

УДК 611.013;591.4;591.3+611.018;591.8
© Коллектив авторов, 2016
doi: 10.18499/2225-7357-2016-5-3-73-76

ОПТИМИЗАЦИЯ РЕПАРАТИВНЫХ ГИСТОГЕНЕЗОВ ТКАНЕЙ БАРАБАННОЙ ПЕРЕПОНКИ СОБАКИ НА РАЗНЫХ СРОКАХ РЕМИССИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ХРОНИЧЕСКОГО ГНОЙНОГО СРЕДНЕГО ОТИТА

Н. Н. Шевлюк, В. А. Долгов, Н. И. Иванова*, Л. Б. Лунькова*
ГБОУ ВПО «Оренбургский государственный медицинский университет»
Минздрава России, г. Оренбург, Россия
*ГБУЗ Оренбургский областной врачебно-физкультурный диспансер,
г. Оренбург, Россия

В статье определены морфофункциональные характеристики репаративных возможностей тканей барабанной перепонки на разных сроках ремиссии экспериментального хронического гнойного среднего отита и определены возможности оптимизации репаративного гистогенеза в барабанной перепонке с использованием наноструктурированного биопластического материала на основе гиалуроновой кислоты. Установлено, что наиболее выраженные репаративные свойства тканей барабанной перепонки проявляются в первые две недели после стихания воспалительных явлений в среднем ухе. Пластика перфораций барабанной перепонки, проведенная в этот период, способствовала гисто- и органотипической регенерации тканей барабанной перепонки.

Ключевые слова: гнойный средний отит, ремиссия, барабанная перепонка, эпителий, соединительная ткань, регенерация.

© The authors, 2016

*Orenburg State Medical University, Orenburg, Russia
Orenburg Regional Medical and Sports Clinic, Orenburg, Russia*

Optimization of Tissue Reparative Histogenesis of the Dog's Tympanic Membrane at Different Stages of Remission of Experimental Chronic Suppurative Otitis Media

The article defines the morphofunctional characteristics of the reparative capabilities of the tympanic membrane at different stages of the remission of experimental chronic suppurative otitis media. It identifies the opportunities of the optimization of reparative histogenesis in the tympanic membrane using nanostructured bioplastic material based on hyaluronic acid. It was found that the most pronounced reparative properties of the tissue of the tympanic membrane were seen in the first two weeks after subsiding of the inflammation in the middle ear. Plastic of the perforations of the tympanic membrane that held in this period contributed to histological and organotypic tissue regeneration of the tympanic membrane.

Keywords: chronic suppurative otitis media, remission, tympanic membrane, epithelium, connective tissue, regeneration.

Введение

Проблема восстановления утраченных, либо поврежденных тканей и органов относится к важнейшим, не теряющим актуальности направлениям современной медицины и биологии [17, 18, 19].

Одной из причин, вызывающих повреждения барабанной перепонки, нередко приводящие к тугоухости, является хронический гнойный средний отит. Для прекращения обострения хронического гнойного среднего отита и улучшения слуха отоларингологи производят санирующие и слухоулучшающие операции. К числу слухоулучшающих операций относится тимпано-мирингопластика. При этом сроки проведения тимпано-мирингопластики являются дискуссионными: либо сразу после санирующего хирургическо-

го вмешательства на среднем ухе, либо вторым этапом на «сухом ухе» через определенный срок после первой операции [1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 13]. Наиболее ранние сроки операции соответствуют первым двум неделям ремиссии, поздние – 12 месяцам [3, 4, 7, 8, 10, 12, 20].

При этом в литературе недостаточно сведений о морфофункциональных изменениях тканей барабанной перепонки и степени активности репаративных процессов, протекающих в ней в различные сроки ремиссии гнойного отита.

Целью исследования стали морфофункциональная оценка репаративных возможностей тканей барабанной перепонки на разных сроках ремиссии экспериментального хронического гнойного среднего отита и определенные возможности использования нанострук-

турированного биопластического материала на основе гиалуроновой кислоты для оптимизации репаративных гистогенезов.

Материал и методы исследования

Работа выполнена на 35 беспородных собаках без признаков «спонтанного отита». У 30 особей экспериментально воспроизводили односторонний хронический гнойный средний отит. 5 животных служили контролем. Для моделирования отита в тимпанальную полость путем прокола барабанной перепонки шприцем с иглой вводили по 1 мл взвеси суточной агаровой культуры золотистого стафилококка (*S. aureus*), содержащей 5×10^9 микробов. Инфицирование барабанной полости у животных выполняли под наркозом с использованием операционного микроскопа. 1-е введение производили для воспроизведения отита, 2- и 3-е – на 10- и 30-е сутки отита для развития хронического воспалительного процесса в среднем ухе. Штамм золотистого стафилококка был получен из музейной коллекции культур Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН (Оренбург).

У всех животных после инфицирования барабанной полости развился острый гнойный средний отит. Через 40 дней от начала эксперимента проводили лечение животных, которым внутримышечно вводили по 0,5 г цефазолина 2 раза в день, местно промывали слуховой проход раствором фурацилина до получения «сухого уха».

После этого для закрытия дефекта барабанной перепонки всем животным проводили мирингопластику, для которой использовали наноструктурированный биопластический материал, созданный на основе гиалуроновой кислоты [11, 15, 16]. Используемый материал, состоящий из биологических материалов, обладает способностью к биодegradации. Из пластины материала вырезали лоскут, превышающий на 1–2 мм диаметр перфорации барабанной перепонки. Фиксация трансплантированного лоскута на барабанной перепонке не проводилась, так как используемый биопластический материал обладает высокими адгезивными свойствами. По срокам выполнения операции экспериментальные животные были разделены на 6 групп по 5 собак в каждой.

1-й группе животных мирингопластику выполняли через 1 неделю после прекращения воспаления в среднем ухе, животным 2-й группы – через 2 недели, животным 3-й группы – через 3 недели, животным 4-й группы – через четыре недели, животным 5-й группы – через 12 недель, животным 6-й группы – через 24 недели. Собак выводили из опыта через 2 недели после мирингопластики. При проведении экспериментов на животных соблюда-

ли принципы биоэтики действующего законодательства РФ.

Полученный материал фиксировали в 12% водном растворе нейтрального формалина, спирт-формоле, жидкости Буэна. Парафиновые срезы окрашивали обзорными гистологическими и гистохимическими методиками [15], на срезах проводили морфометрию структур барабанной перепонки. В гистологических препаратах барабанной перепонки подсчитывали количество ряда клеточных элементов крови и соединительной ткани, в эпителии определяли митотическую активность, выражаемую в количестве митозов на 1000 клеток. С использованием иммуноцитохимических методов на гистологических срезах определяли экспрессию белков Ki67, P53, bcl2.

Полученные цифровые показатели обрабатывали с использованием методов вариационной статистики.

Результаты и их обсуждение

В первой и второй группах животных выявлено полное гисто- и органотипическое восстановление повреждений барабанной перепонки. При этом в первой группе у всех, а во второй группе только у 24 животных наблюдалась полная эпителизация поверхности использованного наноструктурированного биопластического материала как со стороны среднего, так и наружного уха. Морфофункциональная характеристика эпителия и соединительной ткани барабанной перепонки животных обеих групп практически не отличалась.

У экспериментальных животных многослойный и однослойный эпителии наслаивались на дефект барабанной перепонки, закрытой пластинкой из наноструктурированного биопластического материала, используя ее в том же качестве, в каком пролиферирующий эпителий в условиях *in situ* использует подлежащую соединительную ткань. При этом пролиферативная активность многослойного плоского эпителия была более высокой в сравнении с однослойным эпителием. В соединительной ткани сохранившейся части барабанной перепонки располагалось большое количество клеточных элементов фибробластического дифферона с небольшим преобладанием дифференцированных фибробластов над малодифференцированными (табл.). При этом отмечена миграция клеточных элементов соединительной ткани в наноструктурированный биопластический материал.

Необходимо также обратить внимание на то, что пролиферативная активность клеточных элементов эпителия и соединительной ткани происходила на фоне прорастания

Таблица

Характер изменения клеточного состава соединительной ткани барабанной перепонки и прилежащих участков наружного слухового прохода и слизистой оболочки среднего уха на разных сроках ремиссии экспериментального хронического гнойного среднего отита

Содержание клеточных элементов на условной единице площади соединительной ткани (3600 мкм ²)	Сроки ремиссии, нед.					
	1	2	3	4	12	24
Лимфоциты	2.2±0.2	1.2±0.1*	1.0±0.1	0.9±0.1	0.9±0.2	1.0±0.1
Макрофаги	1.5±0.1	0.5±0.1*	2.1±0.2	2.0±0.2	2.4±0.3	3.0±0.4
Гранулоциты	—	—	—	—	—	—
Эндотелиоциты	5.6±0.3	5.9±0.2	6.8±0.4*	5.9±0.2*	6.1±0.3	6.0±0.2
Малодифференцированные фибробласты	5.1±0.3	4.4±0.3	3.1±0.2	3.2±0.4	2.8±0.4	3.0±0.2
Дифференцированные фибробласты	7.8±0.5	6.9±0.6	5.8±0.4	4.3±0.4	3.0±0.3	3.1±0.3
Фиброциты	5.1±0.3	5.9±0.4	8.2±0.4	8.8±0.4	10.0±0.5	11.0±0.5

Примечание: * – различия значимы при $p < 0.05$.

кровеносных сосудов из сохранившихся участков барабанной перепонки и наружного уха в трансплантат. Наряду с активизацией пролиферативной активности эпителиальных и соединительнотканых клеток отмечены явления частичной биодеградации наноструктурированного биопластического материала. Наличие большого количества как малодифференцированных, так и дифференцированных фибробластов указывало на высокие регенераторные возможности соединительной ткани. У экспериментальных животных (в отличие от интактных) вновь образованные коллагеновые волокна располагались в межклеточном веществе соединительной ткани беспорядочно, в разных направлениях. В соединительной ткани в умеренном количестве обнаруживались также лимфоциты.

У животных 3–6-й групп пролиферативная активность тканей барабанной перепонки была низкой, особенно у особей, которым закрытие дефекта барабанной перепонки проводили через 24 недели после начала ремиссии хронического отита. Только у половины животных 3–6-й групп наблюдалось полное закрытие дефекта барабанной перепонки, причем эпителий покрывал от четверти до половины площади трансплантата. В соединительной ткани барабанной перепонки этих животных отмечено значительное содержание фибриллярных структур на фоне уменьшения содержания клеточных элементов. Это свидетельствует о том, что пролиферативная активность эпителия и соединительной ткани была значительно ниже, чем у животных, которым мирингопластику выполняли в более ранние сроки.

У остальных животных 3–6-й групп в барабанной перепонке отмечалось наличие перфораций различного диаметра, что обусловлено произошедшей биодеградацией использованного трансплантата и низкой пролиферативной активностью тканей барабанной перепонки в эти сроки эксперимента.

Результаты иммуноцитохимического исследования показали, что у животных 1- и

2-й групп экспрессия белка Ki 67 (маркера пролиферативной активности) и антиапоптотического белка bcl 2 в эпителиальной ткани барабанной перепонки была существенно выше таковой животных 3–6-й групп. Значительная экспрессия белков Ki 67 и bcl 2 отмечалась на фоне умеренной экспрессии проапоптотического белка P 53.

Выводы

Результаты проведенного исследования показывают, что на стадиях 1–2-й недель после прекращения воспалительных явлений в среднем ухе пролиферативная активность эпителиальных тканей барабанной перепонки оказалась максимальной. В соединительнотканной основе барабанной перепонки в этот период отмечено образование молодой соединительной ткани с высоким содержанием дифференцированных фибробластов, активно синтезирующих межклеточное вещество. Это обеспечивало оптимальное развитие репаративных процессов в тканях барабанной перепонки, что способствовало ее органотипическому и гистотипическому восстановлению. Полученные результаты свидетельствуют также об оптимизирующем влиянии применяемого наноструктурированного биопластического материала на процессы репаративных гистогенезов тканей барабанной перепонки.

Список литературы

1. Григорьев В. П. Метод субэпидермальной мирингопластики / В. П. Григорьев, В. В. Железнов // Материалы российской научно-практической конференции оториноларингологов. Оренбург, 2002. С. 51–53.
2. Долгов В. А. Роль микробного биоценоза слизистой оболочки носа, барабанной полости в патогенезе, прогнозировании среднего отита и выборе рациональной терапии мезотимпанита: автореф. дисс. ... д-ра мед. наук / В.А. Долгов. Оренбург, 2007. 40 с.
3. Морфофункциональная характеристика тканей барабанной перепонки и результаты мирингопластики на разных сроках ремиссии

- хронического гнойного среднего отита / В.А. Долгов [и др.] // Практическая медицина. 2015. № 2-2 (87). С. 60–63.
4. *Егоров Л. В.* Одномоментная эндауральная адито-, аттикотомия и тимпаноластика в отоларингологии детского возраста / Л. В. Егоров // Реабилитация функции ЛОР-органов у детей. М., 1989. С. 13–16.
 5. *Егоров Л. В.* Хирургическая тактика при хроническом гнойном среднем отите у детей / Л. В. Егоров, М. Я. Козлов, А. С. Петров // Вестник оториноларингологии. 1999. № 6. С. 14–15.
 6. Пластика дефектов барабанной перепонки отосплетом у больных хроническим мезотимпанитом / Р.А. Забиров [и др.] // Российская оториноларингология. 2007. № 3. С. 40–45.
 7. *Загайнова Н. С.* О хирургическом лечении гнойного среднего отита / Н. С. Загайнова, О. Б. Бродовская // Российская оториноларингология. 2008. № 2. С. 247–249.
 8. *Иванова Н. И.* Состояние регенеративной активности тканей барабанной перепонки и результаты мирингопластики на разных сроках ремиссии экспериментального среднего отита / Н.И. Иванова, В. А. Долгов, Н.Н. Шевлюк // Вестник оториноларингологии. 2014. № 5. С. 11–13.
 9. Репаративные свойства тканей барабанной перепонки на разных сроках ремиссии экспериментального хронического гнойного среднего отита в определении оптимальных условий для мирингопластики «Гиаматриксом» / Н. И. Иванова, В. А. Долгов, Е. В. Долгова, П. С. Федюнина // Альманах молодой науки. 2015. № 3. С. 12–16.
 10. *Иськив Б. Г.* Оссикулопластика при мезотимпанопластике у больных хроническим гнойным средним отитом / Б. Г. Иськив, Х. Панагин // Журнал ушных, носовых и горловых болезней. 1991. № 16. С. 20–23.
 11. *Летута С. Н.*, Бердинский В. Л., Рахматуллин Р. Р., Бурлуцкая О. И., Бурцева Т. И., Рахматулина Л. Р., Барышева Е. С., Забиров Р. А. Наноструктурированный биопластический материал. Патент на изобретение RUS 2425694 14. 04. 2010.
 12. *Меланьин В. Д.* Принцип лечения неосложненных форм эпи- и мезотимпанита / В. Д. Меланьин, О. Г. Хоров // Вестник оториноларингологии. 1999. № 4. С. 8–10.
 13. Хирургическая тактика при хронических гнойных средних отитах: методические рекомендации / О. К. Пятакина [и др.] М., 1989, 22 с.
 14. *Пирс Э.* Гистохимия теоретическая и прикладная / Э. Пирс. М.: Изд-во иностранной литературы, 1962. 962 с.
 15. *Рахматуллин Р.* Наноструктурированный материал «Гиаматрикс» / Р. Рахматуллин, Б. Смоленский, О. Бурлуцкая // Врач. 2011. № 5. С. 22–24.
 16. К вопросу о биологической совместимости современного наноструктурированного биопластического материала «Гиаматрикс» на примере мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток / Р. Р. Рахматуллин [и др.] // Нанотехнологии: разработка, применение – XXI век. 2013. Т. 5, № 1. С. 26–29.
 17. *Стадников А. А.* Стволовые клетки и репаративная регенерация в постнатальном онтогенезе млекопитающих / А.А. Стадников, Н.Н. Шевлюк // Морфология. 2006. Т. 130, № 6. С. 84–88.
 18. *Шевлюк Н. Н.* Представления о тканях: история и современность / Н.Н. Шевлюк, А.А. Стадников // Морфология. 2014. Т. 145, № 2. С. 74–78.
 19. *Шевлюк Н. Н.* Взаимодействие про- и эукариот и проблемы биологии тканей / Н.Н. Шевлюк, А.А. Стадников // Морфология. 2015. Т. 148, № 5. С. 7–13.
 20. *Янов Ю. К.* Любая перфорация барабанной перепонки должна быть закрыта / Ю. К. Янов, В. Н. Егоров, А. В. Назаренко // Материалы Российской конференции оториноларингологов. М., 2003. С. 194–195.

Информация об авторах

Шевлюк Николай Николаевич – д-р биол. наук, профессор, профессор кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ГБОУ ВПО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России. 460000, г. Оренбург, ул. Советская, 6. E-mail: k_histology@orgma.ru.

Долгов Вячеслав Александрович – д-р мед. наук, профессор кафедры оториноларингологии ГБОУ ВПО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России. 460000, г. Оренбург, ул. Советская, 6.

Иванова Наталья Игоревна – врач-оториноларинголог ГБУЗ Оренбургский областной врачебно-физкультурный диспансер. 460048, г. Оренбург, ул. Постникова, 11.

Лунькова Лариса Борисовна – врач-оториноларинголог ГБУЗ Оренбургский областной врачебно-физкультурный диспансер. 460048, г. Оренбург, ул. Постникова, 11.

Поступила в редакцию 29.04.2016 г.