

ОСОБЕННОСТИ РЕПАРАТИВНЫХ ГИСТОГЕНЕЗОВ В БАРАБАННОЙ ПЕРЕПОНКЕ В УСЛОВИЯХ РЕМИССИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ХРОНИЧЕСКОГО ГНОЙНОГО СРЕДНЕГО ОТИТА

ШЕВЛЮК Н.Н.¹, ДОЛГОВ В.А.², ИВАНОВА Н.И.³, ЛУНЬКОВА Л.Б.³

FEATURES OF REPARATIVE HISTOGENESIS IN THE EARDRUM REMISSION UNDER THE CHRONIC SUPPURATIVE OTITIS MEDIA

SHEVLYUK N.N., DOLGOV V.A., IVANOVA N.I., LUNKOVA L.B.

¹Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии (зав. кафедрой – профессор А.А. Стадников);
²кафедра оториноларингологии (зав. кафедрой – доцент М.И. Аникин) ГБОУ ВПО «Оренбургский государственный медицинский университет»;
³Оренбургский областной врачебно-физкультурный диспансер.

С использованием комплекса методов (обзорные гистологические, гистохимические, иммуноцитохимические и морфометрические методы) на экспериментальной модели хронического гнойного среднего отита определены основные факторы и закономерности репаративных гистогенезов в тканях барабанной перепонки собаки. Показано, что митотический индекс в эпителиальных тканях барабанной перепонки был максимальным в конце первой недели ремиссии хронического гнойного среднего отита, а затем снижался. В конце первой недели отмечалась и выраженная экспрессия маркера пролиферации белка Ki67. Наибольшее содержание фибробластов, морфофункциональная организация которых свидетельствовала о их высокой функциональной синтетической активности отмечалось в период первых двух недель. Анализ результатов миринопластики, проведенной с использованием наноструктурированного биопластического материала на основе гиалуроновой кислоты на разных сроках ремиссии хронического гнойного среднего отита показал, что наилучшие результаты миринопластики отмечаются при её проведении в первые две недели после стихания воспаления.

Результаты исследования показали, что для обеспечения оптимальных условий для реализации репаративных гистогенезов в тканях барабанной перепонки в условиях ремиссии хронического гнойного среднего отита необходимо отсутствие воспалительного процесса в среднем ухе, выполнение миринопластики в первые недели ремиссии заболевания, а также использование в качестве трансплантата бидеградируемого биопластического материала.

Ключевые слова: репаративный гистоген

ез, эпителий, соединительная ткань, барабанная перепонка, хронический гнойный средний отит.

Using the methods of complex (review histologic, histochemical, immunocytochemical and morphometric methods) in an experimental model of chronic suppurative otitis media identified the main factors and regularities in the reparative histogenesis of dogs tympanic membrane tissues. It has been shown that mitotic index in epithelial tissue of the tympanic membrane was greatest at the end of the first week of remission of chronic suppurative otitis media, and then decreased. At the end of the first week it was observed and marked expression of the marker protein content (Ki67). The main proliferation of fibroblasts, morpho-functional organization that testified to their high functional synthetic activity was noted during the first two weeks. The results of myringoplasty conducted using nanostructured bioplastic-material based on hyaluronic acid in the various terms of remission of chronic suppurative otitis media showed that the best results are observed at myringoplasty its holding in the first two weeks after the inflammation subsided.

The results showed that, to ensure optimal conditions for the implementation of the histogenesis of reparative tissue of the tympanic membrane in a remission of chronic suppurative otitis media must be no pronounced inflammation in the middle ear, the implementation myringoplasty in the first weeks of remission, as well as the use of bioplastic material bidegradiruemogo myringoplasty goals.

Keywords: reparative histogenesis, epithelium, connective tissue, eardrum, suppurative otitis media.

Введение. Проблемы репаративных гистогенезов в условиях инфицирования тканей относятся к числу приоритетных направлений биологии и медицины постоянно находятся в сфере внимания исследователей [1, 2, 6 – 8 и др.]

Известно, что одним из осложнений гнойного среднего отита является возникновение перфораций в барабанной перепонке, что нередко приводит к развитию тугоухости. Несмотря на то,

что вопросам патогенеза и лечения хронического гнойного среднего отита посвящено значительное число работ, многие аспекты этой проблемы, прежде всего, вопросы морфофункциональных преобразований в тканях барабанной перепонки при хроническом гнойном среднем отите и вопросы пластики повреждений барабанной перепонки, возникающих в процессе развития гнойного отита являются дискуссионными и нуждаются в уточнении и дополнении [1 - 3].

Цель исследования – установление основных закономерностей репаративных гистогенезов в тканях барабанной перепонки на этапах ремиссии экспериментального хронического гнойного среднего отита.

Материал и методы исследования. Исследование проведено на 42 беспородных собаках, не имеющих признаков отита. На 36 собаках моделировали односторонний хронический гнойный средний отит, а 6 собак служили для контроля. Для воспроизведения хронического гнойного среднего отита всем 36 экспериментальным животным в тимпанальную полость путём прокола барабанной перепонки вводили по 1 мл взвеси суточной агаровой культуры золотистого стафилококка (*S. aureus*), содержащей 5 млрд. микробов [1]. Инфицирование барабанной полости проводили трёхкратно. Первое инфицирование проводили для моделирования воспалительного процесса в среднем ухе, а второе и третье (на 10-е и 30-е сутки) для развития хронического воспалительного процесса. Штамм *S. aureus* был получен из музейной коллекции культур Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН (Оренбург).

В результате развития гнойного среднего отита у животных возникли перфорации в барабанной перепонке (рис. 1). Через 40 дней после инфицирования барабанной полости и развития хронического гнойного среднего отита проводили лечение животных (2 раза в день проводили внутримышечное введение по 0,5 г. цефазолина и промывание слухового прохода раствором фурацилина).

После завершения противовоспалительной терапии и стихания воспалительного процесса для ликвидации дефекта в барабанной перепонке всем животным проводили мирингопластику. По срокам проведения мирингопластики экспериментальные животные были разделены на 6 групп (по 6 животных в каждой группе). Животным первой группы мирингопластику проводили через 1 неделю после прекращения воспаления, животным второй группы – через 2 недели, животным 3-й группы – через 3 недели. Животным 4-й группы – через 4 недели, животным 5-й группы – через 24 недели, животным 6-й группы – через 24 недели.

Для мирингопластики использовали нано-

структурированный биопластический материал, созданный на основе гиалуроновой кислоты [3, 4, 5]. Данный материал является биodeградируемым, сроки его биodeградации составляет 2 – 3 недели. Из этого материала вырезали лоскут, диаметр которого был на 1 – 2 мм больше размера перфорации. Вырезанную пластину материала помещали на дефект в барабанной перепонке. При этом дополнительной фиксации трансплантата не требовалось, так как используемый материал обладал высокими адгезивными свойствами.

Животных выводили из эксперимента через 2 недели после мирингопластики. При проведении всех экспериментов с животными соблюдали требования, содержащиеся в Федеральном законе РФ «О защите животных от жестокого обращения» (принят Государственной Думой 1 декабря 1999 г.).

Полученный материал (барабанные перепонки и прилежащие участки наружного и среднего уха) фиксировали в 12% водном растворе нейтрального формалина, спирт – формоле, жидкости Буэна, обезживали в спиртах возрастающей концентрации заливали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 5 – 7 мкм. изготавливали на ротационном микротоме, окрашивали гематоксилином Майера и эозином, по методу Ван Гизона, ШИК-реакцией с контролем амилазой. с использованием иммуноцитохимических реакций на гистологических срезах определяли экспрессию белков Ki67, P53, bcl2.

В гистологических препаратах определяли митотическую активность эпителиев (выражающуюся в количестве митозов на 1000 клеток. В тканях барабанной перепонки подсчитывали количество ряда клеток крови и соединительной ткани. После проведения иммуноцитохимических реакций подсчитывали количество клеток, экспрессирующих белки Ki67, P53, bcl2. Полученные цифровые показатели обрабатывали на компьютере с использованием программ Statistica 6,0 (StatSoft, Inc.) с учётом вариативности подсчитываемых объектов и индивидуальной изменчивости. различия измеряемых величин оценивали по t-критерию Стьюдента и считали значимыми при $P < 0,05$.

Результаты исследований и их обсуждение. Анализ гистологических препаратов показал, что у животных 1-й – 2-й групп процессы репаративного гистогенеза привели к гисто- и органотипическому восстановлению дефекта барабанной перепонки. На месте перфорации были сформированы структуры, типичные для интактной барабанной перепонки. Процессы пролиферации и цитодифференцировки эпителиоцитов и клеток соединительной ткани привели к замещению трансплантата новообразованными структурами

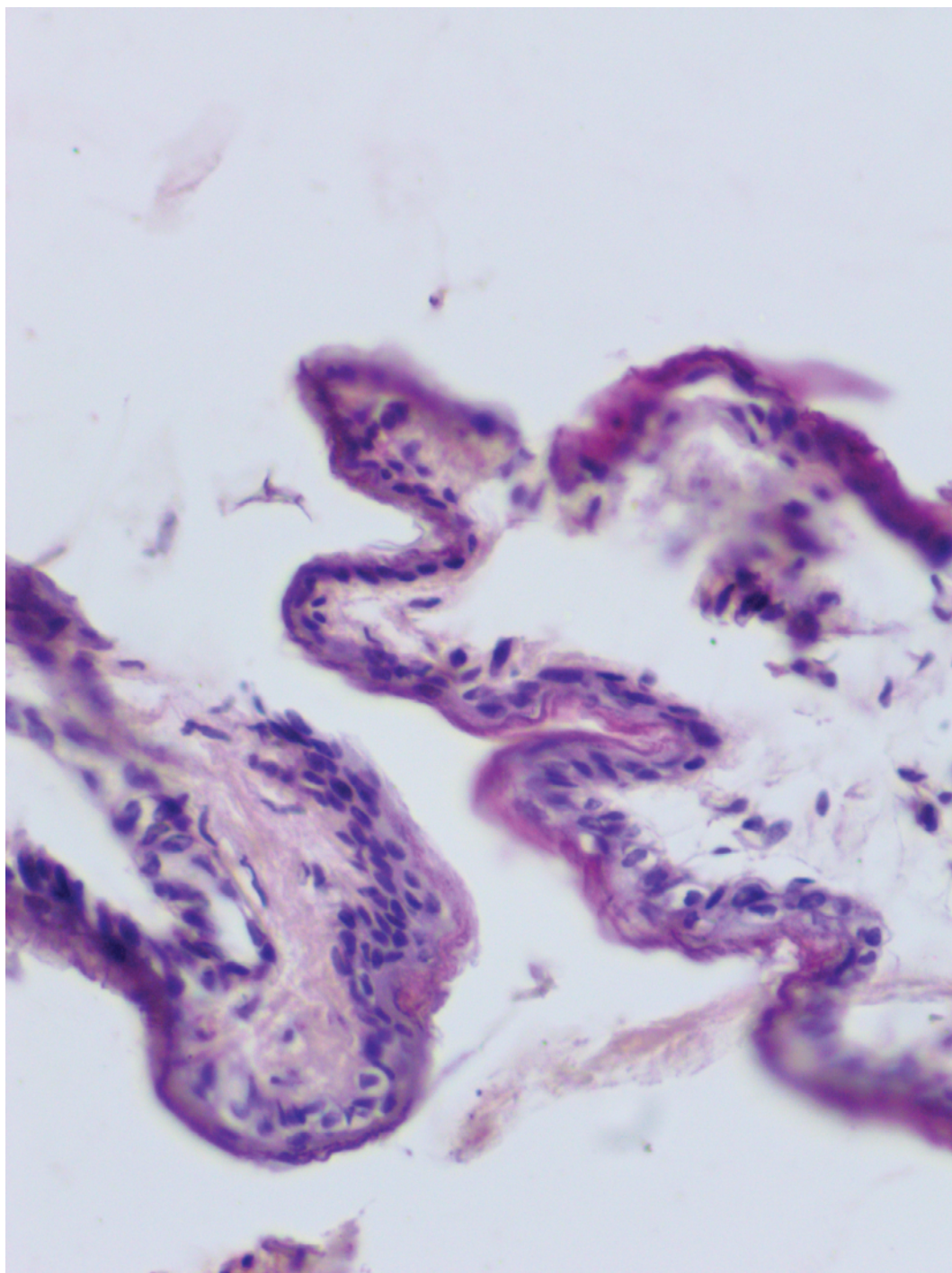


Рис. 1. Перфорация в барабанной перепонке собаки, возникшая в результате воспалительного процесса в среднем ухе в условиях острого. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 100.

эпителия и соединительной ткани (рис. 2 и рис. 3). Подсчёт митотических индексов эпителиоцитов показал, что на стадии 1 неделя ремиссии митотический индекс многослойного эпителия был равен $6,8 \pm 0,5$ промилле, а однослойного – $2,0 \pm 0,1$. На стадии 2-х недель – $5,6 \pm 0,5$ и $1,7 \pm 0,4$ промилле соответственно. Содержание дифференцированных фибробластов способных активно синтезировать

компоненты межклеточного вещества в эти сроки наблюдения была максимальной. На этих же сроках наблюдения в многослойном и однослойном эпителиях барабанной перепонки была максимальной экспрессия белка Ki67. Выраженность экспрессии проапоптотического белка P53 и антиапоптотического белка bcl2 в тканях барабанной перепонки была умеренной. На месте, где ранее

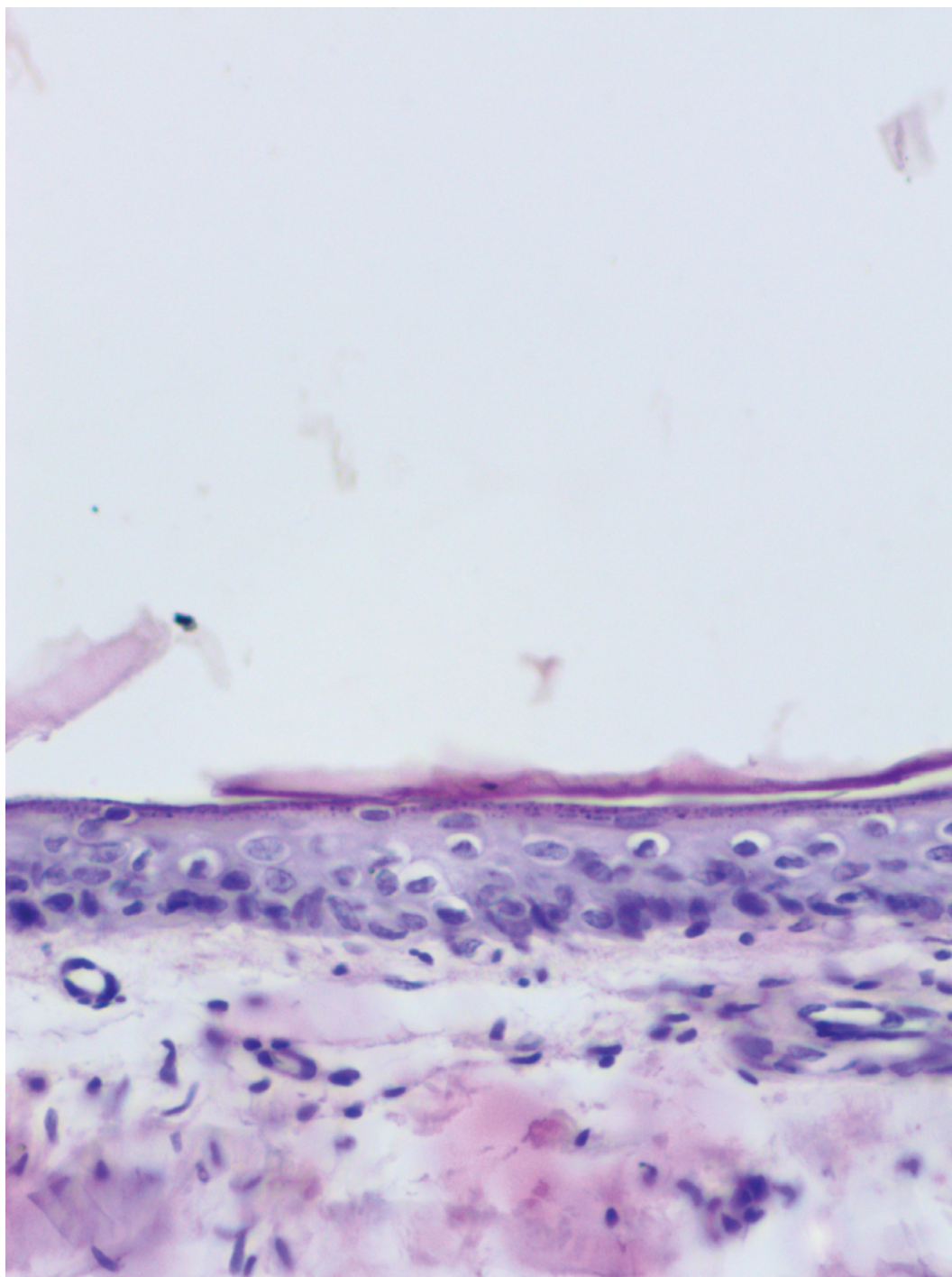


Рис. 2. Барабанная перепонка собаки через 2 недели после миринопластики. Миринопластика проведена через 1 неделю после начала ремиссии хронического гнойного среднего отита. Окраска гематоксилином и эозином. Ув.400.

располагался трансплантат из наноструктурированного биопластического материала, остались только его отдельные следы (рис. 2 и рис. 3), что подтверждает высокую способность этого материала к биодеградации в организме.

Полученные результаты отражают закономерность в динамике репаративной активности тканей барабанной перепонки в процессе раз-

вития хронического отита: наиболее выраженная пролиферативная активность многослойного и однослойного эпителиев и соединительной ткани в барабанной перепонке и прилежащих участках наружного и среднего уха наблюдается в первые две недели ремиссии экспериментального хронического гнойного среднего отита.

При более поздних сроках пластики де-

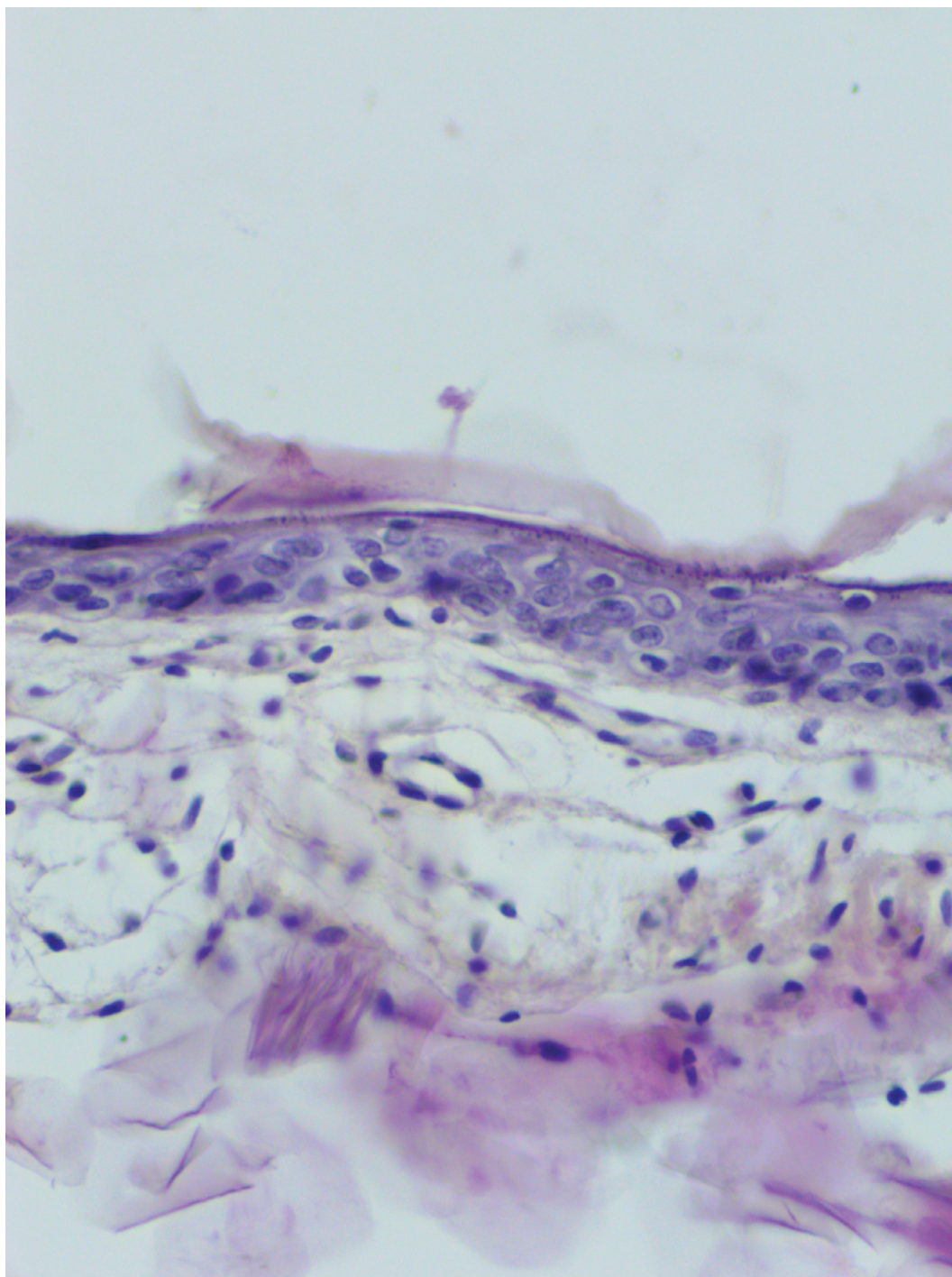


Рис. 3. Барабанная перепонка собаки через 2 недели после миринопластики. Миринопластика проведена через 2 недели после начала ремиссии хронического гнойного среднего отита. Окраска гематоксилином и эозином. Ув.400.

фектов барабанной перепонки(в сроки от 3-х до 24 недель ремиссии хронического гнойного среднего отита) отмечается неполное закрытие дефектов в барабанной перепонке. При этом с отодвиганием срока миринопластики на более поздние периоды ремиссии процессы репаративных гистогенезов в тканях барабанной перепонки замедляются. Это связано, прежде всего, с тем,

что после затухания воспалительного процесса на более поздних сроках ремиссии хронического среднего отита в участках барабанной перепонки, примыкающих к её перфорации, формируется грубая рубцовая соединительная ткань, содержащая незначительно количество камбиальных элементов, что не способствует активному врастанию соединительной ткани в биопластический мате-

риал трансплантата, используемого для закрытия дефекта в барабанной перепонке и препятствует формированию органотипического регенерата.

Полученные результаты свидетельствуют также и о том что использование наноструктурированного биопластического материала для мирингопластики оптимизирует процессы репаративного гистогенеза в тканях барабанной перепонки. Таким образом, результаты исследования свидетельствуют о том, что позитивные результаты мирингопластики наблюдаются в условиях максимальной пролиферативной активности эпителиоцитов и клеток фибробластического дифферона соединительной ткани.

Выводы. Таким образом, ведущими факторами, обеспечивающими оптимальные условия репаративных гистогенезов и оптимизирующие результаты мирингопластики являются отсутствие выраженного воспалительного процесса в среднем ухе, проведение мирингопластики на ранних сроках ремиссии хронического гнойного среднего отита, использование оптимального биопластического материала для мирингопластики (одним из таких материалов является наноструктурированный биопластический материал на основе гиалуроновой кислоты).

ЛИТЕРАТУРА:

1. Долгов В.А. Роль микробного биоценоза слизистой оболочки носа, барабанной полости в патогенезе, прогнозировании среднего отита и выбора рациональной терапии мезотимпанита. Автореф. дисс. доктора мед. наук, Оренбург, 2007, 40 с.
2. Егоров Л.В., Козлов М.Я., Петров А.С. Хирургическая тактика при хроническом гнойном среднем отите у детей // Вестник оториноларингологии, 1999, № 6, с. 14 – 15.
3. Забиров Р.А., Щетинин В.Н., Рахматуллин Р.Р., Гарифзянова С.М., Шевлюк Н.Н. Пластика дефектов барабанной перепонки отопластом у больных хроническим мезотимпанитом // Российская оториноларингология, 2007, № 3, с. 40 – 45.
4. Летута С.Н., Бердинский В.Л., Рахматуллин Р.Р., Бурлуцкая О.И., Бурцева Т.И., Рахматуллина Д.Р., Барышева Е.С., Забиров Р.А. Наноструктурированный биопластический материал. Патент на изобретение RUS 2425694 14.04.2010.
5. Рахматуллин Р., Смолевский Б., Бурлуцкая О. Наноструктурированный материал «Гиамат-рикс» // Врач, 2011, № 5, с. 22 – 24.
6. Стадников А.А., Шевлюк Н.Н. Стволовые клетки и репаративная регенерация в постнатальном онтогенезе млекопитающих // Морфология, 2006, т. 130, № 6, с. 84 – 88.
7. Шевлюк Н.Н., Стадников А.А. Представления о тканях. История и современность // Морфология, 2014, т. 145, № 2, с. 74 – 78.
8. Шевлюк Н.Н., Стадников А.А. Взаимодействие про- и эукариот и проблемы биологии тканей // Морфология, 2015, т. 148, № 5, с. 7 – 13.

Авторская справка:

1. Шевлюк Николай Николаевич - д.б.н., профессор, профессор кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии Оренбургского государственного медицинского университета. г.Оренбург, ул. Советская, 6. Тел. 8(905)843-37-45. K_histology@orgma.ru.

2. Долгов Вячеслав Александрович - доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры оториноларингологии Оренбургского государственного медицинского университет. г.Оренбург, ул. Советская, 6. K_histology@orgma.ru.

3. Иванова Наталья Игоревна – врач-оториноларинголог Оренбургского областного лечебно-физкультурного диспансера. 460048, г. Оренбург, ул. Постникова, 11. K_histology@orgma.ru.

4. Лунькова Лариса Борисовна - врач-оториноларинголог Оренбургского областного лечебно-физкультурного диспансера. 460048, г. Оренбург, ул. Постникова, 11. K_histology@orgma.ru.