptaki büyütme x 300

Spiral limbusun vestibüler dudağı, iç spiral sulkus ve timpanik dudağın bağ dokusu düzgün bir yüzeye sahipti. Vestibüler dudağın serbest kenarı ile Reissner membranının tabanı arasında yer alan işitme dişlerinin yüzeyleri, iç ve dış yanda farklı morfolojik özellikler gösterdi. Vestibüler dudağın dış yarısındaki dişlerin apikal yüzeyleri ince-uzun bir plaka tarzında radial konumda yerleşmişti ve birbirine paralel, piano tuşlarına benzeyen bir dizilim gösteriyorlardı; iç sulkustan bakıldığında gövdeleri apikal yüzeyden inceleterek inen yassı bir plaka şeklinde idi; dişler sık aralıklı yerleşerek aralarında interdental hücreler için az boşluk bırakmışlardı. İç yarıda yer alan dişlerin ise küçük, yıldız şeklinde üst yüzeyleri ve ince, yuvarlak gövdeleri vardı; aralarında interdental hücreler için geniş boşluklarla seyrek yerleşmişlerdi.

Spiral limbusun stromal hücreleri: Bağ dokusu liflen ve matris eritildikten sonra koklear spiral boyunca spiral limbus stromasında ve işitme dişlerinde yer alan hücresel elemanların tüm yüzeyleri ortaya çıktı (Resim 3-7). Reissner membranı tabanı ve vestibüler dudağın serbest kenarı arasında aynen işitme dişlerinin şekil ve dizilimini gösteren fibroblastlara ait retiküler yapıda projeksiyonlar görüldü (Resim 3); yüksek büyütmede, bu projeksiyonların yüzeyinde fibroblastların dendrite benzeyen sitoplazmik uzantılarından oluşan 3-boyutlu bir ağ görüldü (Resim 4).



Resim 3: Spiral limbusun üstten görüntüsü. Limbusun yüzeyinde interdental hücreler ve bağ dokusu elemanları kaldırılmış ve fibroblastlara ait hücresel elemanlar ortaya çıkarılmıştır. Reissner membranı tabanı (R) ile vestibüler dudağın serbest kenarı arasında fibroblastlara ait retiküler yapıda projeksiyonlar işitme dişlerinin şekil ve dizilimine uymaktadırlar. Mikroskoptaki büyütme x 400

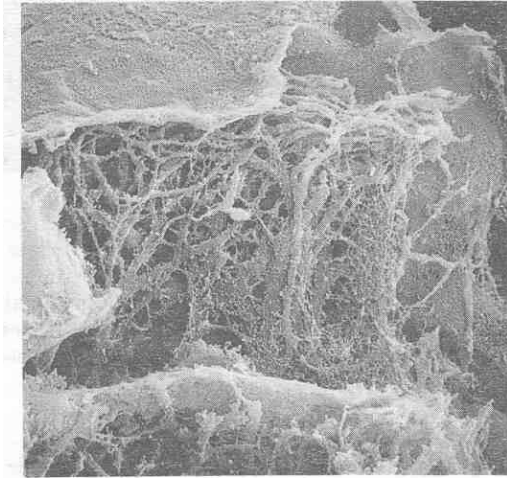


Resim 4: Vestibüler dudaktaki işitme dişlerindeki sellül retikülümün büyütülmüş üst-oblik görüntüsü. Projeksiyonların yüzeyinde fibroblast dendritlerinin dişlerin apikal plakalarında oluşturduğu 3-boyutlu ağ görülmektedir. Dendritler genellikle radikal uzanmakta ve birbirleri ile pek çok ince dala anastomoz yapmaktadırlar. Mikroskoptaki büyütme x 1400

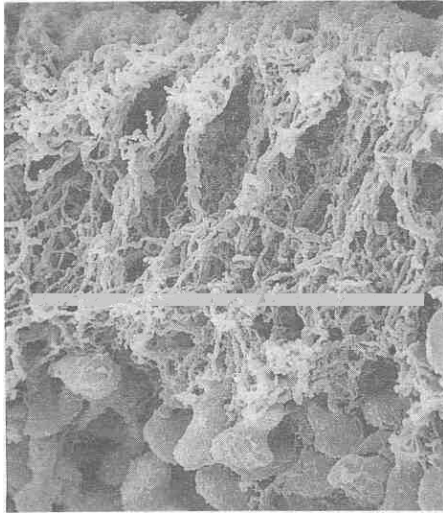
Projeksiyonların dişlere ait apikal yüzeylerinde, ağı oluşturan dendritler yassı ve yuvarlak, genellikle Reissner membranı tarafından vestibüler dudağın serbest kenarına doğru radial olarak uzanmakta idiler ve birçok yan dallar vererek bu dallar vasıtası ile birbirleri ile anastomozlar yaptıkları görüldü. Projeksiyonlara yandan bakıldığında (Resim 5), apikal yüzeydeki ağdan limbusun bazaline dikey doğrultuda uzanan daha kalın ve yassı dendritik uzantılar görüldü; bu uzantılarda birçok ince ve kısa dallarla birbirleri ile anastomoz yapmakta idi. Bu dendritler osseöz spiral laminaya yakın daha bazal kısımlarda birleşerek fibroblastların gövdelerine bağlanan kalın, kısa trunkuslar oluşturdular (Resim 6,7). Fibroblastların gövdeleri yuvarlak veya füziform şekilde, genellikle osseöz spiral laminaya komşu olan en bazal kısımda yerleşmişlerdi (Resim 6,7). Limbusa iç spiral sulkustan bakıldığında (Resim 7), spiral limbusun bazalinden apikal yüzeyine kadar dendritik fibroblastların oluşturduğu organizasyon görüldü; derinde osseöz spiral laminaya yakın bölgede dendritik fibroblastların gövdeleri ve bundan ayrılan kısa trunkuslar, iç spiral sulkusa bakan kısımlarda bazaldan apikale yükselen kalın dendritler ve vestibüler dudaktaki dişlerin apikal plakalarında ince dendritlerin oluşturduğu 3-boyutlu ağ spiral limbus stromasında yer alan retikülümü oluşturdular; şekil 1 bulguları şematize etmektedir.

Geçirimli elektron mikroskopi

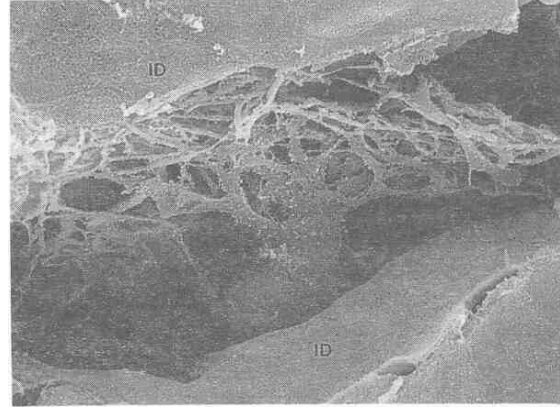
Fibroblastların gövdesinin kesitlerde iğ şeklinde idi ve eliptik bir nükleus, gelişmiş bir endoplazmik retikülüm ve golgi aparatı vardı. Matriks içinde bağ dokusu lif kümeleri arasında çok sayıda kapiller ve dendritlerin sitoplazmik uzantılara ait kesitler vardı. Dendritlerin hücre membranlarının birbirine çok sayıda 'gap junction' ile bağlı olduğu görüldü (Resim 8).



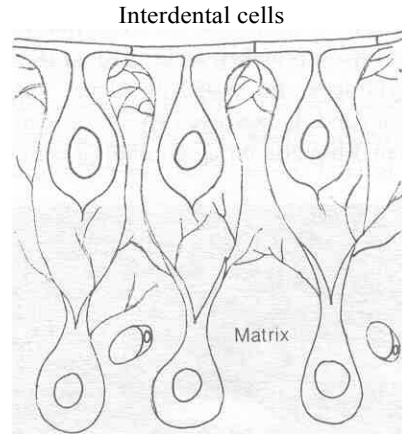
Resim 5: İştme dişindeki selüler retikülümün yandan görüntüsü. Dişlerin gövdesinde yer alan yassı, kalın kemer tarzında dikey dendritler ve apikal plakalarında yer alan yüzeysel ağ görülmektedir. Mikroskoptaki büyütme x 1300



Resim 6: Limbusun frontal görüntüsü. Üst kısım vestibüler dudak, orta kısım iç spiral sulkus ve alt kısım osseöz spiral lamina tarafına bakan yüzeyleri göstermektedir. Yüzeyledeki ince hücresel ağ, ortada kalın dikey dendritler ve derinde osseöz spiral laminaya yakın bölgede dendritik fibroblastların gövdeleri görülmektedir. Mikroskoptaki büyütme x 1200

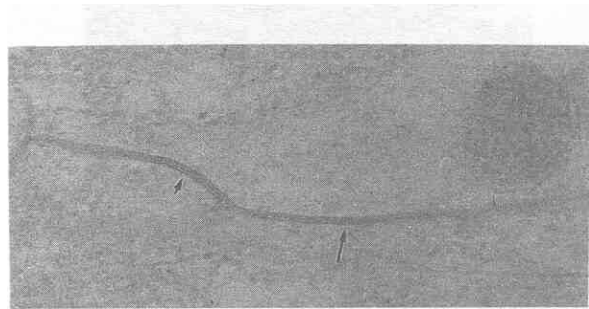


Resim 7: İnterdental hücreler (ID) arasından bir fibroblastın görüntüsü. Bazaldeki gövdeden çıkan dendritlerin apikale yükselip, apikal yüzeyde komşu dendritlerle oluşturdukları ağ görülmektedir. Mikroskoptaki büyütme x 1500



Dendritic fibroblast

Şekil 1: Dendritik fibroblastların spiral limbustaki organizasyonunun şematik görüntüsü.



Resim 8: Geçirimli elektron mikroskopik kesitte fibroblastların sitoplazmik uzantıları arasında yer alan uzun bir gap junction görülmektedir.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Spiral limbusta yer alan fibroblastların morfolojisi ile ilgili ışık mikroskobu ve geçirimli elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalar bu hücrelerin gerçek şekil ve dizilimlerini gösterememiştir. Bu taramalı elektron mikroskopik çalışma, spiral limbusun stromasında fibroblastların şeklini, sayısız dendritik uzantıları ile oluşturdukları ağı 3-boyutlu organizasyonunu ve bu ağın spiral limbusun epitelial ve bağ dokusu elemanları ile olan topoğrafik ilişkilerini gösteren ilk yayındır. Taramalı elektron mikroskopi ile deri papillaları, kornea, intestinal villus ve myenterik pleksusta da fibroblastların oluşturduğu benzeri hücrel retikülömlere rastlanmış ve fibroblastların morfolojik ve fonksiyonel özelliklerinin buldukları mikroçevre tarafından belirleneceği, fibrogeniz dışında bölgesel mekanik, fizyolojik ve kimyasal fonksiyonlarda rol alabileceği ve komşu yapıların fonksiyonlarına adapte olacak şekilde başkalaşım (differentiation) gösterebileceği bildirilmiştir (6,8). Spiral Limbusta dendritik fibroblastların oluşturdukları retikülüm, limbustaki diğer hücre ve bağ dokusu elemanları ile birlikte, spiral limbusun kokleadaki işlevlerine uygun fonksiyonel bir yapı olabilir.

Dendritik fibroblastlar koklear kanal boyunca oluşturdukları büyük hücrel retikülüm, bu fibroblastların kokleanın işitme mekaniği ve kimyasal kompozisyonun oluşmasında fonksiyonları olduğunu düşündürmektedir. Spiral limbustan stromasında fibroblastların dendritik uzantıları arasında zengin bir kapiller ağı olduğu bilinmekte (7) ve limbustaki stromal hücrelerle kapillerler arasında sıvı ve iyon transportu olduğu varsayılmaktadır (9,10). Histokimyasal çalışmalar, Na⁺ ve K⁺ iyonlarının hücre membranından transportunu sağlayan Na⁺ K⁺ ATPaz enziminin aktivitesinin de spiral limbusta stromal hücrelerde yüksek olduğunu göstermektedir (1,3). Perilenf içine verilen vital boya ve elektron-dense partiküllerle yapılan çalışmalarda da, limbustaki stromal fibroblastların arasındaki ekstraselüler mesafelerin perilenfatik boşluklarla ilişkili olduğu gösterilmiştir (5,11). Bu çalışmada, daha önceki çalışmalarla birlikte (4), fibroblastların birbirlerine, hücreler arası iyon alışverişinin yüksek olduğu bölgelerde görülen, 'gap junction' ile bağlı olduğunu ve böylece spiral limbusun gelişmiş bir hücreler arası iletim sistemine sahip olduğunu göstermektedir. Spiral limbusta kapillerle sarılmış, yüksek Na⁺ K⁺ ATPaz aktivitesi gösteren, iyon ge-

çirgen iletim sistemine sahip ve bütün stromaya yayılan bir fibroblast ağı, ekstraselüler mesafelerdeki sıvının Na⁺K⁺ konsantrasyonlarının regülasyonunu sağlayabilir. Bu iyonlar limbustan stromasından perilenfatik boşluklara da ulaşabileceğinden, spiral limbustaki dendritik fibroblastlar perilenfin oluşumunda da önemli rol oynayabilirler.

Fibroblastlar, kokleardaki kimyasal kompozisyona katkıları dışında, bağ dokusu elemanı olarak ekstraselüler matriksi oluşturan proteoglikan yapısındaki amorf madde ile kollajen sentezinden sorumludurlar. Yapılan çalışmalarda spiral limbustan matriksinin mekanik strese dayanıklı kıkırdak gibi yapılarda yoğun olarak bulunan tip 2 kollajen ve kartilajspesifik proteoglikan içerdiği saptanmıştır (2); hatta spiral limbustan kıkırdak benzeri bir yapıya sahip olduğunu öne sürülmektedir. Dendritik fibroblastlar, spiral limbustan ve işitme dişlerinin ekstraselüler matriksinin sentezinden sorumlu olabilirler ve limbustan kokleadaki vibrasyonlara dayanıklı bir yapıya sahip olmasını sağlayabilirler.

Duktus kokleariste bazılar membran ses dalgaları ile titreşime girdiğinde tektoriyal membranın spiral limbustan Corti organına uzanan serbest kısmının, kitap kapağı gibi vestibüler dudakın serbest kenarında menteşeli bir salınım hareketi yaptığı varsayılmaktadır (13). Bu hareket sırasında vestibüler dudakta pivot noktada bulunan ve tektoriyal membranın mekanik desteğini sağlayan işitme dişleri, vibrasyonların yarattığı yoğun bir mekanik stres altında kalabilirler. Dişlerin düzenli ve sıkı bağ dokusu lifleri içerdiği ve vertikal seyreden liflerin primer osseöz lamina üzerinde kemik yüzeylere sıkıca bağlanarak dişlerin mekanik stabilitesini sağladığı bilinmektedir (7). Bu çalışma ile gösterilen dişlerin stromasındaki hücrel retikülüm, dişlerin sıkı bağ dokusu elemanları arasında yerleşerek işitme dişleri için bir iskelet fonksiyonu görebilir ve tektoriyal membran ve interdental hücrelere destek sağlayan dişlerin mekanik stabilitesini sağlayabilir. Dendritik fibroblastlar, tektoriyal membranın vibrasyon mikromekaniğinde önemli rol oynamaktadırlar.

Sonuç olarak, bu çalışma dendritik fibroblastların spiral limbustan stromasında oluşturdukları hücrel retikülümü ortaya çıkarmış ve bunun kokleanın mekanik işitme fonksiyonlarında ve perilenfin oluşumunda rol alabileceğini göstermiştir.

Yazışma Adresi: Dr. Babür KÜÇÜK
Kader Sok. 1/5
06700 Gaziosmanpaşa,
ANKARA

KAYNAKLAR

1. ICHIMIYA I, ADAMS JC, KIMURA R; Immunocalization of Na+K+ATPase, calciumbinding proteins and carbonic anhydrase in the guinea pig inner ear. *Acta Otolaryngol* 114: 167-176, 1994.
2. ISHIBE T, YOO TJ: Type II collagen distribution in the monkey ear. *Am J Otolology* 11: 33-38, 1990.
3. KERR TP, ROSS MD, STEPHEN AE: Cellular localization of Na+K+ATPase in the mammalian cochlear duct significance for cochlear fluid balance. *Am J Otolaryngol* 3: 332-338, 1982.
4. KIKUCHI T, KIMURA RS, PAUL DL, TAKASAKA T, ADAMS JC: Gap junction systems in the mammalian cochlea. *Brain Res Rev* 32: 163-166, 2000.
5. KIMURA D, NYE CL, SOUTHARD RE: Normal and pathologic features of the limbus spiralis and its functional significance. *Am J Otolaryngol* 11: 99-111,1990.
6. KOMURA T: Re-evaluation of fibroblasts and fibroblast - like cells. *Anat Embryol* 182: 103-112, 1990.
7. KÜÇÜK B, ABE K: Scanning electron microscopy of the auditory teeth along the mouse cochlear duct. *Arch Histol Cytol* 53: 439-448, 1990.
8. OMAGARI M, OGAWA K: Three dimensional arrangement of fibrocytes in the dermal papilla of the human sole skin. *Okajimas Folia Anat Jpn* 67: 195-202, 1990.
9. SPICER S, SCHULTE BA: Differentiation of inner era fibrocytes according to their ion transport related activity. *Hearing Research* 56: 53-64, 1991.
10. SPICER S, THOMOPOULOS GN, SCHULTE BA: Structural evidence for ion transport and tectorial membrane maintenance in the gerbil limbus. *Hearing Research* 143: 147-161, 2000.
11. ULFENDAHL M, SCARFONE E, FLOCK A, LE CALVEZ S, CONRADI P: Perilymphatic fluid compartments and intercellular spaces of the inner ear and the organ of Corti. *Neuroimage* 12: 307-313, 2000.
12. USHIKI T, IDE C: A modified KOH-collagenase method applied to scanning electron microscopic observations of peripheral nerves. *Arch Histol Cytol* 51: 223-232, 1988.
13. ZWISLOCKI JJ: Analysis of cochlear mechanics. *Hearing Research* 22: 155-169, 1986.