

НАО «Медицинский университет Караганды»

УДК 616.285-007-089

На правах рукописи.

Есниязов Диас Кайратович

**«Экспериментальное обоснование применения децеллюляризованного
матрикса ксенобрюшины при мирингопластике»**

6D110100 – Медицина

Диссертация на соискание степени доктора философии (PhD)

Отечественные научные консультанты:
к.м.н. профессор, Нуркаси Тулепбергенович.
Абаатов, кафедра хирургических болезней
НАО «МУК»

д.м.н. профессор Майда Масхаповна.
Тусупбекова, кафедра патологии НАО
«МУК»

Зарубежный научный консультант:
MD, PhD, Professor Yoshihiro Noso Hiroshima
International University, Hiroshima, Japan

Республика Казахстан
Караганда, 2023

СОДЕРЖАНИЕ

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ	4
ОПРЕДЕЛЕНИЕ	5
ОБОЗНАЧЕНИЕ И СОКРАЩЕНИЯ	6
ВВЕДЕНИЕ	7
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1 История использования аутоотрансплантатов в практике отоларингологии.....	16
1.2 Методологические подходы оценки эффективности использования аллотрансплантатов в отоларингологии.....	21
1.3 Исторические аспекты использования ксенотрансплантатов к практике отоларингологии.....	24
1.4 Актуальные вопросы поиска биосовместимых материалов, обладающих хорошими репаративными свойствами в отоларингологии.....	28
2. МАТЕРИАЛЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	31
2.1. Объект исследования.....	31
2.2. Дизайн исследования.....	34
2.3 Методологические этапы создания экспериментальной модели пластики барабанной перепонки.....	35
2.4 Иммунологические методики оценки системного воспаления... ..	36
2.5 Методика количественной оценки состояния слуха после миринопластики.....	37
2.6 Морфологические методы исследования.....	38
2.7 Методы статистической обработки результатов исследования... ..	39
3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	41
3.1 Экспериментальная модель пластики барабанной перепонки....	41
3.2 Оценка реакции иммунной системы макроорганизма в ответ на имплантацию децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины..	43
3.3 Сравнительная оценка количественного показателя слуха экспериментальных животных после миринопластики с использованием децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины.....	48
3.4 Обоснование выбора морфологического комплекса для оценки структурного состояния зон имплантации в группах эксперимента с децеллюляризованным матриксом ксенобрюшины и консервированной твердой мозговой оболочкой.....	51
3.4.1 Морфологическая характеристика состояния зоны дефекта барабанной перепонки при имплантации, консервированной твердой мозговой оболочкой и децеллюляризованным матриксом ксенобрюшины.....	53

3.4.2 Морфометрический анализ тканевой реакции в зоне «имплантперепонка».....	62
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	72
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	78
ПРИЛОЖЕНИЕ А – свидетельство о государственной регистрации прав на объект авторского права №14256	87
ПРИЛОЖЕНИЕ Б – акт внедрения результатов научно-исследовательской работы.....	89
ПРИЛОЖЕНИЕ В – решение комитета биоэтики НАО МУК протокол №12.....	92
ПРИЛОЖЕНИЕ Г – Стандартная операционная процедура экспериментальных животных (кроликов).....	94

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящей диссертации использованы ссылки на следующие стандарты:
Закон Республики Казахстан «О науке» от 18.02.2011 г. № 407-IVЗРК;
ГОСО РК 5.04.034-2011: Государственный общеобязательный стандарт образования Республики Казахстан. Послевузовское образование. Докторантура. Основные положения (изменения от 23 августа 2012 г. № 1080);
ГОСТ 7.9-95 (ИСО 214-76) Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Реферат и аннотация. Общие требования;
ГОСТ 7.32-2001 (изменения от 2006 г.). Отчет о научно-исследовательской работе. Структура и правила оформления;
ГОСТ 7.1-2003. Библиографическая запись. Библиографическое описание. Общие требования и правила составления;
Постановление Правительства РК с изменениями и дополнениями от 07.08.2012г №1030, пункт 52. Утилизация лабораторных животных по окончании проведения лабораторных исследований;
Правила управления медико-биологических экспериментов, доклинических и клинических исследований, а также требований к доклиническим и клиническим базам. Приказ МЗ РК от 2 апреля 2018г №142

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В научно – исследовательской работе применяют следующие термины с соответствующими определениями:

Внеклеточный матрикс - структуры соединительной ткани после полного уничтожения клеток.

Детергент – вещество, используемое в биохимической лаборатории, для разрушения клеточной мембраны с последующей трансформацией структуры внутриклеточной структуры материала в растворимую форму.

Децеллюляризация - это процесс, направленный на уничтожение клеток того или иного органа, сохраняя лишь каркас из гликопротеинов (коллаген) соединительной ткани.

Имплантат - изделие медицинского назначения, используемое в медицинских целях в качестве протезов (заменителя отсутствующего органа) для вживления в организм.

Имплантат-перепонка – участок имплантата и перфорированную барабанную перепонку, которая представляется как динамическая структурно-функциональная система, обеспечивающая ремоделирование области имплантации биотрансплантата с восстановлением нативной структуры и функции барабанной перепонки

ЛАЛ тест – (LAL-тест) предназначен для количественного определения эндотоксина в образцах культуральной среды, плазмы, сыворотки и других растворах хромогенным методом на основе ферментной реакции

ПЦР-тест - метод диагностики инфекций в живом организме, основанный на исследовании генетического материала живого организма (ДНК и РНК).

ANOVA - одноранговый дисперсионный анализ, от англ. «Analysis of variance»

SIS – от англ. «the small intestinal submucosa», материала из подслизистой оболочки тонкого кишечника свиньи

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

- ВКМ** – внеклеточный матрикс
ДеКБ – децеллюляризированный матрикс ксенобрюшины
КБ – матрикс ксенобрюшины
КРС – крупный рогатый скот
ЛОР – оториноларингология
МУК – медицинский университет Караганды
НАО – некоммерческим акционерным обществом
НеДеКБ – недецеллюляризированная ксенобрюшина
НИР – научно-исследовательская работа
ПЭГ-6000 – полиэтиленгликоль-6000
ТМО - твердая мозговая оболочка
ЦИК – циркулирующие иммунные комплексы
ЕСМ – англ. extracellular matrix
SIS – англ. the small intestinal submucosa

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования.

Причиной постоянного снижения слуха являются, как хронические отиты, так и острые травматические отиты. Посттравматическое повреждение барабанной перепонки, занимает значительное место в общей структуре заболеваний, как среднего, так и внутреннего уха. При этом механические повреждения структур среднего уха, в частности барабанной перепонки, по данным разных авторов составляет 32-70% от всех травматических повреждений, как среднего, так и внутреннего уха. [1-4].

Утверждается, что острый посттравматический перфоративный отит, с не большим дефектом барабанной перепонки самостоятельно закрывается в течение 7-10 дней. Однако, более обширные дефекты барабанной перепонки, занимающие 1 и более квадрант, то есть более 25% от всей поверхности барабанной перепонки, приводят в хроническим мезотимпанитам. [1,3-9]. Неправильная тактика лечения острого перфоративного среднего отита ведет к хроническим мезотимпанитам, что в свою очередь ведет к постепенному снижению слуха [1,10]. В настоящее время стойкая перфорация барабанной перепонки более 3-х месяцев, считается хроническим отитом. Однако практикующему врачу тяжело предсказать закроется ли перфорация барабанной перепонки без оперативного вмешательства [11,12].

На сегодняшний день существует множество способов закрытия перфорации барабанной перепонки при острых посттравматических отитах с применением ауто- и аллотрансплантантов [6], но при этом всё ещё остается актуальной проблемой вопросы хирургического и без хирургического восстановления целостности барабанной перепонки, различными тканями, как собственными, так и трансплантатами.

Поиск оптимальных материалов похожих по своему строению тканей для аутопластики при закрытии дефектов барабанной перепонки является одним из нерешенных вопросов в отохирургии. Причина состоит в том, что барабанная перепонка не имеет однородных по своему строению тканей в человеческом организме [13,14].

Известно, что в клинической практике используются различные пластические материалы: фасция височной мышцы, хрящ и надхрящница, периост, слизистая оболочка щеки, слизистая оболочка тонкой кишки, носовая перегородка, стенка вены, твердая мозговая оболочка, амнион, склера, культура аллофибробластов человека, полимерные имплантаты, двух и трехслойные трансплантаты различного состава [7,15-21]. Однако следует отметить, что на основании многолетней клинической практики, так и в клинических испытаниях, перечисленные трансплантаты показали с одной стороны, как достаточную эффективность материалов, с другой стороны установлено, что они имеют существенные недостатки. Среди возможных осложнений чаще всего встречается отторжение трансплантата, рассасывание коллагеновых волокон, смещение лоскута, либо отмечается не полное закрытие дефекта барабанной перепонки, также рубцевание, либо сращение с

медиальной стенкой барабанной полости, не редко также встречается нагноение и рецидив дефекта барабанной перепонки, что в последующем ведет к снижению слуха [22-25]. Такого рода осложнения создают условия необходимости в дополнительной операции, потребность в общем наркозе и увеличение длительности пребывания пациентов в условиях стационара.

Вышеописанные положения позволяет отохирургам вести опытным путём поиски новых высокоэффективных материалов для закрытия дефектов барабанной перепонки, что определяет актуальность данной проблемы [24-26].

Актуальным остаются вопросы поиска альтернативных материалов, обладающих пластическими свойствами, которые бы снижали риск послеоперационных осложнений, улучшали бы функциональность среднего уха и как следствие, способствовали улучшению качества жизни пациента, среди них представляют интерес использование известных имплантатов биологического происхождения в отохирургии.

Биологические имплантаты, как правило, состоят из внеклеточного коллагенового матрикса, что получают из донорского материала человека (аллографт) или животного (ксенографт: свиной, бычий). Как известно, материалы данного происхождения способны встраиваться в цепь физиологического метаболизма и тем самым могут предопределять сбалансированность репаративных процессов без развития в зоне имплантации воспалительных реакций, избегая при этом развития иммунологического отторжения [27, 4].

На сегодняшний день многие биологические материалы сходны по своим биохимическим свойствам, однако, отличаются способами обработки, стерилизацией, хранения, и самое главное первичным материалом изготовления [28, 29], что имеет существенное значение в их эффективности.

Однако существующие биоимплантаты не решают все вопросы, связанные с их применением в отохирургии, так нет консенсуса о том, как и в каких случаях, использовать биологические имплантаты, информация об отдаленных результатах их применения, и что немало важно, эти материалы имеют высокую стоимость. Остается дискуссионным вопрос, какое первичное сырьё лучше использовать для получения биологических имплантатов. Считается, что разные способы изготовления биоимплантатов определяют эндогенные свойства для каждого материала в отдельности, и может быть причиной различных биологических ответов после имплантации *in vivo*. Опираясь на данные обстоятельства, по настоящее время, продолжается поиск высокотехнологичных, биологически «сходных» к организму человека и при этом недорогих имплантатов, которые можно применить в клинике. Несмотря на достаточное количество работ по проблеме использования ксеноимплантатов в мировой науке, следует признать неоднозначность результатов научного поиска, полученные разными учёными. Анализ данных литературы показал отсутствие работ по применению децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины для

закрытия дефектов барабанной перепонки и обоснование эффективности данного вида имплантата для тимпаноластики, что определяет актуальность данного клинического исследования [27].

Планируемое нами научное исследование является продолжением известных экспериментальных работ по изучению внеклеточного матрикса ксенобрюшины для пластики грыж передней брюшной стенки (НИР по грантовому финансированию № государственной регистрации 0115РК00305) и изучению внеклеточного матрикса ксенобрюшины для нефропексии (НИР по грантовому финансированию № гос. регистрации 0115РК00306) [30,31].

Анализ полученных в ходе эксперимента данных, показал, что при использовании децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины, отмечается стадийно-специфическая смена тканевых реакций, лежащее в основе физиологического течения репаративного процесса. Данный материал, наряду с высокими показателями механической прочности, демонстрирует адекватную биосовместимость в эксперименте, с формированием зрелого, состоятельного контакта имплантата с тканями макроорганизма и достоверно минимальными воспалительными реакциями. Данное положение позволяет продолжить дальнейшее изучение децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины в качестве имплантата в отохирургии при дефектах барабанной перепонки в рамках планируемого экспериментального исследования [32,33].

Рабочая гипотеза:

Децеллюляризованный матрикс ксенобрюшины, демонстрирует адекватную биосовместимость с тканями барабанной перепонки в эксперименте, с формированием состоятельного контакта с минимальными тканевыми воспалительными реакциями.

Цель исследования – провести экспериментальное обоснование применения нового биологического материала децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины для миринголастики при перфорации барабанной перепонки.

Задачи исследования:

1. Разработать экспериментальную модель пластики барабанной перепонки с применением децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины на лабораторных кроликах;
2. Оценить реакцию иммунной системы макроорганизма в ответ на имплантацию децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины и консервированной твердой мозговой оболочки через изучение циркулирующих иммунных комплексов различной молекулярной массы;
3. Дать характеристику аудиометрических данных после миринголастики с применением децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины и консервированной твердой мозговой оболочки в эксперименте;
4. Дать морфологическую характеристику гистоструктуры зон имплантации децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины и

консервированной твердой мозговой оболочки с тканями барабанной перепонки после мирингопластики в эксперименте с оценкой морфометрических данных.

Научная новизна:

Впервые дана комплексная оценка возможности применения децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины для пластики барабанной перепонки с морфологическим обоснованием с учетом данных морфометрии, иммунной реакции в ответ на имплантацию и на основании функциональной оценки состояния слуха перепонки после имплантации с целью закрытия дефекта.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Предложенный метод тимпаноластики позволяет получить адекватный доступ к структурам среднего уха в условиях эксперимента.

2. Оценка реакции иммунной системы макроорганизма в ответ на имплантацию биологического имплантата путем изучения циркулирующих иммунных комплексов различной молекулярной массы показало, что различий между опытными группами и с группой контроля не отмечаются.

3. Полученные количественные аудиометрические данные после миринголастики с применением децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины в эксперименте, продемонстрировали, что, суммарная величина пиков аудиограммы имеют статистически значимых различия с группой сравнения ($p=0,045$).

4. Сравнительный морфологический анализ показал положительную динамику репаративного процесса на всех сроках эксперимента, а также морфометрические показатели стадийно-фазового процесса заживления ткани регрессировали на 30 сутки в репрезентативном участке зоны имплантации после миринголастики децеллюляризованным матриксом ксенобрюшины.

Практическая значимость

Полученные результаты экспериментального исследования могут служить научной базой для обоснования потенциальной возможности использования децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины в клинической практике в качестве альтернативного материала для миринголастики

Полученные в ходе работы знания об особенностях репаративного процесса в зоне имплантации децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины с тканями барабанной перепонки на основании оценки состояния гистоструктуры раневого процесса с учетом результатов показателей морфометрии в репрезентативном участке зоны имплантации, позволит после проведения клинических исследований покрыть потребность в биологическом имплантате для лечения больных с хроническим отитом.

Внедрение в практику.

Получено свидетельство о государственной регистрации прав на объект авторского права от 31.12.2020г №14256 «Метод миринголастики с применением внеклеточного матрикса ксенобрюшины на кроликах»

(Приложение А).

Результаты экспериментального исследования дают основание рекомендовать проведение клинических испытаний о возможности использования децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины при мирингопластики в качестве клинического исследования в ЛОР- практике.

Отдельные результаты данной диссертационной работы, полученные в ходе исследования, были и внедрены в учебный процесс в рамках обучение ориентированного на исследования (RBL) для обучающихся по программе постдипломного образования (резидентура, магистратура, докторантура) кафедры хирургических болезней, так же кафедры патологии. Акт внедрения результатов НИР от 08.09.2022г. (Приложение Б).

Личный вклад автора

Диссертантом совместно с научным руководителем к.м.н., профессором Абатовым Н.Т. разработан новый метод мирингопластики с применением внеклеточного матрикса ксенобрюшины у лабораторных животных, на что получено свидетельство о государственной регистрации прав на объект авторского права.

Самостоятельно автором на базе вивария НАО «Медицинский университет Караганды» проведено экспериментальное исследование на 60 лабораторных животных (кроликах) с моделированием дефекта барабанной перепонки у экспериментальных животных, с последующим восстановлением барабанной перепонки путем использования в качестве имплантата децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины. Также соискателем осуществлялось наблюдение за экспериментальными животными, кормление и уход на всех этапах опыта до выведения животных из эксперимента. Самостоятельно осуществлена оценка аудиометрических данных слуха посредством регистрации нейроволновой активности мозга вызванной слуховой стимуляции потенциалов с помощью штатного программного обеспечения. После выведения животных из эксперимента соискателем произведен забор крови экспериментальных животных в пробирки для оценки реакции иммунной системы макроорганизма в ответ на имплантацию децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины. С целью оценки характера структурных изменений в зоне имплантации внеклеточного матрикса ксенобрюшины осуществлен забор материала ткани среднего уха для гистологического исследования лично автором.

Под руководством научного руководителя д.м.н., профессора Тусупбековой М.М. совместно проведено гистологическое исследование материала с описанием микроскопической картины полученных образцов ткани внеклеточного матрикса ксенобрюшины после завершения эксперимента. Единолично соискателем проведен морфометрический анализ клеточного инфильтрата зон имплантации гистологического материала, с подсчетом стромальных и клеточных структур с описанием гистологического материала с последующим микрофотографирование полученных объектов.

Весь материал систематизирован, документирован и оформлены все

главы диссертационной работы лично автором.

Апробация работы

Основные положения диссертации доложены и обсуждены:

- Международной научно-практической конференции ТГМУ им. Абуали ибни Сино (67-ой годичной) «Medical science of the xxi century – looking towards the future» (29 ноября 2019 Душанбе);
- I Международный MED-конгресс «Человек и здоровье. Мультидисциплинарный подход в медицине» (18-19 октября 2022 г. Семей);
- на расширенном заседании кафедры хирургических болезней и кафедры патологии НАО «Медицинский университет Караганды»;

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 4 научные работы, из них:

- 3 в научных изданиях, рекомендованных Комитетом по контролю в сфере образования и науки МОН РК;
- 1 публикация в международном научном издании, входящем в информационную базу Scopus:

Yesniyazov D., Tussupbekova M., Abatov N., Yukhnevich Y., Badyrov R. Myringoplasty with Morphological Rationale of Application of Xenoperitoneum Decellularized Matrix in Experiment // Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences. - 2021 Oct 05; №9(A):811-816.;

Полученное свидетельство о государственной регистрации прав на объект авторского права № 14256 от 31.12.2020г. «Метод мирингопластики с применением внеклеточного матрикса ксенобрюшины на кроликах».

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 98 страницах компьютерного набора текстового редактора Microsoft Word и состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методов исследования, главы собственных исследований, полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций. Диссертация имеет 4 приложения. Диссертация иллюстрирована 13 таблицами и 22 рисунками. Список литературы включает 106 источника на русском и английском языках.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Как известно причиной снижения слуха часто могут быть по различные травмы, воспалительные процессы, а также возрастное снижение слуха, что часто требует реконструктивные операции, направленные на улучшение звукопроводения. Слухоулучшающие операции позволяют восстановить поврежденные структуры наружного или среднего уха история которой имеет почти вековой период. В настоящее время существуют различные виды операции по улучшению слуха, среди них широкое внедрение получила тимпаноластика как приоритетный метод оперативного лечения начиная с 50-х годов прошлого столетия [34,35] для пациентов, страдающих постоянным снижением слуха и периодическим гноетечением. Впервые метод тимпаноластики был описан Уолстейном и Вольером в начале 1950 годы [36]. Следует отметить, что за последнее десятилетие техника и методы тимпаноластики претерпели значительные изменения, в основе которого легли различные модификации отохирургами с целью улучшения качество оперативного вмешательства и прогноза [37,4].

Как известно одной из основных причиной хронических отитов и как следствие снижения слуха, являются частые острые отиты, перенесенные в детстве, а также травматическое повреждение барабанной перепонки уже в более зрелом возрасте, что занимает значительное место в общей структуре заболевания среднего уха. Следует отметить, что при этом механические повреждения барабанной перепонки занимает ведущее место, по данным разных авторов составляет 32-70% всех травматических повреждений [1-3].

Существует утверждение, что острая посттравматическая перфорация барабанной перепонки закрывается самостоятельно в течение 7-10 дней, но более обширные дефекты барабанной перепонки, занимающие 1 и более квадрант, то есть более 25% от всей поверхности барабанной перепонки, приводят в хроническим мезотимпанитам [1,3-7,38]. Восстановление барабанной перепонки схоже заживлением кожных ран, однако отмечаются особенности, связанные со строением барабанной перепонки. Так, барабанная перепонка не имеет «матрицы», подложки для регенеративных процессов, в отличие от кожных покровов, что предотвращает приток репаративных клеток и питательных веществ для стимуляции фибробластной реакции [39]. Барабанная перепонка в большинстве случаев стремится к самостоятельному закрытию. В 70–75% случаев перфорация заживает тонкой мембраной, состоящей только из слизистой оболочки и плоского эпителия, в которой отсутствует средний слой [40-42].

Общеизвестно, что одной из причин хронизации процесса является некорректный выбор тактики лечения посттравматического среднего отита, в следствии которого происходило снижение слуха [34,43]. По настоящее время ещё не разработаны патогномичные признаки возможности закрытия дефекта барабанной перепонки без оперативного вмешательства. При этом следует полагать, что переход в хроническое течение отита обусловлена

сохранностью перфорации барабанной перепонки более 3-х месяцев [9,10].

В настоящее время известно ряд способов, а также материалов для закрытия дефектов барабанной перепонки, по которым имеются неоднозначные результаты. Таким образом, современное состояние проблемы диктует необходимость дальнейшего поиска адекватных материалов для быстрого и более эффективного заживления барабанной перепонки [21].

Учитывая морфофункциональное и физиологическое состояние барабанной перепонки, которая отграничивает наружный слуховой проход от барабанной полости выполняет защитную роль. Как известно, что тимпанальная мембрана является началом звукопроводящего аппарата уха, передает звуковую волну на цепь слуховых косточек к внутреннему уху, а ее повреждение служит причиной нарушения слуха [44]. Наличие дефекта барабанной перепонки снижает функцию звукопроводящего аппарата, так же обеспечивает постоянное инфицирование барабанной полости. После закрытия дефекта барабанной перепонки создаются условия для профилактики вторичного инфицирования, а также рецидива воспалительного процесса в среднем ухе [20].

На сегодняшний день нет единого взгляда отоларингологов на тактику лечения посттравматических дефектов барабанной перепонки. По данным анализа доступной нам литературы можно отметить, что некоторые исследователи не видели целесообразности в раннем хирургическом закрытии дефекта, другие же специалисты придерживались раннего тактики хирургического лечения в остром периоде травмы как «экстренная миринопластика». Выбор данного вида операции обосновывался технической простотой метода, а также доступным расправлением и сопоставлением обрывков барабанной перепонки, и их фиксацией [1,10].

Оперативное лечение перфораций барабанной перепонки по данным зарубежных авторов, имеет высокую эффективность и составляет 67-98% [45]. Вероятность послеоперационных осложнения в виде глухоты оперированного уха оценивают в 1-2%. При сухом перфоративном среднем отите, даже при субтотальных дефектах наблюдаются хорошие результаты после тимпаноластики до 93,3% [9,35]. Обязательным условием для успешной миринопластики является отсутствие выделений из уха в течение 3 месяцев [46,47].

На сегодняшний день существует множество способов закрытия перфорации барабанной перепонки при острых посттравматических отитах с применением ауто- и аллотрансплантатов [6], но при этом всё ещё остается актуальной проблемой вопросы хирургического и без хирургического восстановления целостности барабанной перепонки, различными тканями, как собственными, так и трансплантатами.

Поиск оптимальных материалов похожих по своему строению тканей для аутопластики при закрытии дефектов барабанной перепонки является одним из нерешенных вопросов в отоларингологии. Причина состоит в том, что

барабанная перепонка не имеет однородных по своему строению тканей в человеческом организме [13,14].

Следует отметить, что закрытие небольших перфораций барабанной перепонки проходили успешно, однако, возникали проблемы закрытия субтотальных и тотальных дефектов тимпанальной мембраны. Так, относительно высокий процент сохранности нарушения слуха было отмечено в 10,8%-28,6% наблюдениях по данным значительного числа экспериментальных исследований и клиническим наблюдениям, среди них работы таких авторов, как Мишенькин Н.В. (1975), Преображенский Н.А. (1978), Сушко Ю.А. (1978), Едрев Г. (1989), Ситников В.П., Кин Т.Н. (1990), Пятякина О.К. (2002), Gerard J.M. (2003), Tos M. (2004), Chang C.Y. (2005).

Известно, что в клинической практике используются различные пластические материалы: фасция височной мышцы, хрящ и надхрящница, периост, слизистая оболочка щеки, слизистая оболочка тонкой кишки, носовая перегородка, стенка вены, твердая мозговая оболочка, амнион, склера, культура аллофибробластов человека, полимерные имплантаты, двух и трехслойные трансплантаты различного состава [7,15-21]. Однако перечисленные трансплантаты зарекомендовали себя как с достаточной эффективностью, так и с существенными недостатками, выявленными в многолетней клинической практики, так и в клинических испытаниях. Среди возможных осложнений чаще всего встречается отторжение трансплантата, рассасывание коллагеновых волокон, смещение лоскута, либо полностью не закрывают дефект барабанной перепонки, а также рубцевание, либо сращение с медиальной стенкой барабанной полости, так же не редко встречаются нагноение и рецидив дефекта барабанной перепонки, что в следствие ведет к снижению слуха [22-25]. Описанные осложнения создают условия необходимости в дополнительной операции, потребность в общем наркозе и увеличение длительности пребывания пациентов в условиях стационара. Поэтому отоларингологами продолжается поиск и разработка новых высокоэффективных материалов для восстановления целостности барабанной перепонки [23].

Поиск альтернативных материалов с целью снижения риска послеоперационных осложнений, улучшения функциональности среднего уха и как следствие, улучшение качества жизни пациента, привели к поиску и изучению использования имплантатов биологического происхождения. Общеизвестно, что биологические имплантаты получают из донорского материала человека (аллогraft) или животного (ксенографт: свиной, бычий). Состоят биологические имплантаты из внеклеточного коллагенового матрикса, которые обладают способностью встраиваться в цепь общефизиологического метаболизма, в связи с чем они могут предопределять сбалансированность репаративного процесса, при котором не происходит развитие воспалительного ответа на имплантат и реакции иммунологического отторжения [24].

Как отмечалось, в отоларингологии существуют множество различных

материалов для закрытия дефектов барабанной перепонки, которые разделены на основные группы: ткани самого больного – аутотрансплантаты, ткани умершего человека – аллотрансплантаты, ткани животных – ксенотрансплантаты и материалы небиологического происхождения – имплантаты [16], каждый из них имеет право на применения в качестве имплантата.

1.1 История использования аутотрансплантатов в практике отохирургии.

Аутотрансплантаты в отохирургии используются наиболее часто, среди них такие как фасция височной мышцы, хрящ, надхрящница, надкостница, слизистая оболочка щеки [1,14,15]. Аутофасции височной мышцы, как наиболее близкий по природе к барабанной перепонке используется чаще чем, хрящ, надхрящница или надкостница. Однако при этом фасции височной мышцы имеет ряд неудобств при использовании, так как необходимо не только заготовить, но и тщательно обработать листок фасции определенных размеров, что удлиняет сроки оперативного вмешательства.

Установлено, что использование фасции височной мышцы при мирингопластики не всегда обеспечивает ожидаемый анатомо-морфологический и функциональный результат. При этом отмечено, что имеет место удлинение сроков процесса заживления, при рубцевании отрицательным моментом является рассасывание коллагеновых волокон, что служит причиной неполного закрытия дефекта барабанной перепонки. Наряду с этими осложнениями выявлено смещение лоскута, сращение с медиальной стенкой барабанной полости, латерализация передних отделов, а также образование ретракционных карманов и затупление меатотимпанального угла. Кроме того, нежелательным эффектом является атрофия мягкотканых трансплантатов, или же формирование дряблого рубца, что безусловно оказывает значительное влияние на снижение функции барабанной перепонки и эффективность самой операции. Перечисленные возможные осложнения и нарушение функции слухового аппарата, состояние имплантата послужили поводом, что в последние годы мягкотканые трансплантаты, вытесняются более жесткими материалами: многослойные, обеспечивающие достижение лучших морфологических результатов [21].

Второй по популярности материал для мирингопластики в группе аутотрансплантатов, это перихондрий ушной раковины или козелка. Для взятия материала требуется дополнительный хирургический доступа, что так же удлиняет время оперативного вмешательства, а материал может быть ограничен в количестве.

Анализ доступной литературы показал, что известны ряд исследования, основывается на сравнении различных аутоматериалов для мирингопластики. В 2013 году О.В. Салий с коллегами провели исследование с использованием различных материалов для мирингопластики. Авторами было прооперировано

152 пациента в период с 2009 по 2012 год. В качестве материала для закрытия дефекта барабанной перепонки использовали фасцию височной мышцы у 64 пациентов (43%) или надхрящично-хрящевой трансплантат из козелка – 88 пациентов (57%). Результаты оценивали по двум критериям: функциональный и морфологический результат. Через 3 и 6 месяцев оценивали отоскопическую картину барабанной перепонки (наличие реперфорации, ретракционного кармана), а также аудиологическую картину по четырем основным частотам: 500, 1000, 2000, 4000 Гц. У пациентов, с надхрящично-хрящевым трансплантатом, реперфорация после тимпаноластики наблюдалась в 3 случаях (3%), ретракционного кармана не выявлено ни в одном случае через 3 и 6 месяцев одинаково. У пациентов, с трансплантатом из фасции височной мышцы, реперфорация после тимпаноластики наблюдалась в 17 случаях (27%) через 3 месяца, в 9 случаях (15%) через 6 месяцев (самопроизвольное закрытие реперфорации в результате репаративных процессов). Ретракционный карман через 3 месяца не обнаружен, через 6 месяцев он был выявлен в 8 случаях (14%).

По итогам аудиограммы до операции различий в группах не было, т. е. группы были идентичны. По результатам после операции, можно утверждать, что как надхрящично-хрящевой, так и фасция височно-мышечный трансплантат обладают хорошими звукопроводящими свойствами. Однако надхрящично-хрящевой трансплантат, является более стабильным, и более пригодным для восстановления барабанной перепонки [12].

Исследование, описанное зарубежными коллегами Mohanty, Sanjeev et al. (2018), которые проводились с 2012 по 2016 год, где были включены всего 187 пациентов, из них 168 пациентов с перфорациями в передних квадрантах. Хрящевой трансплантат из козелка использовался у 87 пациентов, фасция височной мышцы у 100 пациентов. У пациентов с хрящевым трансплантатом из козелка показатели приживления были выше 91,95%, в то время как у фасции 79% [48]. Однако в силу использования нескольких разнородных тканей сформированная барабанная перепонка по своим физическим и акустическим свойствам отстает от естественной, что неизбежно отражается на функциональном результате операции. [18].

Имеются так же исследования с применением перихондрий ушной раковины или козелка. С января 2006 г. по январь 2008 г. коллегами из Турции Sağataу Nan Ulkü были ретроспективно рассмотрены. Пациенты перенесших операцию по поводу первичной тимпаноластики 1 типа с хрящом ушной раковины 23 человека, их сравнили с 17 пациентами перенесших такую же операцию тимпаноластику 1 типа с трансплантатом фасция височной мышцы. В исследование были включены пациенты, у которых единственной патологией была субтотальная перфорация барабанной перепонки с сохранением цепи слуховых косточек. Предоперационные и послеоперационные результаты аудиограмм, предоперационная и послеоперационной отоскопия в обеих группах. Частота анатомического

закрытия перфорации барабанной перепонки в группе хряща ушной раковины и фасции височной мышцы составила 91,3% и 88,2%, соответственно [49].

Проведенные ретроспективные исследования Sarah A Lyons et al. (2014) по сравнению эффективности хряща ушной раковины и фасции височной мышцы при тимпанопластике 1 типа, для закрытия субтотальной перфорацией барабанной перепонки у взрослых пациентов с хроническим средним отитом, показали, что с точки зрения анатомического закрытия перфорации хрящ ушной раковины преобладал над фасции височной мышцы составила 92,6% и 89,4%, соответственно. Однако звукопроводение во второй группе было лучше, которая варьировалась от 5,7 до 11,5 дБ в группе хряща ушной раковины и от 8,9 до 12,7 дБ в группе фасции височной мышцы [50].

Похожее исследование были проведены коллегами из Турции K. Onal et al. (2011), когда были включены случаи первичной тимпаноластики с субтотальной перфорацией, неповрежденной цепочкой слуховых косточек, сухим ухом в течение как минимум одного месяца. Тимпаноластика с применением фасции височной мышцы была проведена 41 пациенту, с применением хряща ушной раковины - 39. Показатель успешности трансплантации составил 65,9% в группе с использованием фасции височной мышцы и 92,3% - хряща ушной раковины. Однако акустические свойства в группе фасции были значительно выше; средний порог воздушной проводимости составил $28,54 \pm 14,20$ дБ для группы фасции и $22,97 \pm 8,37$ дБ для группы хряща, в то время как порог костной проводимости средний составлял $11,71 \pm 8,50$ дБ для группы фасции и $7,15 \pm 5,56$ дБ для хрящевой группы [51].

В 2012 году в Канадском журнале «Canadian Society of Otolaryngology - Head & Neck Surgery» команда ученых Emily Iacovou et al., опубликовали исследование сравнив так же два популярных ауто трансплантата: фасции височной мышцы и хрящ ушной раковины при тимпаноластики 1 типа. Исследование было ретроспективное, критерии отбора включали перфорацию барабанной перепонки после хронического среднего отита или травмы, целостность цепи слуховых косточек, сухое ухо не менее 3 месяцев, и отсутствие воспаления слизистой среднего уха. Всего было включено 69 пациентов из них 39 пациентов тимпаноластика 1 типа с применением хрящ ушной раковины и 30 пациентов с применением фасции височной мышцы. Полное закрытие перфорации барабанной перепонки с применением хряща ушной раковины составила 97,4%, с фасцией височной мышцы 93,3%. Снижение воздушно-костного разрыва в пределах 10 дБ было достигнуто у 73,7% пациентов с применением хрящ ушной раковины, по сравнению с 67,9% пациентов с применением фасции височной мышцы. Так же было замечено улучшение слуха от 21 до 30 дБ в порогах воздушной проводимости, что выявлено у 65,8% пациентов, с применением хряща ушной раковины, и у 60,7% с применением фасции височной мышцы [52].

В 2018 году команда ученых Ejder Cığer et al., сравнили анатомические и функциональные результаты двух разных трансплантатов, используемых для реконструкции субтотальных или тотальных перфораций барабанной

перепонки: композитный хрящевой трансплантат и фасция височной мышцы. В исследовании участвовало 90 пациентов, перенесших тимпанопластику 1 типа по поводу неосложненного хронического среднего отита в период с марта 2014 г. по июнь 2016 г. Показатели успешности трансплантата через 6 месяцев после операции, составили 85,1% с применением фасции височной мышцы и 97,7% с применением композитного хрящевого трансплантата. Через год показатели успеха составили 82,9% для фасции височной мышцы и 97,7% для композитного хрящевого трансплантата [53].

Так же использование композитного хряща в качестве материала для закрытия дефекта барабанной перепонки описано в работе А М Abdelghany. Исследование проводилось с января 2009г. по май 2011г., им были произведена оценка нового для композитного хрящевого трансплантата. Материалом сравнения использовали фасцию височной мышцы. В исследовании участвовало 95 пациентов в возрасте 14-42 лет с центральной неосложненной перфорацией барабанной перепонки с полностью визуализированными краями перфорации, площадью менее 25% барабанной перепонки. Основные критерии оценки трансплантата: послеоперационный статус барабанной перепонки, улучшение слуха, и частота осложнений через 12 месяцев после операции. Результаты, полученные в ходе исследования, в группе композитного хрящевого трансплантата закрытие барабанной перепонки через год после операции составило 97%, а средний прирост воздушно-костного разрыва составил 10,18 ($\pm 5,4$) дБ. Данное исследование показало, что методика пуговичного трансплантата является эффективной и быстрой альтернативой для закрытия небольшого дефекта барабанной перепонки, если возможна полная визуализация края [54].

Наиболее часто используются трансплантаты фасция височной мышцы, хряща ушной раковины или козелка, но фасция по-прежнему является предпочтительным материалом для большинства пациентов. Однако хрящевые трансплантаты предпочтительны с более обширными перфорациями, дисфункции слуховой трубы, ретракционными карманами, а также перфорации передних отделов барабанной перепонки [55,56]. Стоит отметить что хрящевой трансплантат используется и в менее обширных перфорациях с техникой *underlay* и *overlay*, как эндауральным, так и заушным доступом [57]. Однако данные техники связаны с более высоким риском несостоятельности трансплантата из-за недостаточной стабилизации трансплантата и плохого кровоснабжения и последующее нарушение закрытия краевых перфораций [58,59].

Как показывает практика использование фасции височной мышцы и хряща ушной раковины или козелка при тимпанопластике довольно эффективно, однако отохирурги стали использовать комбинированные трансплантаты височной фасции и хряща ушной раковины. В 2020 году были опубликованы материалы автором Zheng Cai Lou, исследование проводилось с 2014 по 2018 год. Критерии включения ими были пациенты старше 18 лет с односторонней перфорацией барабанной перепонки и неповрежденной цепью

слуховых косточек. Вошли в исследование пациенты с подозрением на разрыв цепи слуховых косточек. Целью исследования авторов было провести сравнение хирургических результатов эндоскопической мирингопластики с использованием двухслойных хрящево-надхрящичных трансплантатов и одинарных трансплантатов височной фасции. В исследование участвовало 134 пациента, перенесших эндоскопическую мирингопластику. Пациенты были разделены на 2 группы в соответствии с трансплантатом: двухслойный хрящ-надхрящник и трансплантат фасции височной мышцы. Результаты показали успешность двухслойных хрящево-надхрящичных составил 97,0% а в группе фасции височной мышцы 85,1%. Тем не менее, отдаленные результаты качества слуха были одинаковыми для однослойного и двухслойного закрытия [60].

В работах О.Г.Хоров, Д.М.Плавский (2010) показано применение двухслойного трансплантата, в состав которого входила хрящевая пластинка. На основании наблюдения за пациентами, в период с 2007 по 2009 год после тимпаноластики при обширных дефектах барабанной перепонки. Авторами был отмечен хороший клинико-морфологический результат, так в первой группе с тотальным дефектом барабанной перепонки у 95,4%, во второй группе исследования - с субтотальным дефектом барабанной перепонки положительные результаты отмечены у 94,4%. При этом при отоскопии в обеих группах наблюдений было отмечено первичное приживление трансплантата [6].

Поиск более оптимального трансплантата для закрытия перфорации барабанной перепонки от двухслойного трансплантата привели к трехслойному трансплантату Dae Wo Shim et a. Такие исследования состоялись в период с ноября 2005года по июнь 2011года, включавшие в общей сложности 234 пациента с перфорацией барабанной перепонки. Анатомический успех исследования определялся как интактная восстановленная барабанная перепонка, а функциональный успех - как значительное уменьшение количества воздушно-костного разрыва до и после операции. Кроме того, был проведен анализ частоты встречаемости различных осложнений. Так, в результате анатомический успех составил 93,2%, уровень функционального успеха в среднем через 1 год, что соответствовало 73,5%, послеоперационный средний воздушно-костный разрыв был $15,4 \pm 1,4$ дБ в сравнении с дооперационным воздушно-костным разрывом ($20,6 \pm 12,1$ дБ), послеоперационные осложнения встречались в 7,7% наблюдений [61].

Известно, что использовались и другие ауто трансплантаты, так в 2006 году Н.А.Дайхес с коллегами после расправления краев перфорации фиксировали их жировым трансплантатом, взятым из мочки уха. Положительные результаты ими были отмечены у 88,4% пациентов с острыми перфорациями барабанной перепонки, однако данное исследование не получило применение в закрытии перфорации при хронических формах среднего отита [34].

По клиническому применению аутотранспланта из слизистой оболочки щеки нет, по настоящее время, нет достаточно убедительных клинических исследований. Однако не редко встречаются сообщения, когда были случаи применения данного биологического имплантата в 2014 году И. В. Решетовым, который описал случай использования этого биологического материала не только в ЛОР практике, а также в хирургии головы и шеи [62].

1.2 Методологические подходы оценки эффективности использования аллотрансплантантов в отохирургии

Учитывая современное состояние медицинской науки с мультидисциплинарным подходом совместно со смежными специалистами и развитием тканевой инженерии появилась возможность более широкого применения аллотрансплантантов в отохирургической практике.

Так, в 1990 году исследователи В.П.Ситников, Т.Н.Кин использовали в своей практике трехслойные трансплантаты, полученного с пластинки ультратонкого реберного аллохряща, фасции височной мышцы, амниона. Известно, что с 2000 года в Санкт-Петербургском научно-исследовательском институте уха, горла, носа и речи имела практика использования ультратонкого аллохрящевого имплантата при закрытии обширных дефектов барабанной. По данным авторов, в исследовании приняли участие 165 пациентов с перфорациями барабанной перепонки различной степени. Срок наблюдения составил более трех лет, при этом с результатами «хорошим» и «удовлетворительным» было 65,3% наблюдений в подгруппе после мирингопластики и 60,7% - в подгруппе после мирингопластики, как завершающего этапа тимпанопластики. Результаты качественного состояния слуха было распределено следующим образом: «хороший» слух у 21,8% пациентов первой и 21,4% - второй подгрупп, «удовлетворительный» получен у 43,5% первой и 39,3% пациентов второй подгрупп [63].

В 1990 году профессор В.И. Родин, С.К. Боенко, Ю.Н. Ткач описали метод тимпанопластики с использованием твердой мозговой оболочки эмбриона. В отохирургии данный метод применяется и в наши дни. Трансплантаты брали от эмбрионов, полученных во время искусственных родов, которые помещали в 70% этиловый спирт, затем переносили в раствор Рингера-Локка. Биоматериал хранили до 3 месяцев при температуре 4 градуса по Цельсию. На кафедре оториноларингологии Донецкого медицинского университета в исследовании участвовали 31 пациент с перфорациями барабанной перепонки, из них 14 больных прооперированы в амбулаторных условиях, 17 человек в условиях стационара. По результатам исследования в обеих группах были получены хорошие результаты. При этом средний прирост слуха составил 29-+3дБ [64].

В 2001 году была опубликована статья с использованием бесклеточного кожного аллотрансплантата «AlloDerm» для восстановления перфорации барабанной перепонки. Данное исследование проводилось Douglas W. et al., в эксперименте на 28 шиншиллах. Исследование показало при использовании

«AlloDerm» у 78 % через 5 до 6 недель было полное закрытие барабанной перепонки. Кроме того, гистологическая оценка зажившего барабанные перепонки продемонстрировало, что бесклеточный аллотрансплантат «AlloDerm» был включен в фиброзный слой барабанной перепонки [65].

В 2007 году В.И. Щетинин оценил эффективность применения трансплантата из пуповины человека «Отопласт». Клиническое исследование проводилось на 120 больных, в отделении оториноларингологии клинической больницы №1 г. Оренбург. Обследовали пациентов в возрастной группе от 17 до 63 лет. В послеоперационном периоде заживление перфорации наступало в среднем в течение 7–10 дней, что значительно сократило нахождения больных в условиях стационара [66].

В 2007 году вышла статья, автор которой Alan Johnson et al., в исследовании изучали использование бесклеточного кожного аллотрансплантата «AlloDerm» для восстановления перфорации барабанной перепонки, в эксперименте на шиншиллах. В эксперименте участвовало 15 животных, модель перфорации барабанной перепонки делали на обеих ушах. Результаты эксперимента показали закрытия перфорации в 85% наблюдений [67].

В 2008 году В.П.Карповым на базе ГОУ ВПО «Ставропольской государственной медицинской академии Росздрава» описал новый биологический трансплантат «Аллоплант» для применения при хронических перфоративных отитах в отоларингологии. Данный материал «Аллоплант» готовится из соединительной ткани. Донорскую ткань освобождают от мышечной ткани и жировой клетчатки, обрабатывают анионными и катионными детергентами. Смешивают с консервантом и стерилизуют, полученный материал подвергают бактериологическому контролю. В исследовании участвовало 180 человек, распределенных случайным образом на основную и контрольную группу. Подводя итоги раннего послеоперационного периода у пациентов с применением «Аллоплант» и контрольной группы фасция височной мышцы, принципиальных отличий в обеих группах не выявлено. В послеоперационном периоде через 6 месяцев полное закрытие дефекта наблюдалось в группе с применением «Аллоплант» у 94,4% больных, а в контрольной группе у 90% больных [17].

В период с октября 2012 года по сентябрь 2014 года группа ученых N. Ahilasamy et al., провели исследование на 60 пациентах, которым выполнялась тимпанопластика I типа с использованием аллотрансплантата из хряща носовой перегородки консервированный спиртом. Показатели успешности данного имплантата были, полное закрытие перфорации барабанной перепонки улучшение слуха. По истечении 6 месяцев 57 пациентов (95%) имели интактную барабанную перепонку. Среднее улучшения слуха в послеоперационный период у пациентов повысилось на 11,83 дБ. [68].

В 2012 году коллеги He Qin et al., из центра оториноларингологии

хирургии головы и шеи г. Пекин, Китай, провели экспериментальное исследование на 50 морских свинках с acellular dermal matrix (ADM). Результаты экспериментального исследования показали, что ADM имеет хорошие репаративные качества. Через 8 недель после операции 47 экспериментальных животных показали полное закрытие барабанной перепонки [69].

В период с 2013 по 2017 год на кафедре оториноларингологии - хирургия головы и шеи, медицинской школы Икан, штат Нью-Йорк, США. Под руководством Christine Barron et al., проведено ретроспективное исследование целью которого было оценить влияние аллотрансплантата и ксенотрансплантата в педиатрической практике при тимпанопластики на исходы пациентов. Данное исследование показало, что, одинаковая частота осложнений наблюдалась среди аутоотрансплантатов, ксенотрансплантатов и аллотрансплантатов, обеспечивая предварительные доказательства того, что они безопасны для использования в детской отохирургии [70].

Группа ученых J M Lee et al., в 2018 году опубликовали статью с использованием бесклеточного кожного аллотрансплантата «MegaDerm». Был произведен сравнительный анализ «MegaDerm» с перихондрий козелка, в проспективном рандомизированном контролируемом исследовании из 60 пациентов, которым была произведена тимпанопластика. В группе с аутоотрансплантатом было 33 пациента, или группу бесклеточного дермального аллотрансплантата 27 пациентов. Показатели успешности трансплантата, были полное закрытие перфорации барабанной перепонки, пороги воздушной проводимости и воздушно-костный разрыв. Полное закрытие барабанной перепонки было аутоотрансплантат 75,8%, против аллотрансплантат 85,2%, пороги воздушной проводимости и воздушно-костный разрыва $38,7 \pm 15,9$ дБ до $30,2 \pm 15,6$ дБ, и от $17,8 \pm 7,3$ дБ до $11,5 \pm 7,0$ в группе аутоотрансплантат, а и от $30,4 \pm 12,2$ дБ до $24,5 \pm 13,0$ дБ и от $14,3 \pm 5,1$ дБ до $7,6 \pm 4,6$ дБ в группе аллотрансплантата. Среднее время операции было значительно ниже в группе бесклеточного дермального аллотрансплантата 35,2 мин против 27,4 мин. В данном исследовании было показано, что бесклеточный дермальный аллотрансплантат «MegaDerm» является эффективной альтернативой аутоотрансплантатам с аналогичными показателями успешности и послеоперационными результатами слуха, но с меньшим временем оперативного вмешательства [71].

Проводя обзор литературы, мы обратили внимание, что «AlloDerm» является самым часто употребляемым аллотрансплантатом для тимпанопластики. В клинике Медицинского университета Вэньчжоу, Китай, было проведено ретроспективное исследование с июля 2017 г. по апрель 2018 г. В котором участвовало 61 пациент с хронической сухим мезотимпанитом. Пациенты были разделены на две группы в соответствии с используемым имплантатом, 27 пациентов с бесклеточный дермальный аллотрансплантат «AlloDerm» 34 пациента с использованием надхрящницы хряща. Через 6 месяцев после операции полное восстановление барабанной перепонки

составила 88,9% для группы с использованием дермальный аллотрансплантат «AlloDerm» и 82,4% для группы с использованием надхрящницы хряща. Что касается аудиометрических результатов, предоперационная средняя аудиограмма составила 27,82±9,14 дБ в 1-й группе 24,62±9,30 дБ во 2-й группе. Послеоперационный средняя аудиограмма составила 17,50 дБ в группе 1 и 10,625 дБ в группе 2. Продолжительность операции была немного короче в группе трансплантата AlloDerm [72]. Следует отметить, что использование «AlloDerm» по-прежнему остаются актуальными, так как по настоящее время проводятся исследования по поиску новых биосовместимых материалов.

1.3 Исторические аспекты использования ксенотрансплантатов к практике отохирургии

В последние десятилетие бурное развитие тканевой инженерии оказало существенное влияние на внедрение использования ксенотрансплантатов в отохирургии.

Группой исследователей в 1994 году (В.Д.Меданьин М.Н.Мельников Е.Е.Чевагина) было проведено экспериментальное обоснование применения консервированного реберного хряща свиньи. Суть эксперимента заключался в том, что эксперимент проводился на беспородных собаках, которым осуществлено 96 пересадок хрящевой ткани. Выделены 2 группы животных, участвовавших в эксперименте с ксенотрансплантатами: первая – консервированный реберный хрящ свиньи (основная группа) и вторая группа - консервированный хрящ эмбрионов крупного рогатого скота (контрольная группа). В целом, экспериментальные исследования продемонстрировали вполне удовлетворительные качества консервированного реберного хряща свиньи как пластического материала, пригодного для реконструктивной хирургии в оториноларингологии. Необходимо отметить, что материал не вызывал реакций отторжения на инородное тело, что позволяла оценить его пластические свойства как высокие. Однако исследования не подтвердили полной пригодности хрящевых ксенобрефотрансплантатов как пластического материала, вследствие вызываемых их пересадкой клеточных реакций, дистрофических проявлений в пересаженной ткани, частичного рассасывания регенерата [73].

Badylak S.F. с соавторами исследовал биоматериал из слизистой оболочки тонкого кишечника свиньи (SIS-the small intestinal submucosa) в 1989 году, первоначально SIS использовался как материал для сосудистого трансплантата [39]. Spiegel и Kessler изучили использование этого трансплантата в эксперименте на шиншиллах, получив хорошие результаты - нет отторжения трансплантата, нет очевидной антигенности и отсутствие признаков передачи инфекционных заболеваний. Так же они описали легкость использования работы и недорогую стоимость по сравнению с другими материалами, которые используются при тимпанопластике [74].

Биоматериал из слизистой оболочки тонкого кишечника свиньи (SIS-the small intestinal submucosa) изучали Jeffrey H. et al., в 2005 году Boston,

Massachusetts, U.S.A. В эксперименте была создана модель хронической перфорации барабанной перепонки, на 10 взрослых шиншилл, на каждом уже всего 20 перфораций. Каждому животному была произведена тимпанопластика 1 типа, на оба уха в одном ухе с использованием биологического материала аутологичный хрящ ушной раковины, на втором ухе слизистой оболочки тонкого кишечника свиньи (SIS-the small intestinal submucosa). Во время создания модели хронической перфорации барабанной перепонки все 20 перфорации самостоятельно не закрылись после 8 недель наблюдения. После проведенной тимпаноластики 1 типа с материалом SIS через 6 недель показало 100% заживление, тогда как, с использованием биологического материала аутологичный хрящ ушной раковины заживление показало 60% [75].

Известны работы D'Eredita (2015) по рандомизированным контролируемым исследованием, где был проведен сравнительный анализ использования SIS-the small intestinal submucos с аутофасцией височной мышцы для миринголастики у детей. Результаты исследования показали, что положительный эффект закрытие перфорации для обоих материалов. Среди выявленных преимуществ следует отметить, что SIS – это простота использования, потенциальные проблемы с аллотрансплантатом человека, отрицательные моменты — это риск передачи инфекция из-за скрытых очагов [76-78].

Известны исследования с использованием биоматериала из слизистой оболочки тонкого кишечника свиньи (SIS-the small intestinal submucosa) на людях, проведенные с 2016 по 2017 год, группой ученых под руководством Robert J Yawn et al. В исследовании участвовало 37 пациентов со средним возрастом 25 лет, 57% из которых были мужчины. Тимпанопластика эндоскопическая с использованием SIS в качестве прививочного материала была выполнена в 26 случаях (70%) пациентов, в 34 случаях (92%) произведена сопутствующая пересадка хряща. Мастоидэктомия выполнена 10 пациентам (27%). Показания для у 20 пациентов (54%) была перфорация и холестеатома, у 17 пациентов (46%). Самый распространенный расположением участками холестеатомы были эпитимпанум, пять пациентов (29%) и мезотимпанум пять пациентов (29%). У четырех пациентов (24%) были голотимпанальные холестеатомы. У двух пациентов (12%) были гипотимпанальные холестеатомы, и у одного пациента (6%) была холестеатома в протимпанум. Двадцать два случая (59%) были первичная тимпанопластика и 15 пациентов (41%) - повторные. Средний размер перфорации по оценке отомикроскопии составил 39% (диапазон, 15–90%). SIS - эффективный материал для трансплантации барабанной перепонки и восстановления барабанной перепонки при перфорации или после холестеатомы [79].

В 2009 году была опубликована интересная статья группой авторов под руководством Zhihong Deng. Исследование было экспериментальным, на морских свинках. Целью этого исследования было оценить возможности применения бесклеточной дермы и твердой мозговой оболочки свиней, при

мирингопластики. Оба материала были получены последовательным использованием Тритона X-100, раствора нуклеазы и сублимационной сушки. Гистологически оба материала имели пористую структуру без каких-либо ячеистых компонентов. В ходе эксперимента оба материала показали возможность в использовании в качестве каркасов для восстановления барабанной перепонки *in vitro*. В эксперименте *in vivo* модели хронической перфорации барабанной перепонки были успешно созданы на морских свинках. Большинство перфораций барабанной перепонки были восстановлены после трансплантации этих двух биоматериалов. Кроме того, аудиометрия слухового ствола мозга использовалась для определения слуховой порог в каждой группе. Результаты показали, что слух в группе твердой мозговой оболочки, подвергся более быстрое восстановление на ранней стадии, но в конце не было обнаружено различий между двумя группами [80].

В 2011 году А.М. Хакимов, профессор кафедры оториноларингологии Ташкентской медицинской академии с соавторами описал новый ксеногенный биологический материал из перикарда овцы. Исследование было проведено на кроликах. В выборку входило 28 экспериментальных животных. Результаты экспериментальных исследований показали: отторжение трансплантата – 3,57%, выпадение трансплантата в барабанную полость – 3,57%, неполное заживление трансплантата – 3,57%. Клиническое исследование составляли 54 больных, с ксенотрансплантатом из перикарда овец. Контрольная группа 23 пациента, с применением фасции височной мышцы. Результаты при мирингопластике прооперированных больных показывают закрытие барабанной перепонки полностью у 88,9% с применением ксенотрансплантата из перикарда овцы, а в контрольной группе пациентов – в 86,95% случаев полного закрытия дефекта барабанной перепонки [19].

В 2013 году группа ученых Clotilde de Dorlodot et al., опубликовали статью с использованием ксенотрансплантат перикард крупного рогатого скота. Данное исследование выполнялась одним и тем же хирургом в период с апреля 2005 г. по май 2013. Перфорация барабанной перепонки была вторичной, без холестеатомы, и нарушения цепи слуховых косточек. Размер перфорации не превышали одной трети поверхность барабанной перепонки. Всего было проведено 106 мирингопластик, 66 с Tutorpatch и 40 с перикардом КРС со средним сроком наблюдения 16,5 и 5,2 месяца, соответственно. Показатели успешного закрытия Tutorpatch и перикардом КРС 75,8% ($P < 0,0001$) и 85,0% ($P < 0,0001$) соответственно. В статье описано, что оба метода обеспечивают хорошие анатомические и функциональные результаты [81].

Известны экспериментальное исследование, проведенное в 2016 году в Оренбургском государственном медицинском университете коллективом кафедры ЛОР болезней под руководством профессора Долгова В.А., которые применяли наноструктурированный биологический материал на основе

гиалуроновой кислоты. Эксперимент проводился на 7 беспородных собаках, из эксперимента животных выводили через 2 недели. Результаты исследования показали, что у 6 животных наблюдалась полное закрытие дефекта барабанной перепонки, у одного экспериментального животного после проведенной операции наблюдалось отторжение уложенного биоматериала. Учитывая не большую выборку в эксперименте данный биоматериал показал положительный эффект использования данного материала в эксперименте [27].

В 2016 году Долгов В. А. коллегами опубликовали доклад на XIII конгрессе МАМ, где указано, что на 30 собаках был воспроизведён односторонний экспериментальный хронический гнойный средний отит. Через 40 суток после моделирования хронического гнойного отита проводили лечение животных до получения «сухого уха» со стойкой перфорацией барабанной перепонки. После завершения лечения животным производилась миринопластика с использованием для закрытия дефекта в барабанной перепонке биоматериала «Гиаматрикс», созданного на основе гиалуроновой кислоты. По срокам выполнения миринопластики (через 2, 3, 4, 12 и 24 недели) животные были разделены на 5 групп (по 6 собак в каждой группе). Результаты гистологического исследования показали, что оптимальными для миринопластики являются первые 2 недели после прекращения воспаления в среднем ухе, поскольку пролиферативная активность эпителиальных тканей барабанной перепонки в этот период ремиссии оказалась максимальной, а в соединительнотканной основе барабанной перепонки в этот период отмечен активный синтез межклеточного вещества фибробластами. Это обеспечивало оптимальное развитие репаративных процессов, способствующее органотипическому и гистиотипическому восстановлению дефекта барабанной перепонки [82].

В 2017 году S.H.Kim с авторами произвели экспериментальное исследование используя биоматериал, полученный из тканей утиных лап. Полученный материал имел название (DCF duck's collagen film patch) и представляет собой коллагеновый пластырь, который как описывают авторы был очень легко применим. Эксперимент проводился на 24 лабораторных крысах, 14 из которых применяли DCF. Исследование показало, что пластырь DCF является биосовместимым материалом, и может вызывать быстрое заживление при перфорациях барабанной перепонки [83].

Однако, существование известных биоимплантатов не решает все вопросы, связанные с их применением в отохирургии. По настоящее время нет единого мнения об условиях и сроках использования биологических имплантатов, скудна информация об отдаленных результатах их применения. Не решенным остается вопрос, какое первичное сырье лучше использовать для получения биологических имплантатов. Считается, что разные способы изготовления биоимплантатов определяют эндогенные свойства для каждого материала в отдельности, и может быть причиной различных биологических ответов после имплантации.

1.4 Актуальные вопросы поиска биосовместимых материалов, обладающих хорошими репаративными свойствами в отохирургии

Актуальным остаются научные исследования, направленные на поиск высокотехнологичных материалов в отохирургии, которые по своим свойствам однотипны «сходны» с тканью тимпанальной мембраны с целью дальнейшего использования данного материала для закрытия дефектов барабанной перепонки. Такое состояние вопроса и послужило основанием о необходимости поиска биологического материала с учетом её биосовместимости, безопасности и эффективности на основе децеллюляризованного матрикса бычьей брюшины в качестве материала для закрытия дефектов барабанной перепонки [84,85]. При этом известно, что ранее проводились исследования по ксеногенной брюшине в качестве пластического материала в различных медицинских сферах.

В многочисленных экспериментальных исследованиях, а также в клинических наблюдениях, проведенных такими авторами как Кузнецов Н.Н. (1952), Хохлов П.П. (1957), Попов П.Я. (1963), Слободчиков М.Е. (1965), Елисеев Н.Т. (1968) и другие, было доказаны ценные свойства ксеногенных материалов таких как брюшина крупного рогатого скота. Их пластические свойства открыли безграничные перспективы для дальнейшего применения в различных областях хирургии.

В исследованиях зарубежных авторов так же доказана эффективность применения данного материала, что имплантированная ксеногенная брюшина крупного рогатого скота, не вызывает воспалительной реакции с окружающими тканями, а также аллергических проявлений со стороны реципиента. Однако данный материал в силу своих физико-механических свойств имеет свойство биодegradации, но медленные темпы данного процесса исключают потерю прочности данного материала в тканях организма [86 с. 45].

Наш соотечественник Хохлов П.П. в 1957 году впервые применил консервированную брюшину крупного рогатого скота в хирургической практике для закрытия дефектов твердой мозговой оболочки, остеосинтеза трубчатых костей, герметизации открытого пневмоторакса, пластики паховых и вентральных грыжах, при оперативном лечении нефроптоза, а также для лечения термических ожогов [86 с. 47].

Данный имплантат готовили путем консервации париетальной брюшины крупного рогатого скота в наиболее сильных антисептических веществах, раствора хлорамина 2%. Париетальная брюшина крупного рогатого скота, очищенная от жира, промывалась в проточной воде мыльным раствором, после чего помещалась в стеклянный сосуд с 2% раствором хлорамина, раствор антисептика менялся каждые 24 часа в течение 12 дней. После чего ксеногенная брюшина была пригодна к использованию [86 с. 48-49].

Однако данный пластический материал не получил широкого распространения, так как имелись постимплантационные реакции

отторжения за счет присутствия в пластическом материале клеточных элементов и белков, так как консервация материала не исключает клеточные элементы в пластическом материале, что ведет к недостаточной клинической эффективности [87].

Развитие современных технологии позволило нам усовершенствовать изучение брюшины КРС, что способствовало появлению новых технологий оценки эффективности применения данного материала. Так, национальный центр биотехнологии и Национальный научный центр онкологии и трансплантологии (г. Астана, Казахстан), при совместном сотрудничестве научных коллективов, разработали раневое покрытие для лечения ожогов и ран, на основе брюшины крупного рогатого скота [88].

Так же в Карагандинском государственном медицинском университете проводились исследования по использованию децеллюляризованного матрикса брюшины крупного рогатого скота. Научно-исследовательские работы выполняются по грантовому финансированию МОН РК № государственной регистрации 0115РК00305 по теме: «Разработка и применение внеклеточного матрикса ксенобрюшины в хирургическом лечении грыж передней брюшной стенки». Результаты эксперимента показали, что при применении внеклеточного матрикса ксенобрюшины для закрытия дефекта передней брюшной стенки в 95,8% случаев постимплантационный период протекал без осложнений – несостоятельность швов послеоперационной раны, макроскопические признаки отторжения имплантата не обнаружены [31,89]. Вторая научно-исследовательская работа по изучению внеклеточного матрикса ксенобрюшины в нефропексии (НИР по грантовому финансированию № гос. регистрации 0115РК00306). Результаты исследования показали, что в морфологических изменениях состава клеточного инфильтрата зоны имплантации в сторону увеличения стромальных клеток фибробласты/фиброциты с обратно пропорциональным уменьшением уровня лимфоцитов, подтверждающие гипотезу о стадийно-временной тканевой смене фаз репаративного процесса в постимплантационном периоде без признаков воспаления [29,90,91,92].

Таким образом, клинические и экспериментальные исследования, связанные с закрытием дефектов барабанной перепонки, проведенных в различных странах мира, не достаточно решает вопросы отохирургии. Необходимость в поиске высокотехнологичных материалов «сходных» с тканью тимпанальной мембраны, применяемых для мирингопластики по-прежнему актуальна. Так, в настоящее время нами проводится исследование по оценке биосовместимости, безопасности и эффективности нового биологического материала на основе децеллюляризованного матрикса бычьей брюшины в качестве материала для закрытия дефектов барабанной перепонки.

Исследование по ксеногенной брюшины как пластический материал в различных медицинских сферах имеет более чем вековую историю. Но с развитием технологий тканевой инженерии изучение и усовершенствование

ксеногенной брюшины стала на новую ступень развития. Национальный центр биотехнологии и Национальный научный центр онкологии и трансплантологии (г. Астана, Казахстан) при совместном сотрудничестве научных коллективов, разработали раневое покрытие для лечения ожогов и ран, на основе брюшины КРС [93].

Анализ данных литературы показал, что, опираясь на состояния вопроса по поиску эффективного материала в качестве имплантата с целью пластики при дефектах барабанной перепонки вопросы остаются открытыми. Во всем мире не прекращается поиск новых эффективных, высокотехнологичных, биологически «сходных» к организму человека, при этом необходимо учитывать экономическую сторону, чтоб они были недорогие в изготовлении и возможность его дальнейшего использования в клинической практике имплантатов, которые можно эффективно применить в отохирургии.

2. МАТЕРИАЛЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Диссертационная работа по данной теме выполнялась в период с сентября 2018 года по апрель 2021 года, экспериментальное исследование проводилось на базе кафедры хирургических болезней, кафедра патологии НАО «МУК», животные содержались на базе вивария медицинского университета Караганды, после завершения эксперимента морфологические исследования полученного материала проводились в патологоанатомической лаборатории кафедры патологии и в научно-исследовательском центре НИЦ НАО «Медицинский университет Караганды».

В ходе экспериментального исследования изучали клинические, иммунологические, гистологические изменения при хирургическом лечении острого перфоративного среднего отита с применением децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины на животных (кроликах).

Эксперимент проводился с соблюдением рекомендаций Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных исследований или в иных научных целях (Страсбург, 18.03.1986г.). Также было получено этическое одобрение на исследование от Комитете биоэтике НАО «Медицинского университета Караганды, протокол №12 от 06.02.2019 года (Приложение В).

Диссертационная работа экспериментальная и соблюдала все нормы по содержанию и уходу за лабораторными животными, приведенными в руководствах Guide for care and use of laboratory animals. Eight edition. ILAR publication [94] и Американском медицинской ассоциации ветеринаров American Veterinary Medical Association Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition.

Исследование проводилось на 60 половозрелых беспородных кроликах обоего пола, сопоставимого возраста и веса. Выделены две группы исследования: первая группа – 30 экспериментальных животных (кроликов) с использованием в качестве имплантата децеллюляризованный матрикса ксенобрюшины; вторая группа – консервированная твердая мозговая оболочка (n 30). Объем выборки для данного исследования рассчитывался по формуле:

$$E=N-T (1)$$

где, E – ошибка степени свободы, N – общее количество животных, T – общее количество групп [95]. Такой простой расчет размера выборки при сравнении для двух независимых групп рекомендован авторами, когда не представляется возможным предугадать результат и необходимо лишь оценить различия между группами. По нашим расчетам, оптимальный размер выборки 9 животных в группе, однако для получения статистически значимого результата размер группы был увеличен до 10.

2.1. Объект исследования

Объектом экспериментального исследования явились 60 половозрелых кроликов, обоего пола, на которых проводилось моделирование

перфоративного отита с последующей мирингопластикой с целью закрытия дефекта барабанной перепонки с использованием биологического имплантата отечественного производства, впервые применяемый для закрытия дефектов барабанной перепонки «децеллюляризованный матрикс ксенобрюшины».

Разработка и изготовление опытных образцов децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины осуществлялось совместно с сотрудниками Национального центра биотехнологии (г. Астана, Казахстан), под руководством Абугалиева К.Р. и Огай В.Б, базе научной лаборатории ТОО «General Genetics». Используемые для научных изысканий измерительные средства и испытательное оборудование прошли процедуры поверки и аттестации в соответствующих аккредитованных органах - Акмолинском филиале АО «Национальный центр экспертизы и сертификации» и РГП «Казахстанский институт метрологии». Получены экспериментально образцы ксенобрюшины. Процесс подготовки ткани происходил в несколько этапов:

После забора первичного сырья – бычьей брюшины, ее очищали от жира, трижды промывали стерильным физиологическим раствором большими объемами, погружали в контейнер со стерильным физиологическим раствором, содержащий цефтриаксон – антибактериальный препарат широкого спектра действия. Децеллюляризация образцов ксеногенной брюшины осуществлялась в 2 цикла с помощью детергент-ферментативного метода [89, с. 19-20].

На первом этапе, образцы ксеногенной брюшины размером 5×5 см промывали трижды (20 минут каждый раз) стерильной проточной водой, содержащей 1% раствор повидон-йода (ПИ). Затем промывали два раза по 20 минут в стерильной дистиллированной воде (содержащей 1% раствор ПИ), дважды в стерильной ультрачистой воде, содержащей 200 Ед/мл пенициллина, 200 мкг/мл стрептомицина и 50 мкг/мл амфотерицина В.

Учитывая данные, полученные при изготовлении прототипа изучаемого материала, а именно, использование в качестве детергента 4% раствора дезоксихолата натрия приводило к структурным изменениям в виде отека и разволокнения коллагеновых и эластиновых фибрилл.

На втором этапе был использован более щадящий детергент. Образцы ксеногенной брюшины погружали в раствор для децеллюляризации содержащий 0,25% додецилсульфат натрия и 0,5% Тритон Х-100 и непрерывно перемешивали на платформенном шейкере в течение 3 часов при комнатной температуре при 200 об/мин. Данную процедуру повторяли дважды. После каждого цикла децеллюляризации проводилась отмывка образцов ксеногенной брюшины дистиллированной водой 2 раза по 20 минут.

На третьем этапе, образцы после децеллюляризации промывали трижды стерильной ультрачистой водой и переносили в раствор, содержащий нуклеазы РНКазы А 20 мкг/мл и ДНКазы I 200 мкг/мл и инкубировали в течение 2 ч при 37°C, перемешивая на орбитальном шейкере при 200 об/мин, чтобы

полностью удалить содержимое ядер клеток и деградировать ДНК и РНК. После трех промывок стерильной дистиллированной водой (20 мин каждый раз), образцы переносили на хранение в стерильную ультрачистую воду с содержанием 200 Ед/мл пенициллина, 200 мкг/мл стрептомицина и 50 мкг/мл амфотерицина В при 4°C.

Следует подчеркнуть, что все этапы по получению экспериментальных децеллюляризованных образцов ксеногенной брюшины выполнялись в стерильных условиях [93] (рисунок 1).



Рисунок 1—опытный образец децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины

В качестве материала сравнения использовалась консервированная твердая мозговая оболочка, которая уже применяется в клинической практике для закрытия дефектов барабанной перепонки.

Способ получения биологического материала из твердой мозговой оболочки: свежую трупную мозговую оболочку отмывают от крови и слизи, трехкратно замораживают при -4°C и размораживают в дистиллированной воде при температуре 18°C, повторяя этот процесс не менее 5 раз.



Рисунок 2 – опытный образец консервированной твердой мозговой оболочки

На следующем этапе промывают размороженные пластинки трупной мозговой оболочки пятикратно в 0.9% растворе NaCl, после чего погружают пластинки в 6% раствор перекиси водорода, затем отмывают в дистиллированной воде и последовательно обрабатывают раствором этанола в нарастающей концентрации от 30⁰, 50⁰, 70⁰, в дальнейшем образцы переносят на хранение в стерильную упаковку [64] (рисунок 2).

2.2. Дизайн исследования

Проведено сравнительное экспериментальное исследование нового биологического материала децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины для мирингопластики при перфорации барабанной перепонки на 60 половозрелых кроликах, обоего пола, массой 1500±300 грамм на базе вивария РГП на ПХВ «Карагандинский государственный медицинский университет», а также кафедре патологии, патологоанатомической лаборатории клиники медицинского университета НАО «МУК», в научно-исследовательском центре НИЦ НАО «МУК».

Эксперимент проводился согласно разработанным стандартным операционным процедурам (Приложение Г). Животные распределены в 2 группах (1 группа – децеллюляризованный матрикс ксенобрюшины, 2 группа - консервированная твердая мозговая оболочка), по 3 подгруппам, в каждой подгруппе по 10 особей случайным образом. Каждая группа соответствует применяемому биоимплантату, каждая подгруппа – сроку наблюдения, что соответствует времени выведения животного из эксперимента. Сроки наблюдения: 7 суток, 21 сутки, 30 суток. Эксперимент проводился на левом ухе животных, правое ухо оставалось не оперированным, так во время оценки наличие либо отсутствие слуха в количественном эквиваленте, рассчитывается в обеих группах, на 30 сутки после проведенной операции, и правое ухо является контрольным. Распределение экспериментальных животных, их характеристика и сроки наблюдения представлены в таблице 1.

В качестве критерия приемлемой рандомизации считали отсутствие внешних признаков заболевания и гомогенность групп по массе тела (±10 %). До имплантации децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины и консервированной твердой мозговой оболочки, каждому кролику производится отоскопия с описанием состояния наружного слухового прохода и барабанной перепонки.

Идентификация каждой особи осуществлялась путем присвоения каждому животному индивидуального номера меткой красителем на левой ушной раковине.

Основные правила содержания и ухода соответствовали нормативам, приведенным в руководстве Guide for care and use of laboratory animals. Eight edition. ILAR publication, 2012, National Academy Press. Все процедуры по

рутинному уходу за животными выполняли в соответствии со стандартными операционными процедурами.

Таблица 1 – Распределение экспериментальных животных по группам

группа	подгруппа	Количество - n	пол	Возраст дни	масса тела до операции, г
Децеллюляризованный матрикс ксенобрюшины (ДеКБ). (n=30)	7 суток	10	м=2, ж=3	90±15	1500±300
	21 суток	10	м=2, ж=3	90±15	1500±300
	30 суток	10	м=2, ж=3	90±15	1500±300
Консервированная твердая мозговая оболочка (ТМО). (n=30)	7 суток	10	м=2, ж=3	90±15	1500±300
	21 суток	10	м=2, ж=3	90±15	1500±300
	30 суток	10	м=2, ж=3	90±15	1500±300

2.3 Методологические этапы создания экспериментальной модели пластики барабанной перепонки.

Изучив данные литературы по известным методикам экспериментальных операций мирингопластики на животных, мы столкнулись с тем, что известные методологические подходы не могут быть использованы в реализации поставленных нами задач научного исследования.

Данное положение подвигло нас к разработке собственной модели мирингопластики на экспериментальных животных для проведения пластики барабанной перепонки с использованием децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины на лабораторных животных (кроликах).



а



б

Рисунок 3 – Оборудование для проведения тимпаноластики:

- а – стандартный набор инструментов фирмы Karl Storz;
- б – операционный микроскоп Carl Zeiss Meditec «AG / OPMI pico»

Целью методики было получить хороший обзор слухового прохода в месте перехода его из хрящевой части в костную часть. Известно, что барабанная перепонка у кролика расположена под углом 90 градусов по отношению к входу в слуховой проход. Наша модель обеспечила нам хороший обзор барабанной перепонки без применения дополнительных инструментов. Для этого использовали стандартный набор инструментов для тимпаноластики Karl Storz, а также операционный микроскоп Carl Zeiss Meditec AG / OPMI pico (рисунок 3).

2.4 Иммунологические методики оценки системного воспаления

Оценка реакции иммунной системы макроорганизма в ответ на имплантацию биологического материала осуществлена путем определения циркулирующих иммунных комплексов высокой, средней, низкой молекулярной массы, исследовано также качественное состояние показателей общего анализа крови.

Образование циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) оценивали по тесту *in vitro* по их преципитации в полиэтилен-гликоле-6000 (по Ю.А. Гриневичу и А.Н. Алферову [96]). По данной методике венозную кровь инкубируют без антикоагулянтов в течение 2 часов при температуре 37°C. Полученную сыворотку разводят в 3 раза боратным буфером (рН 8,4).

В последующем выделяют следующие этапы:

- в контрольную пробирку вносят 1,8 мл боратного буфера,
- в 3 опытные пробирки вносят по 1,8мл 3,5%, 5% и 7% ПЭГ-6000,
- во все пробирки вносят по 0,2 разведенной сыворотки,
- в последующем эти пробирки инкубируют в течение 2-х часов при комнатной температуре.

После завершения процесса инкубации проводили определение оптической плотности при длине волны 450нм. Следующим этапом высчитывают разность показателей оптической плотности, результат умножают на 1000 и получают условные единицы содержания ЦИК в мл сыворотки. Низкомолекулярные иммунные комплексы (НМ ЦИК) осаждаются в 7%, среднемолекулярные (СМ ЦИК) в 5%, а высокомолекулярные (ВМ ЦИК) в 3,5% растворе полиэтиленгликоля-6000.

Оценка результатов общего анализа крови проводилась с определением показателей гемоглобина (г/л), лейкоцитов (10^9 /л), эритроцитов (10^{12} /л), тромбоцитов (10^9 /л). Результаты показателей общего анализа крови определяли на гематологическом анализаторе Mindray 3200, представленной на рисунке 4.



Рисунок 4 – Гематологический анализатор Mindray 3200

2.5 Методика количественной оценки состояния слуха после миринопластики

На 30 сутки эксперимента лабораторным животным (кроликам) после перенесенной операции (миринопластики) производилась количественная оценка слуха с помощью регистратора вызванных слуховых потенциалов BAERCOM UFI, штатного симулятора нейроволновой активности мозга и штатного программного обеспечения BAERCOM PC (рисунок 5). Мощность пакета звукового импульса составляет 70 Дб.

На сегодняшний день, данный метод является наиболее объективным и широко распространенным методом проверки слуха у животных. Метод вызванных слуховых потенциалов – ВАЕР тест. С помощью данного метода, возможно, провести количественную оценку слуха у животных [25,97,98].

Целью методики было определить наличие слуха в количественном эквиваленте, основанном на оценке суммарной длины трех более выраженных пиков на аудиограмме после проведенной операции с применением децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины и консервированной твердой мозговой оболочки.



Рисунок 5 – Количественная оценка слуховых потенциалов – ВАЕР тест

2.6 Морфологические методы исследования

С целью корректной оценки пограничной зоны локализации имплантата в зоне дефекта барабанной перепонки при гистологическом исследовании данный участок был обозначен нами как комплекс «имплантат-перепонка», включающее в себя участок имплантата и перфорированную барабанную перепонку, которая представлялась как динамическая структурно-функциональная система, обеспечивающая ремоделирование области имплантации биотрансплантата с восстановлением нативной структуры и функции барабанной перепонки, полагая что именно в этой зоне комплекса «имплантат-перепонка» происходит репаративный процесс после повреждения.

После завершения эксперимента в выделенных группах эксперимента по срокам наблюдений проводился забор материала для гистологического исследования. Материал забирался из зоны контакта имплантации барабанной перепонки с маркировкой и фиксировался полученный материал в забуференном 10% растворе нейтрального формалина с последующим проведением по общеизвестной гистологической методике с использованием автоматического тканевого процессора фирмы Leica TP1020 с последующей заливкой материала в парафин-воск [99]. Параифновые срезы изготавливались на санном микротоме Leica SM 2000R толщиной 5-6 микрон. Для обзорного исследования гистологической картины материал окрашивали гематоксилином и эозином (процессор для окраски срезов автостейнер KD-RS).

Оценка морфологической картины изучаемого материал проводилось на компьютеризированном микроскопе с цифровым микрофотографированием гистологических препаратов с использованием камеры «Leica DFC320» и микроскопа «Leica DM1000» фирмы «Leica Microsystems» при X100, X200 и X400 кратном увеличении.

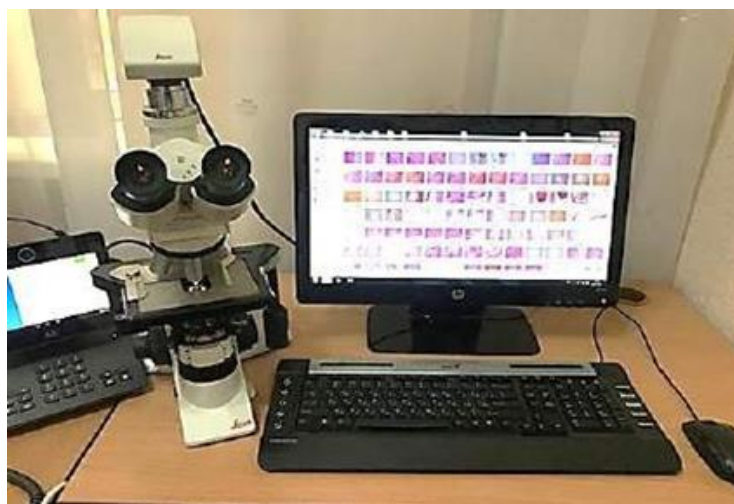


Рисунок 6 – Выполнение гистологического исследования на базе патоморфологической лаборатории кафедры патологической анатомии НАО «МУК»: работа на компьютеризованном комплексе «Leica Microsystems», микроскоп Leica DM 1000, гистологическое исследование

Гистологическое исследование проводилось на базе учебно-научной патоморфологической лаборатории кафедры патологической анатомии НАО «МУК» (рис.6). Самостоятельно осуществлял проводку материала из зон имплантации на автоматическом тканевом процессоре, подготовку парафиновых срезов. Полученные парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином с последующим гистологическим описанием и микрофотографированием на специализированном компьютеризованном комплексе для гистологического исследования. Морфологическое исследование проводилась простым слепым методом, каждая группа исследования получило цифровое обозначение. После гистологического описания была проведена расшифровка групп и осуществлен сравнительный анализ морфологической картины каждой группы эксперимента.

2.7 Методы статистической обработки результатов исследования

Для всех количественных данных вычисляли с расчетом для каждого показателя среднее значение (M) стандартное отклонение (SD), медианного значения (Me), 25- 75 % межквартильного интервала (IQR). Достоверность различий между исследуемыми группами определена статистическими методами с помощью непараметрическим критериев: критерий Mann-Whitne, сравнения независимых групп («опыт-контроль»)[100].

При проведении морфометрического анализа данные были представлены как медиана и Q1-Q3 для непрерывных переменных или частота (%) для категориальных переменных. Различия между группами рассчитывали с помощью U-критерия Манна-Уитни для непрерывных переменных, критерия χ^2 с поправкой Йейтса для категориальных переменных; $p < 0,05$ считали статистически значимым. Статистический

анализ был выполнен с использованием SPSS (v.25.00, IBM Statistics, Армонк/Нью-Йорк, США). Калькуляция, оформление материала было использовано табличный процессор Excel из пакета офисных программ Microsoft Office 2012.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Экспериментальная модель пластики барабанной перепонки.

В условиях эксперимента нами был смоделирован дефект барабанной перепонки «острая перфорация» у лабораторных кроликов, с последующей пластикой барабанной перепонки (мирингопластика) с применением децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины.

Описание методики операции: разработка экспериментальной модели миринопластики осуществлялось под общей анестезией раствором ксилазин 7 мг/кг + кетамин 35 мг/кг, внутривенно, капельно, с помощью венозного катетера, установленного в вену ушной раковины. Далее проводился горизонтальный разрез длиной 10 мм у переднего края основания ушной раковины (рисунок 7).



Рисунок 7 – Горизонтальный разрез длиной 10мм у переднего края основания ушной раковины

Как известно, имеются ряд особенностей при проведении оперативных процедур, так у людей разрез производится по задней поверхности ушной раковины, однако на лабораторных животных (кроликах) данный метод не подходит, учитывая анатомического расположения сосудов ушной раковины. В связи с этим в эксперименте после разведения краев раны кожи с помощью ранорасширителя тупым путем разводили края раны по направлению первоначального разреза, до обнажения передней стенки наружного слухового прохода. После тщательного гемостаза, мы проводили горизонтальный разрез наружного слухового прохода в хрящевой части в месте перехода его в костную часть, тем самым мы смогли получить хороший обзор костной части слухового прохода, что имеет значение для проведения последующих манипуляций (рисунок 8).

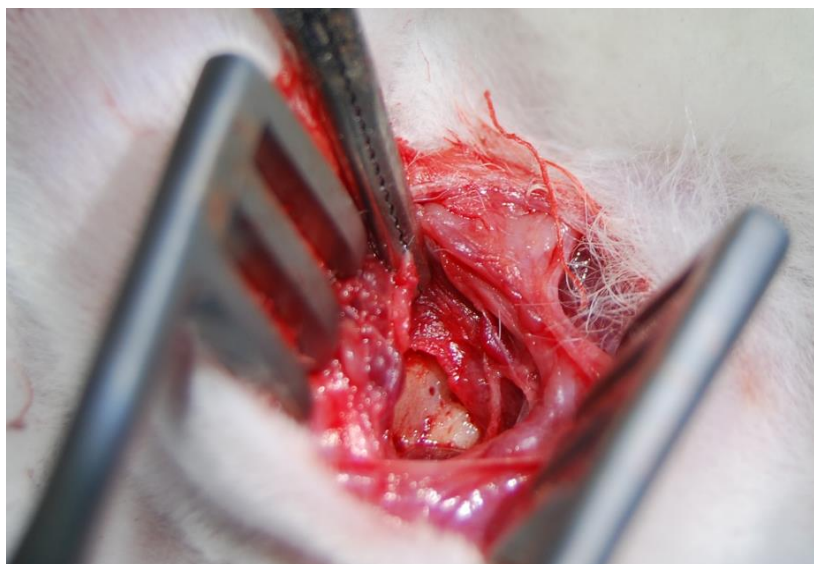


Рисунок 8 – Визуализация границы перехода хрящевой части слухового прохода в костный

Как известно барабанная перепонка у кролика расположена под углом 90 градусов по отношению к её входу в слуховой проход [25], для более удобного доступа с помощью костных щипцов была удалена наружная костная стенка слухового прохода, что обеспечила хороший обзор барабанной перепонки без применения ушной воронки, что представлено на рисунке 9.

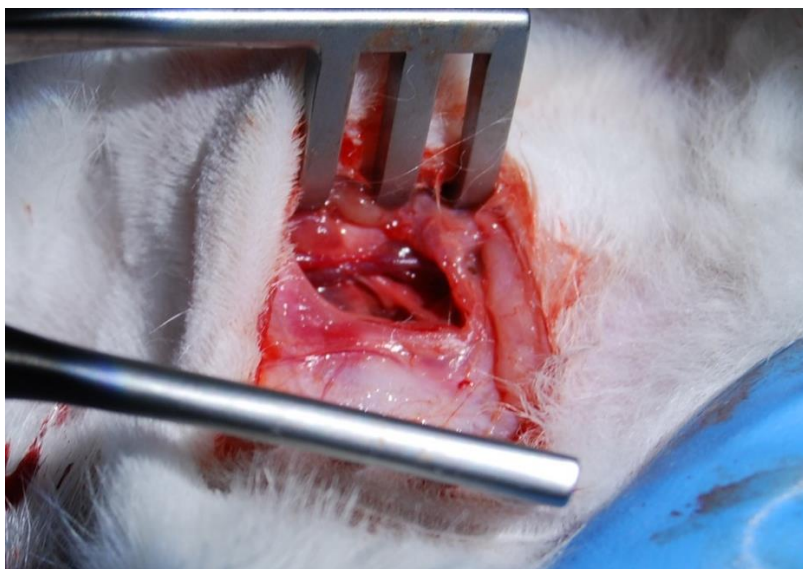


Рисунок 9 – Процесс удаление наружной стенки слухового прохода

После тщательного туалета наружного слухового прохода иглой из набора для тимпаноластики производили надрыв барабанной перепонки в натянутой части, при этом важно было удалить более 50% барабанной перепонки, чтобы исключит самостоятельное заживление барабанной перепонки. После удаления части барабанной перепонки уложили лоскут по методу overlay, из биоматериала децеллюляризованного матрикса

ксенобрюшины с толщиной изучаемого имплантата 500 микрон. Операцию заканчивали наложением на лоскут силиконовой полоски для фиксации лоскута и губки Merocel. После сопоставили края слухового прохода, края разреза раны кожи ушивали узловыми швами.

До имплантации децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины и консервированной твердой мозговой оболочки, каждому кролику производили отоскопию с описанием состояния наружного слухового прохода и барабанной перепонки предоперацией и послеоперационный период в сроки 7, 21, 30 суток.

3.2 Оценка реакции иммунной системы макроорганизма в ответ на имплантацию децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины

Оценка сенсibiliзирующего действия и трансплантационного иммунитета была проведена в рамках доклинических испытаний ранее [101,102] и не стояла в целях диссертационного исследования, но представляло теоретический интерес как возможный ответ на имплантацию децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины. Однако оценка системной реакции на оперативное вмешательство вообще и новый иммунобиологический препарат является важной частью комплексного исследования оценки безопасности и эффективности применения новых биопрепаратов в разных условиях. В связи с этим были оценены базовые тесты, отражающие системную воспалительную реакцию и образование иммунных комплексов на потенциально-ксеногенный препарат. В таблицах 2-4 представлены результаты общего анализа крови на 7, 21 и 30 день после операции. При этом необходимо учитывать, что объем операции и используемого трансплантата был крайне мал и полностью исключить системную реакцию нельзя.

Таблица 2- Общий анализ крови на сроке 7 дней

Маркер	Опыт Me [Q1;Q3]		Контроль Me [Q1;Q3]
	ТМО	ДеКБ	
Лейкоциты, $10^9/л$	6,3 [6,0; 8,9]	5.7 [5.7; 6.3]	6,0 [5,7; 7,0]
Эритроциты $*10^{12}/л$	5,0 [5,0; 5,5]	5.34 [3.7; 5.4}	4,4 [4,2; 4,85]
Тромбоциты $*10^9/л$	347 [340; 352]*	365 [349; 384]*	500 [454; 544]
Гемоглобин г/л	102 [100; 116]	111 [81; 116]	100,0 [94,0; 106,0]
* - $p < 0.05$ в тесте Мана- Уитни с контрольной группой.			

К 7 дню после операции признаков послеоперационной острой воспалительной реакции не было отмечено. На 7 день происходило снижение числа тромбоцитов в обеих группах в равной степени, но не выходя за пределы физиологических значений.

Таблица 3- Общий анализ крови на сроке 21 день эксперимента

Маркер	Опыт Ме [Q1;Q3]		Контроль Ме [Q1;Q3]
	ТМО	ДеКБ	
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	6.9 [6.6; 7.5]	5.7 [5.7; 5.9]	6,0 [5,7; 7,0]
Эритроциты *10 ¹² /л	3.92 [3.7; 3.9]	4.8 [4.6; 5.1]	4,4 [4,2; 4,85]
Тромбоциты *10 ⁹ /л	345 [337; 381]	442 [304; 471]	500 [454; 544]
Гемоглобин г/л	93 [79; 94]	97 [94; 99]	100,0 [94,0;106,0]
* - p<0.05 в тесте Мана- Уитни с группой сравнения			

На сроке 21 день эксперимента, было отмечено, что прослеживается увеличение уровня лейкоцитоза в группе с ТМО по сравнению с группой ДеКБ, что можно было бы интерпретировать как проявление поздней стадии иммунологической реакции на трансплантат, однако при этом не наблюдаются различия с группой контроля и данные не выходят за пределы физиологических значений для вида.

В сроке эксперимента на 30 день в группе с ДеКБ отмечено, что снижение числа тромбоцитов по сравнению с контрольной группой, однако не достигает различий между опытными группами и не выходит за пределы нормы.

Таблица 4- Общий анализ крови в сроке 30 дней

Маркер	Опыт Ме [Q1;Q3]		Контроль Ме [Q1;Q3]
	ТМО	ДеКБ	
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	6.9 [6.6;7.5]	5.7 [5.7; 5.7]	6,0 [5,7; 7,0]
Эритроциты *10 ¹² /л	3.9 [3.8;4.2]	3,9 [3,9; 4,0]	4,4 [4,2; 4,85]
Тромбоциты *10 ⁹ /л	453 [354;467]	388 [353; 390]*	500 [454; 544]
Гемоглобин г/л	89 [83;86]	79 [79;81]	100,0 [94,0; 106,0]
* - p<0.05 в тесте Мана- Уитни с контрольной группой.			

В таблицах 5-7 представлены результаты изучения ЦИК в сыворотке крови экспериментальных животных.

Следует отметить, что в течение первой недели не происходит статистически значимого увеличения содержания ЦИК в сыворотке крови экспериментальных животных.

Таблица 5- Показатели ЦИК на сроке 7 дней

Маркер	ТМО	ДеКБ	Контроль
Величина	Me [Q1;Q3]	Me [Q1;Q3]	Me [Q1;Q3]
ВМ ЦИК, ед	3.0 [0.0;3.0]	3.0 [0.0;4.0]	1.0 [1.0;2.0]
СМ ЦИК, ед	3.0 [1.0;4.0]	5.0 [0.0;8.0]	2.0 [0.75;4.5]
НМ ЦИК, ед	4.0 [3.0;5.0]	2.0 [2.0;7]	2 [2; 3]
* - $p < 0.05$ в тесте Мана- Уитни с контрольной группой.			

Таблица 6- Показатели ЦИК в сроке эксперимента 21 дней

Маркер	ТМО	ДеКБ	Контроль
Величина	Me [Q1;Q3]	Me [Q1;Q3]	Me [Q1;Q3]
ВМ ЦИК, ед	2.0 [1.0;3.0]	2.0 [2.0;3.0]	1.0 [1.0;2.0]
СМ ЦИК, ед	3.0 [3.0;20.0]	1.0 [1.0;4.0]	2.0 [0.75;4.5]
НМ ЦИК, ед	3.0 [2.0;5.0]	3.0 [1.0;5.0]	2,0 [2; 3]
* - $p < 0.05$ в тесте Мана- Уитни с контрольной группой.			

Как видно из таблицы 6 показатели крови в сроке 21 день опыта не отмечено увеличение значимого количества ЦИК в сыворотке крови экспериментальных животных ни в одной из исследуемых групп.

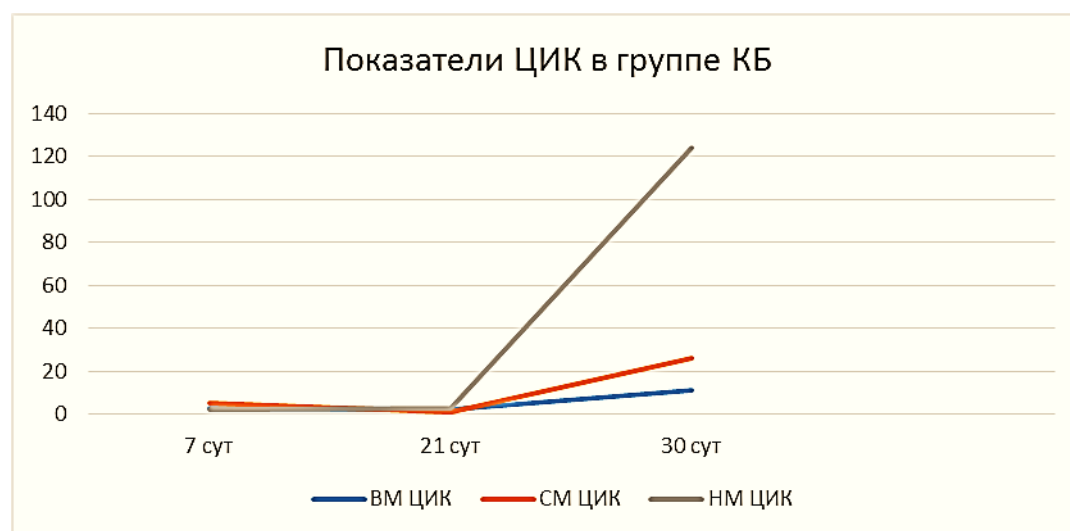
Таблица 7- Показатели ЦИК в сроке 30 дней

Маркер	ТМО		ДеКБ		Контроль
	Me [Q1;Q3]	p – value	Me [Q1;Q3]	p – value	
ВМ ЦИК, ед	18.0 [6.0;19.0]*	*0.0079	11 [6.0;22.0]*	*0.03	1.0 [1.0;2.0]
СМ ЦИК, ед	92 [42;118]*#	*0.0048 #0.007	26 [22;34]*	*0.01	2.0 [0.75;4.5]
НМ ЦИК, ед	105 [98;106]*#	*0.0079 #0.015	124 [121;128]*	*0.0074	2 [2; 3]
* - $p < 0.05$ в тесте Мана- Уитни с контрольной группой. # - $p < 0.05$ в тесте Мана- Уитни с группой сравнения.					

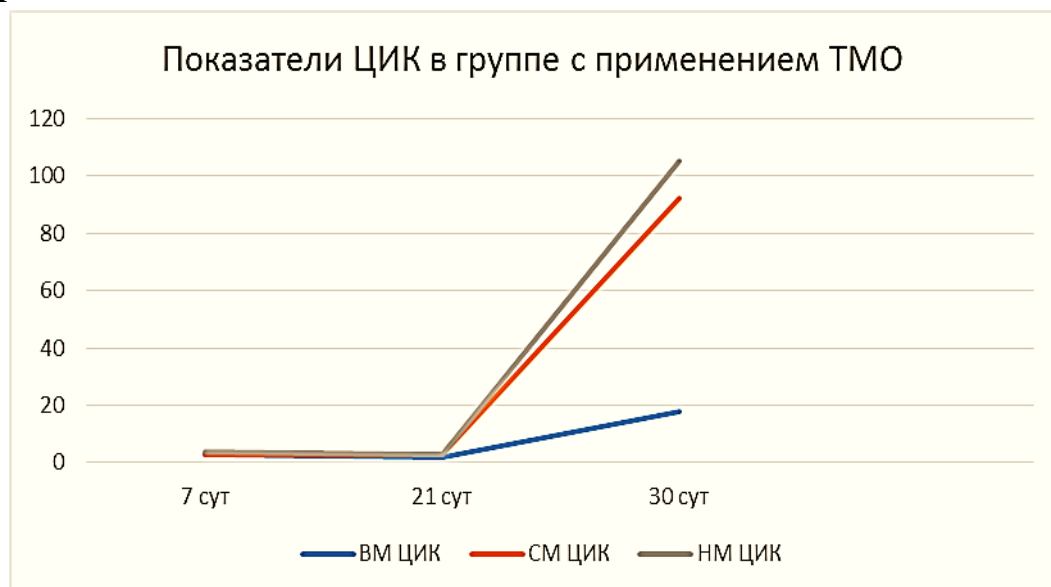
Следует отметить, что на 30 день эксперимента происходит резкое повышение в крови всех фракций ЦИК в обеих группах. При этом ВМ ЦИК поднимались в равной степени, статистически значимого различия между группами не наблюдалось, однако с группой контроля статистически значимого различия были отмечены: ($p=0,0079$) для ТМО и ($p=0,03$) для ДеКБ. В группе СМ ЦИК отмечались статистически значимые различия как между группами ($p=0,007$), так и с группой контроля были отмечены:

($p=0,0048$) для ТМО и ($p=0,01$) для ДеКБ. В группе НМ ЦИК так же отмечалось статистически значимые различия как между группами сравнения ($p=0,015$), а с контрольной группой: ($p=0,0079$) для ТМО и ($p=0,0074$) для ДеКБ.

Так, в группе и ксенобрюшины выявлено резкое возрастание низкомолекулярных ЦИК, различия были значимыми не только с контрольной группой, но и с группой ТМО. Тогда как, в группе после применения ТМО было зафиксировано резкое повышение среднемолекулярных ЦИК, аналогично выше не только контрольных, но и группы сравнения отображено на рисунке 10.



А



В

Рисунок 10 – Показатели фракций ЦИК ВМ, СМ и НМ в обеих группах в сроках на 7 сутки, 21 сутки и 30 сутки в эксперименте на кроликах: А – в группе ДеКБ, В – в группе ТМО

Таким образом, с целью оценки результатов реакции иммунной системы макроорганизма в ответ на имплантацию разных видов ксенотрансплантантов было проведено иммунологическое исследование в рамках эксперимента. В качестве маркеров использовали базовые показатели лейкограммы и фракций ЦИК, как показатели системной воспалительной реакции и косвенного отражения гуморального иммунитета. Оценка сенсибилизирующего действия и трансплантационного иммунитета была проведена в рамках доклинических испытаний, проведенных ранее исследований [99,100] и была доказана ее безопасность.

Показатели общего анализа крови в течение всего времени наблюдения не выходили за пределы референтных значений и не отличались в изученных группах, что говорит о низкой системной реакции и отсутствии осложнений воспалительного и аллергического характера в результате эксперимента.

Следует подчеркнуть, что результаты по ЦИК получились несколько неожиданными и не совсем согласуются с ранними наблюдениями. Известно, что иммунные комплексы являются комплексом антитело-антиген, которые не успевают утилизироваться базовыми механизмами и могут быть причиной иммунокомплексных реакций. Наиболее активно они образуются при избытке антигена или дефиците компонента комплимента и системе фагоцитоза. В нашем случае в течение 21 дня эксперимента – априорного периода выработки и достижения максимума антителообразования на новый антиген не наблюдалось, и не было отмечено изменения со стороны изученных показателей. Данное положение можно объяснить малым объемом трансплантата и отсутствием активного воспаления. Процессы гуморального иммунного ответа проходили в рамках физиологических сдвигов и иммунные комплексы любых размеров не накапливались.

Однако к 30 дню эксперимента зафиксировано многократное увеличение концентрации всех видов иммунных комплексов. Отмечено, что в обеих группах высокомолекулярные ЦИК возрастали в равной степени. В группе ксенобрюшины резко возрастали низкомолекулярные ЦИК, при этом различия были значимыми не только с контрольной группой, но и с группой ТМО, тогда как после применения ТМО было зафиксировано резкое повышение средне-молекулярных ЦИК, данные были выше не только контрольных, но и в группах сравнения (ксенобрюшины). Имеющиеся литературные данные о роли различных фракций ЦИК противоречивы. Авторы сходятся во мнении, что высокомолекулярные ЦИК легко фагоцитируются и активируют комплимент и поэтому не представляют угрозы для развития иммунокомплексных реакций.

Так, Никитин В.Ю. [103] пишет о большей патогенности низкомолекулярных комплексов, которые избегают захвата фагоцитами и активации комплимента и могут откладываться под эндотелием, что и является главной причиной системных иммунокомплексных реакций, другие авторы указывают, что крупные ЦИК быстро элиминируются и сравнительно малопатогенны, мелкие же ЦИК плохо элиминируются, могут откладываться субэндотелиально и не способны активировать систему

комплемента, отмечено, что ЦИК среднего размера обладают высокой комплемент-связывающей способностью и являются наиболее патогенными [104]. Однако необходимо учесть несколько факторов, так фракции ЦИК у кроликов могут не однозначно соответствовать фракциям ЦИК у человека, как и динамика антителообразования.

На основании анализа полученных результатов показателей крови следует, что мы не выявили признаков системного воспаления, что свидетельствовало бы о признаках развития местного воспалительного ответа и иммунопатологического процесса.

Таким образом, вероятней всего уровень ЦИК в сроке до 30 дней отражает период физиологического процесса имплантации трансплантата, как проявление компенсаторно-приспособительной реакции. Известно так же, что антитела могут играть роль в защите трансплантата от агрессии иммунной системы и блокировке антигенов, что видимо и было отражением при мирингопластики в нашем эксперименте.

Однако данные показывают, что показатели в группе ТМО и в группе общепринятого ДеКБ, хоть и имели особенности, но в целом были сравнимы и не отличались по иммуногенности, при этом не показывали клинических признаков отторжения или иммунопатологии.

3.3 Сравнительная оценка количественного показателя слуха экспериментальных животных после мирингопластики с использованием децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины.

Количественная оценка слуха проводилась с помощью регистратора вызванных слуховых потенциалов BAERCOM UFI, штатного симулятора нейро-волновой активности мозга и штатного программного обеспечения BAERCOM PC. Мощность пакета звукового импульса составляет: 70 Дб.

При регистрации аудиограммы была использована трехэлектродная система подкожных электродов: два активных (правое, левое ухо) и третий референтный (в районе теменного бугра). Полицастотные импульсы посылались по 25 пакетов и отображалось для правого и левого уха отдельно. Во избежание спонтанных ошибок тест производили трижды, на каждое ухо соответственно. Аудиограмма, полученная с помощью симулятора нейро-волновой активности после мирингопластики с использованием децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины на 30 сутки после операции: левое ухо (а), правое ухо (в) отражены на рисунке 11.

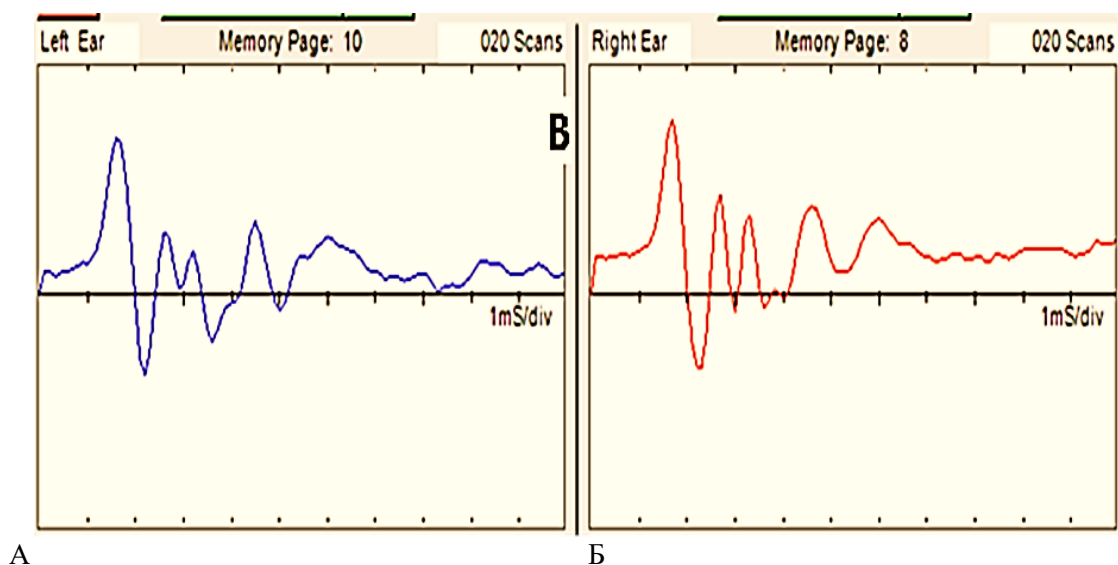


Рисунок 11 – Аудиограмма, полученная с помощью симулятора нейро- волновой активности после мирингопластики с использованием децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины на 30 сутки после операции: А – левое ухо, В – правое ухо

Сравнительный анализ остроты слуха производился между первой и второй группой эксперимента в соответствии применяемому биоимплантату, а также оперированного уха со здоровым.

При проведении статистического анализа для всех количественных данных вычислялось групповое среднее арифметическое (\bar{X}), среднеквадратичное отклонение (SD), с расчетом для каждого показателя среднее значение (M), медианы (Me), межквартильного интервала (IQR). Достоверность различий между исследуемыми группами определялось с помощью непараметрического критерия Mann-Whitney для сравнения независимых групп («опыт-контроль»). Изменения считались статистически значимыми при уровне достоверности ($p < 0.05$).

Экспериментальная работа с животными проводилась в соответствии соблюдения принципов Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных целей (Хельсинской декларации Всемирной медицинской организации). Проведение экспериментального исследования одобрено Комитетом по биоэтике НАО «МУК», протокол №12 от 06.02.2019 г.

Для количественной оценки полученных результатов было необходимо формализовать графики и при этом получить цифровое значение, максимально отражающее обобщенный результат каждого отдельного исследования. С этой целью нами, после выставления стандартной изолинии и приведения всех графиков в соответствие с ней, было проведено измерение высоты трех наиболее выраженных пиков. Высоту пиков (мм) измеряли для каждого исследования отдельно. Далее суммировали высоту трех пиков и получали общее цифровое значение, выраженное в мм [25,98]. Полученные результаты исследования представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Сравнительная оценка показателей аудиограммы на 30 сутки после мирингопластики

Маркер	ДеКС Me [Q1; Q3]	ТМО Me [Q1; Q3]	Здоровое ухо (Контроль)
Сумма трех пиков оперированное ухо (мм)	40 [32; 48]	32 [30; 35]	44,5 [43; 50]
P –value	0,04515		
P –value с Контролем	0,10411	0,00018	
<i>Жирным шрифтом выделены статистически значимые отличия ($p < 0,05$)</i>			

Как видно из таблицы 8, суммарная величина пиков аудиограмм неоперированного (здорового) уха выше, чем у оперированного уха в обеих группах. Однако, в первой группе, где был применен децеллюляризованный матрикс ксенобрюшины, статистически значимых различий между средними значениями суммы трех пиков аудиограммы оперированного и не оперированного уха не выявлено - 40 [32; 48] мм и 44,5 [43; 50] мм соответственно ($p=0,10411$). Данное явление можно расценивать как восстановление слуховых функций среднего уха после перенесенной мирингопластики. Во второй группе, где для пластики барабанной перепонки применяли консервированную твердую мозговую оболочку, наблюдаются статистически значимые различий между средними значениями суммы трех пиков аудиограммы оперированного уха и не оперированного уха: соответственно 32 [30; 35] мм против 44,5 [43; 50] мм ($p=0,00018$), что может свидетельствовать о меньшей степени способности данного вида биологического имплантата к восстановлению слуховых функций среднего уха после мирингопластики.

При сравнительном анализе общей суммарной величины пиков двух группах эксперимента между ДеКБ и ТМО, так же отмечаются статистически значимые различий ($p=0,04515$)

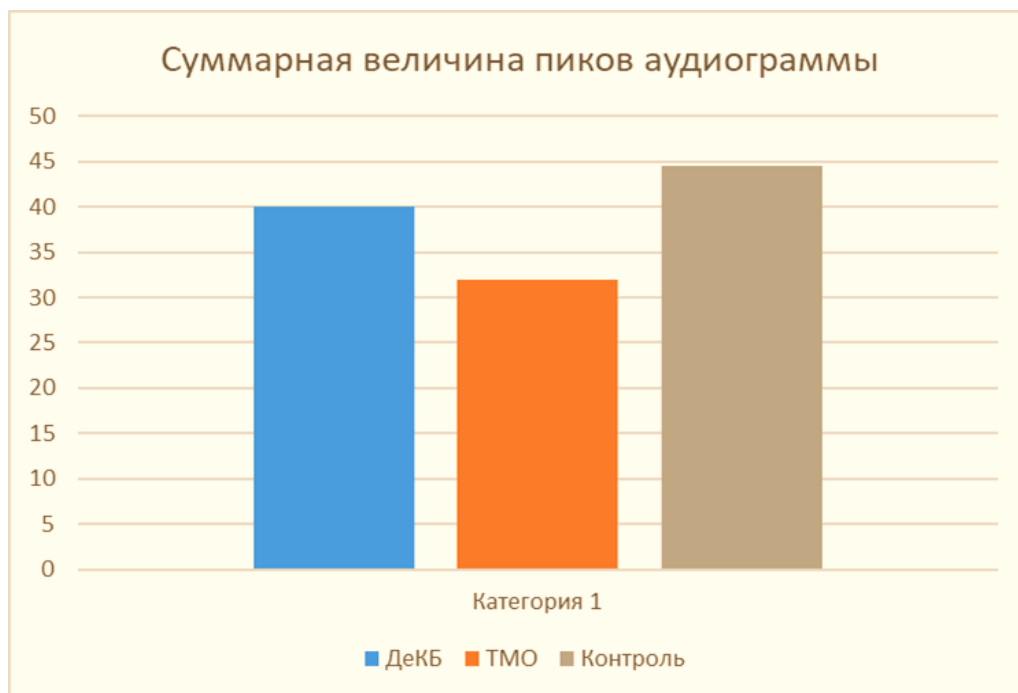


Рисунок 12 – суммарная величина пиков аудиограммы, полученная с помощью симулятора нейро- волновой активности после мирингопластики с использованием ДеКБ и ТМО на 30 сутки после операции

Таким образом, полученные результаты демонстрируют, что острота слуха после мирингопластики с применением нового биологического материала «децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины» выше, то есть ближе к исходным значениям, чем при использовании консервированной твердой мозговой оболочки, как во внутри групповых, так и в межгрупповых, что подтверждается статистически значимых различий между группами ($p < 0,05$) [105].

3.4 Обоснование выбора морфологического комплекса для оценки структурного состояния зон имплантации в группах эксперимента с децеллюляризованным матриксом ксенобрюшины и консервированной твердой мозговой оболочки

Подготовка и обработка экспериментального материала «имплантат-перепонка» для гистологического исследования проводилось следующим образом. Объектом для гистологического исследования данной зоны являлась барабанная перепонка с прилежащей тканью имплантата и окружающими анатомическими структурами наружного, среднего и внутреннего уха после мирингопластики.

Для этого после выведения животных из эксперимента резецировали фрагмент височной кости с основными анатомическими структурами. Полученный материал фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине (BioVitrum ТУ 205952-002-33571120-2019), в последующем

осуществлялось её декальцинирование в кислотном растворе (Biodek R 05-03009Q). После оптимального размягчения костной ткани (завершения процесса декальцинации) проводился фронтальный разрез резецированного фрагмента, разделяющий барабанную перепонку, стенки и отделы слухового прохода на две части. Далее материал укладывался в гистологические кассеты толщиной не более 5 мм, проходили проводку в тканевом процессоре карусельного типа (Leica TP1020) для получения парафиновых блоков. В последующем с каждого парафинового блока получали репрезентативные гистологические срезы толщиной 5 микрон, которые окрашивали по стандартному протоколу гематоксилином и эозином.

Морфологическими критериями оценки особенности репаративного процесса после имплантации зоны дефекта барабанной перепонки служили появление гистологических признаков «фаз-стадии» созревания соединительной ткани. Как известно механизмы физиологической и репаративной регенерации едины. Первая фаза репаративного процесса является стадия формирования юной грануляционной ткани, когда отмечается новообразование сосудов с появлением значительного числа тонкостенных капилляров и молодых моноцитарных клеток, эпителиоцитов. Вторая фаза – стадия созревания грануляционной ткани сопровождается уменьшением количества капилляров и появлением нежной волокнистой ткани, склерозом и облитерацией микрососудов, уменьшением моноцитарных клеток, лимфоцитов, трансформацией эпителиоидных клеток в макрофаги и гигантские клетки как ответная местная реакция на имплантат в зоне дефекта. Третья фаза – данная стадия характеризуется формированием зрелой волокнистой соединительной ткани, созреванием коллагеновых волокон, которые приобретают пучково-волокнистое строение. При репаративной регенерации происходит происходить полная восстановление поврежденной ткани с восполнением функции, что обозначается как реституция и наблюдается преимущественно в тканях где преобладает клеточная регенерация. Если имеет место неполное восстановление и с ущербом ткани, когда происходит замещение ее грубоволокнистой соединительной тканью формированием фиброза (рубца) обозначается как субституция. Этот вид регенерации характерен для органов и тканей где преобладает внутриклеточная форма регенерации. Суть неполной формы регенерации не в замещении дефекта рубцом, а в компенсаторной гиперплазии элементов оставшейся специализированной ткани или ее гипертрофии. Регенерация соединительной ткани начинается с пролиферации молодых мезенхимальных элементов и новообразования микрососудов, между сосудами много недифференцированных лимфоцитоподобных клеток соединительной ткани, лейкоцитов, плазматических клеток и лаброцитов, происходит – фаза формирования грануляционной ткани, имеющий характерный вид, макроскопически она сочная темно-красного цвета с зернистостью. В дальнейшем происходит созревание грануляционной ткани, в основе которого лежит дифференцировка клеточных элементов, волокнистых структур

(коллагеновых волокон), а также сосудов, при этом число гематогенных клеток уменьшается, а фибробластов – увеличивается. Как известно, с фибробластами связано образование тропоколлагена и глюкозаминогликанов соединительной ткани в связи с чем в межклеточных пространствах образуются нежные аргирофильные волокна, а в последующем коллагеновые волокна. Синтез фибробластами глюкозаминогликанов приводит к их накоплению, особенно хондроитинсульфатов, в основном веществе соединительной ткани, которое расходуется на построение волокнистых структур. По мере дифференцировки, созревания фибробластов в фиброциты количество коллагеновых волокон увеличивается, они группируются в пучки, уменьшается количество сосудов. В финале созревания грануляционной ткани (3 фаза) завершается образованием грубоволокнистой соединительной ткани. Способность децеллюляризованного матрикса заключается в способности стимулировать процессы неоваскуляризации и регенерации, а также встраиваться в цепь физиологического метаболизма, предопределяет сбалансированность репаративных процессов без выраженных явлений воспалительных реакций, исключая при этом развитие иммунологического отторжения, что теоретически имеет преимущество перед синтетическими протезами в реконструкции

3.4.1 Морфологическая характеристика состояния зоны дефекта барабанной перепонки при имплантации, консервированной твердой мозговой оболочкой и децеллюляризованным матриксом ксенобрюшины

Как известно барабанная перепонка состоит из трёх слоёв: наружный, которая представлена эпидермисом, являющейся продолжением кожи наружного слухового прохода, средний слой - состоит из двух слоёв. Первый - из радиарно и циркулярно расположенных фиброзных волокон и внутренний слой - из слизистой оболочки, выстилающей барабанную полость. Барабанная перепонка чрезвычайно прочная, однако она может быть повреждена под воздействием резкого громкого звука, механической травмы. Во многих случаях она самовосстанавливается в течение нескольких недель, но в других может потребоваться хирургическое вмешательство. В эксперименте была создана модель перфоративного отита с дефектом барабанной перепонки, требующее миринопластики.

С целью оценки структурных изменений после миринопластики в эксперименте в зоне комплекса «имплантат-перепонка» с использованием консервированной твердой мозговой оболочки или децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины нами был проведен сравнительный анализ гистологической картины в сроки на 7 сутки, 24 и 30 день после завершения опыта. Выбор сроков эксперимента проведено с учетом репаративного процесса в физиологических тканях. Как известно, первая стадия характеризуется формированием юной грануляционной ткани,

представленная образованием тонкостенных капилляров и молодыми клетками типа эпителиоидных клеток, лимфоцитов, макрофагами, что происходит на 5-7 сутки после повреждения, вторая фаза – стадия созревания грануляционной ткани, начинается с 14 суток и характеризуется созреванием нежной волокнистой ткани и уменьшением клеточной реакции и количества сосудов, а на 28-30 сутки обычно должно происходить формирование грубоволокнистой соединительной ткани с завершением процесса репарации.

Морфологическое исследование проводилась простым слепым методом, при этом каждая группа животных по срокам опыта получило своё цифровое обозначение. После завершения микроскопического описания материала комплекса «*имплантат-перепонка*» проводилась расшифровка групп эксперимента. В последующем на основании полученных результатов гистологического исследования был проведен сравнительный анализ морфологической картины при использовании консервированной твердой мозговой оболочки или децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины в зоне дефекта барабанной перепонки после мирингопластики.

В сроке эксперимента на 7 сутки после мирингопластики с применением консервированной твердой мозговой оболочки в зоне контакта со стенками дефекта ткани барабанной перепонки в комплексе «*имплантат-перепонка*» отмечается формирование нежной соединительной ткани с рыхло переплетающимися волокнами (рис.13 а). Следует отметить, что в краевых зонах имплантации наблюдается инфильтрация макрофагами и лимфоцитами (рис.13 б), что является ответной местной компенсаторной реакцией. В основной части зоны имплантации по всей поверхности фиксации, консервированной твердой мозговой оболочки, происходит формирование юной грануляционной ткани с вращанием их в структуру подлежащей ткани барабанной перепонки (рис. 13 в, г), как проявление процесса репарации.

В других сериях эксперимента в данной группе также хорошо прослеживается созревание грануляционной ткани на протяжении всей зоны дефекта барабанной перепонки при использовании в качестве имплантата консервированной твердой мозговой оболочки.

Микроскопически структурные изменения были представлены формированием рыхлой соединительной ткани с переплетающимися волокнами, содержащие тонкостенные сосуды капиллярного типа, сохраняется рассеянная лимфоидная инфильтрация по краевой зоне имплантата (рис. 14). Данные морфологические изменения можно оценить, как реактивный компенсаторно-приспособительный процесс в зоне имплантации консервированной твердой мозговой оболочки комплекса «*имплантат-перепонка*».

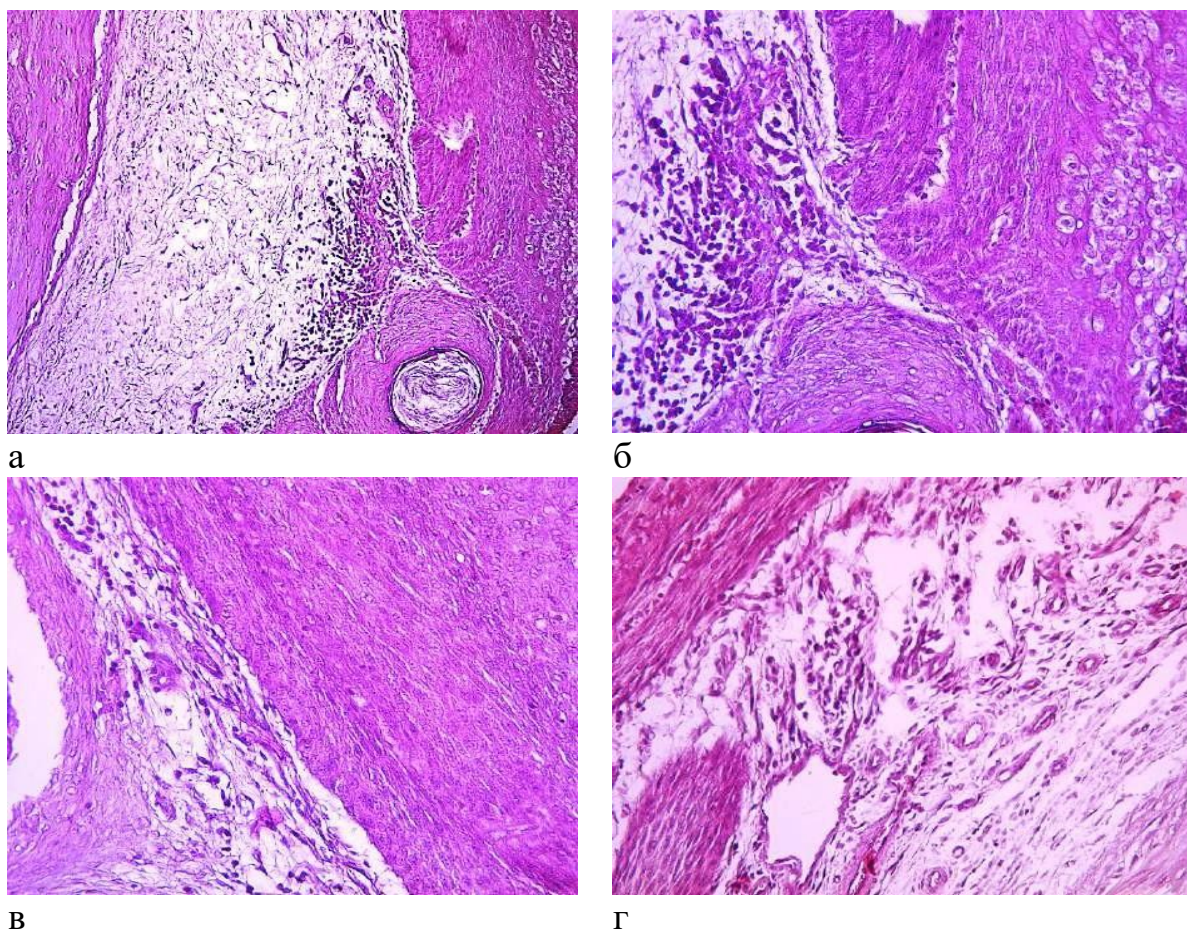


Рисунок 13 – Барабанная перепонка (эксперимент, группа 4.1; 5.1) – комплекс «имплантат-перепонка» консервированной твердой мозговой оболочкой, срок 7 сутки: а – г - зона дефекта представлена нежными переплетающимися волокнами соединительной ткани; а, б, в – краевая зона имплантата с инфильтрацией лимфоцитами; г – формирование хорошо васкуляризированной грануляционной ткани. Окраска: гематоксилином и эозином. Ув.: а – X 100; б, в, – X 200; г – X 400

В сроке на 21 сутки (эксперимент, группа 01.1.1) гистологическое исследование материала барабанной перепонки в комплексе «имплантат-перепонка» после мирингопластики с использованием ткани консервированной твердой мозговой оболочки отмечается созревание и формирование нежной волокнистой соединительной ткани в строме с умеренной инфильтрацией лимфоцитами и макрофагами, хорошо прослеживается зона васкуляризации тонкостенными сосудами с рассеянной лимфоидной инфильтрацией (рис. 14). Данная гистологическая картина является морфологическим эквивалентом задержки процесса репарации после имплантации зоны дефекта барабанной перепонки. В пограничной зоне имплантата и ткани барабанной перепонки наблюдается диффузная лимфо-лейкоцитарная инфильтрация, выявляются остатки гемостатической губки (рис. 14 г).

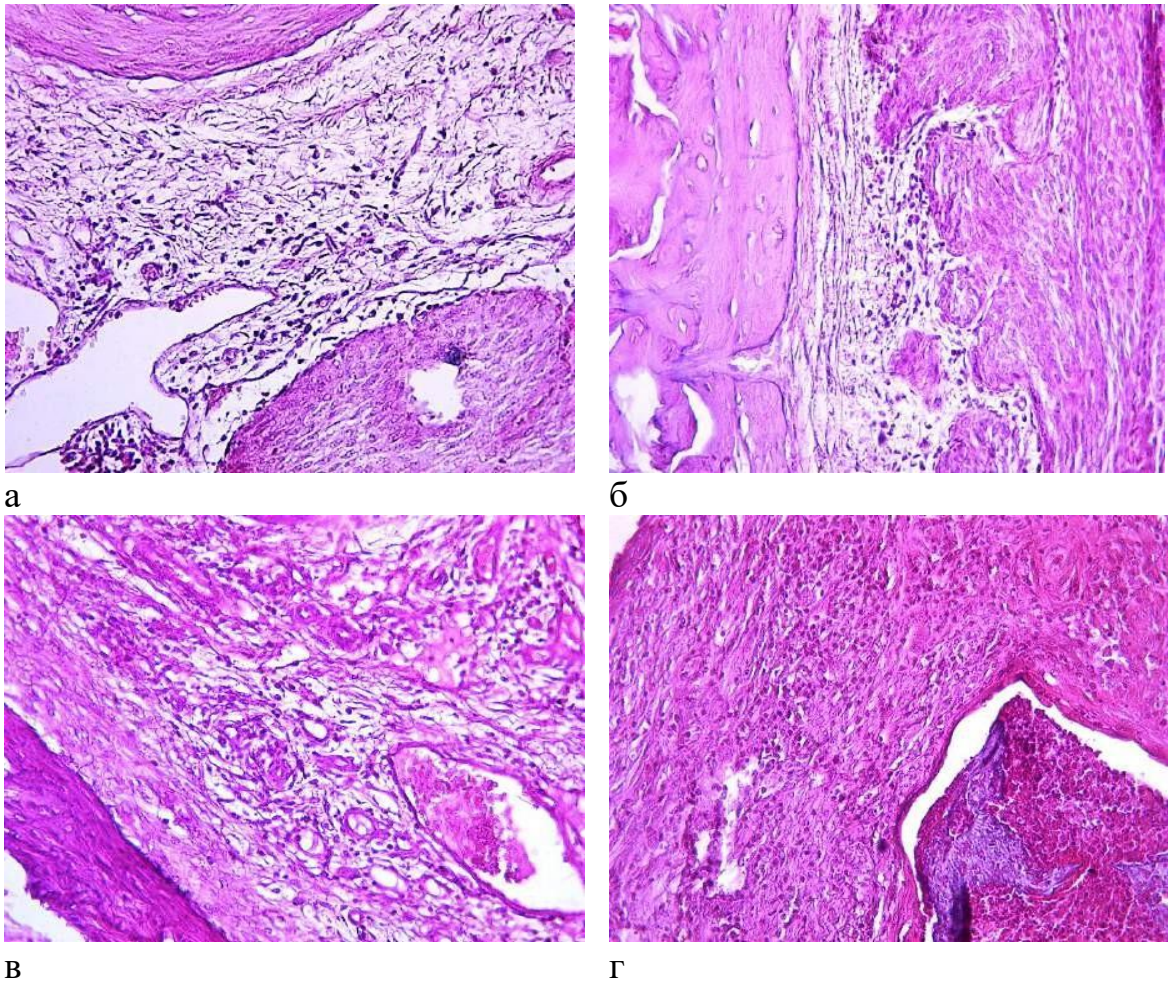


Рисунок 14 – Барабанная перепонка, срок 21 сутки (эксперимент, группа 01.1.1): миринопластика зоны дефекта с использованием консервированной твердой мозговой оболочки: а, б, в - формирование нежной волокнистой соединительной ткани с умеренной клеточной инфильтрацией; в – зона комплекса «имплантат-перепонка»: васкуляризация тонкостенными сосудами с рассеянной лимфоидной инфильтрацией; г – диффузная лимфо-лейкоцитарная инфильтрация в пограничной зоне имплантата и ткани барабанной перепонки и остатки гемостатической губки. Окраска: гематоксилином и эозином.
Ув.: X 400

На 30 сутки после завершения эксперимента в зоне комплекса «имплантат-перепонка» с пластикой, консервированной твердой мозговой оболочки, отмечается формирование грубоволокнистой ткани с хаотическим расположением соединительнотканых волокон, в краевых зонах имплантата сохраняется рассеянная инфильтрация лимфоцитами и отдельные очаги васкуляризации сосудами капиллярного типа (рис. 15), что указывает на не завершенность репаративного процесса после повреждения, хотя в эти сроки должно было происходить созревание волокнистой ткани при физиологических условиях.

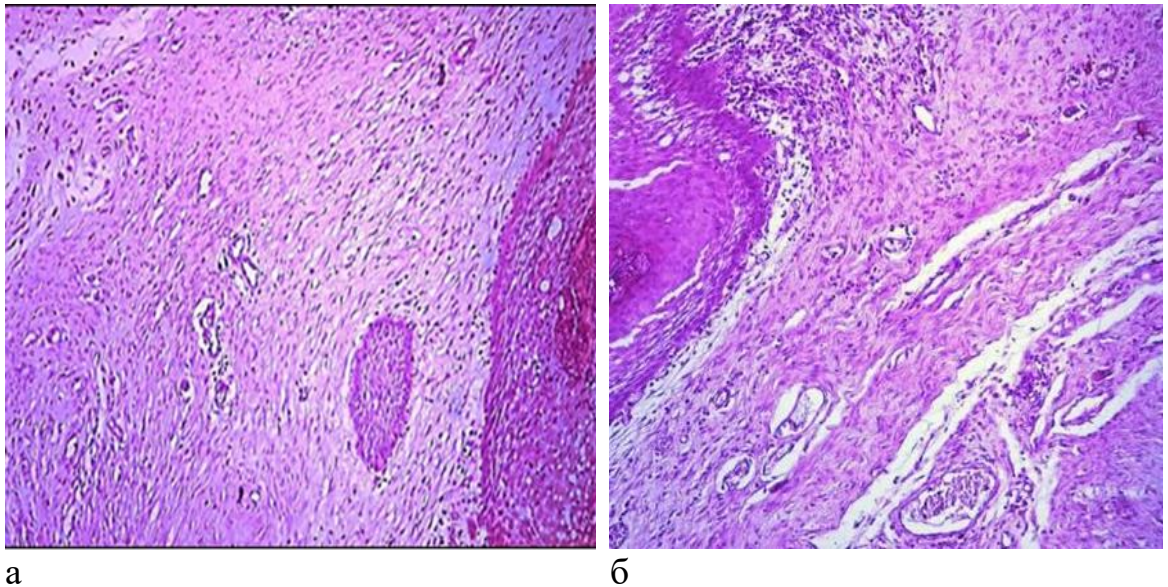
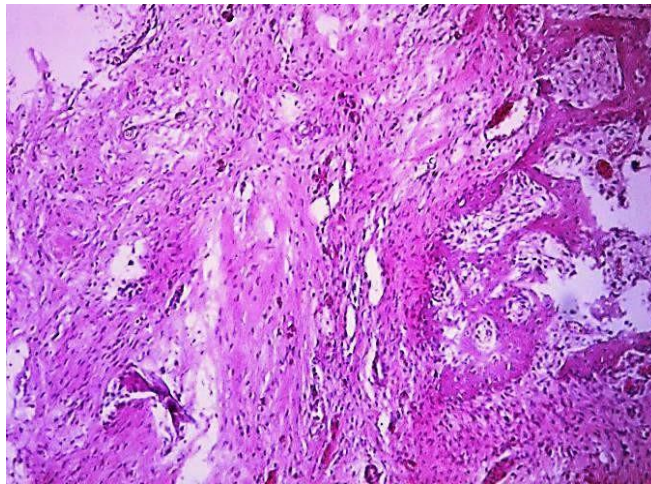


Рисунок 15. Барабанная перепонка, срок 30 суток после миринопластики комплекса «имплантат-перепонка» с использованием консервированной твердой мозговой оболочки, (эксперимент, группа 01.2.2):

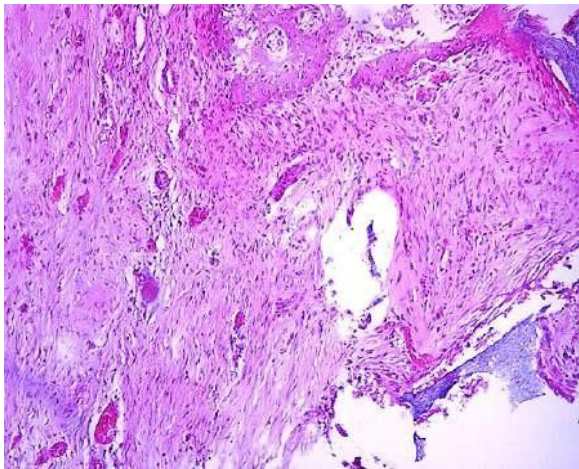
а,- формирование грубоволокнистой ткани; б - краевая зона, умеренно инфильтрирована лимфоцитами, имеются очаги васкуляризации. Окраска: гематоксилином и эозином. Ув.: а – X 200; б, в - X 400.

Во второй группе эксперимента, при проведении миринопластики с целью закрытия дефекта барабанной перепонки в качестве имплантата был использован децеллюляризованный матрикс ксенобрюшины и дана морфологическая оценка динамики репаративного процесса в разные сроки опыта в зоне комплекса «имплантат-перепонка».

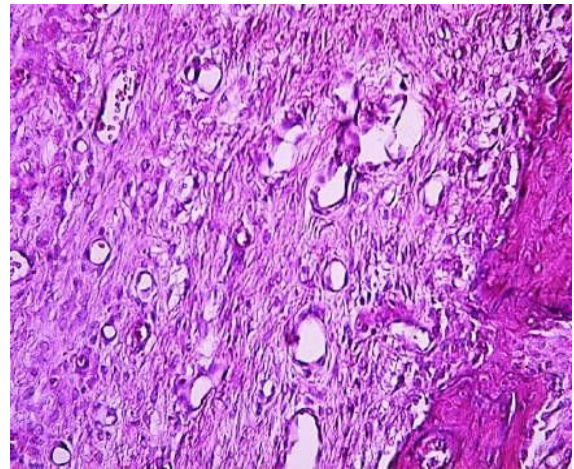
На 7 сутки эксперимента после имплантации децеллюляризованным матриксом ксенобрюшины зоны дефекта барабанной перепонки комплекса «имплантат-перепонка» отмечается формирование юной грануляционной ткани, что характеризуется наличием клубков мелких тонкостенных сосудов капиллярного типа в структуре нежной волокнистой соединительной ткани и умеренная клеточная инфильтрация (рис. 16), клеточная инфильтрация отсутствует. Хорошо прослеживается пограничная зона с тканями барабанной перепонки в виде гиалинового хряща и видны остатки гемостатической губки, использованной в качестве фиксатора имплантата к барабанной перепонке.



а



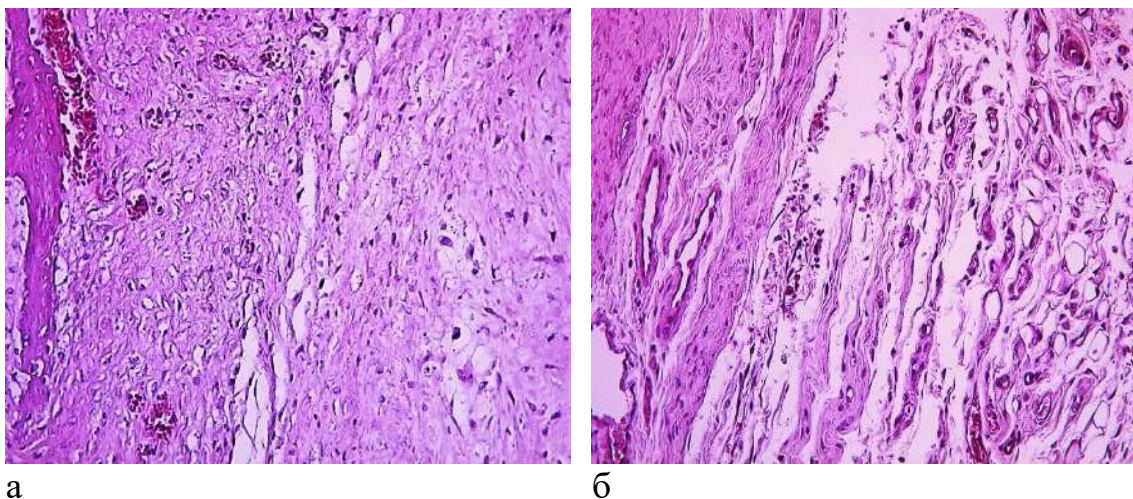
б



в

Рисунок 16 – Барабанная перепонка комплекса «имплантат-перепонка», при имплантации децеллюляризованным матриксом ксенобрюшины, срок 7 сутки: а, б - зона дефекта формирование грануляционной ткани с наличием клубков мелких сосудов. Окраска: гематоксилином и эозином. Ув.: X 200

В других группах исследования в эти же сроки также наблюдали, что после миринопластики децеллюляризованным матриксом ксенобрюшины происходит формирование грануляционной ткани, представленной нежной волокнистой соединительной тканью с наличием сосудов капиллярного типа, отмечается умеренный межклеточный отек, инфильтрация макрофагами и лимфоцитами отсутствовала (рис. 17).



а

б

Рисунок 17 – Барабанная перепонка комплекса «имплантат-перепонка», мирингопластика децеллюляризированным матриксом ксенобрюшины, срок 7 сутки: а – отмечается формирование юной грануляционной ткани в структуре волокнистой соединительной ткани; б – межклеточный отек. Окраска: гематоксилином и эозином. Ув.: а – X 100; б – X 200

В сроке 21 сутки эксперимента при гистологическом исследовании зоны имплантата барабанной перепонки после мирингопластика децеллюляризированным матриксом ксенобрюшины отмечено в комплексе «имплантат-перепонка» созревание волокнистой соединительной ткани, которая характеризовалась пучковым расположением волокон, в пограничной зоне имплантата выявлялись остатки гемостатической губки. В эти сроки было характерно уменьшение количества сосудов капиллярного типа. В других группах эксперимента в эти же сроки мы уже наблюдали, что происходит формирование соединительной ткани, когда пучки волокон принимали параллельное расположение (рис. 18).

Следует отметить, что и в других группах при гистологическом исследовании также отмечалось формирование зрелой волокнистой соединительной ткани с пучковым и параллельным расположением волокон между элементами хрящевой ткани и эпидермиса.

Таким образом, в срок на 21 сутки эксперимента отмечена динамика репаративных процессов после мирингопластика децеллюляризированным матриксом ксенобрюшины с фазовым созреванием грануляционной ткани и формированием волокнистой соединительной ткани, где волокна приобретают пусково-волокнистое расположение.

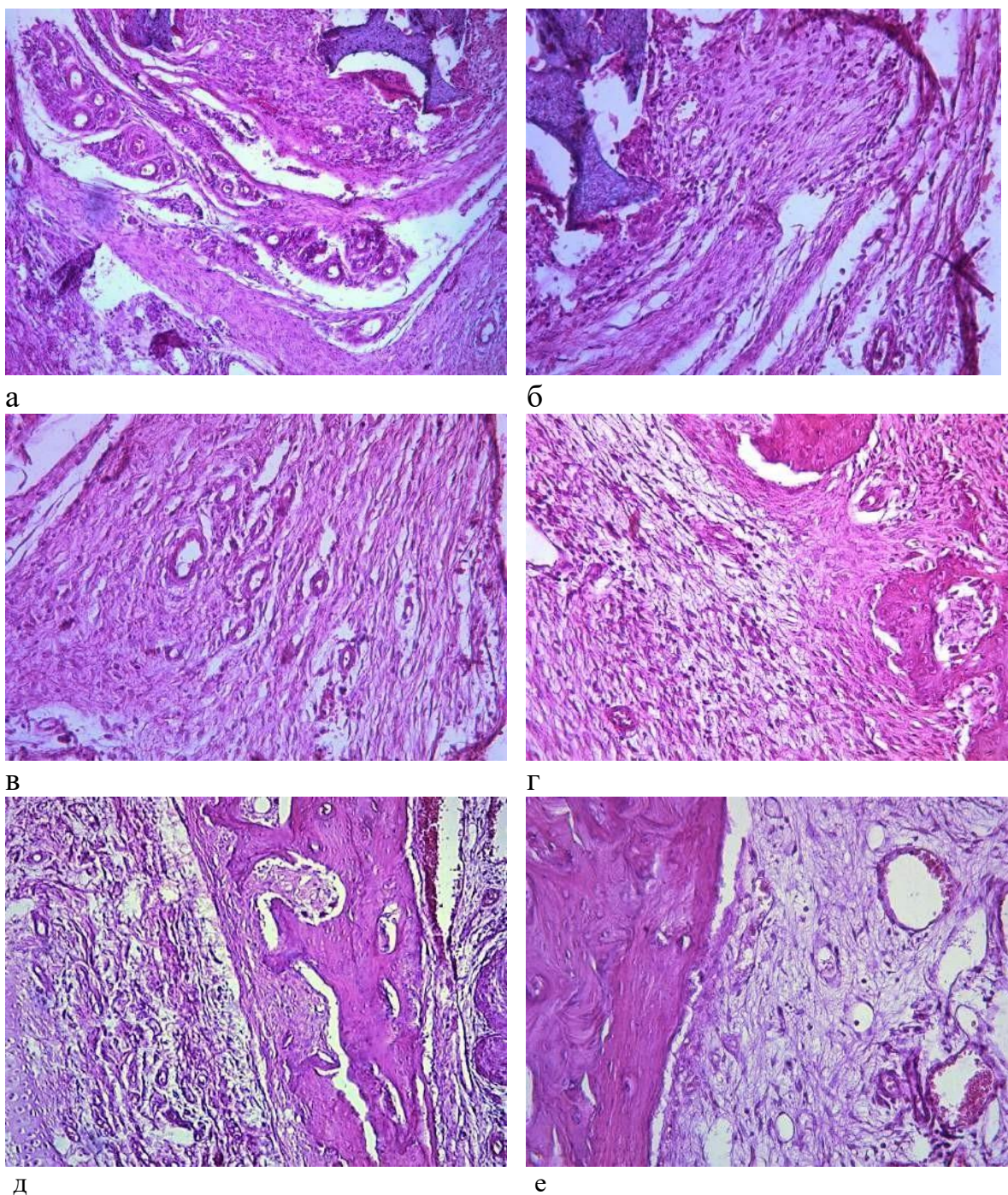
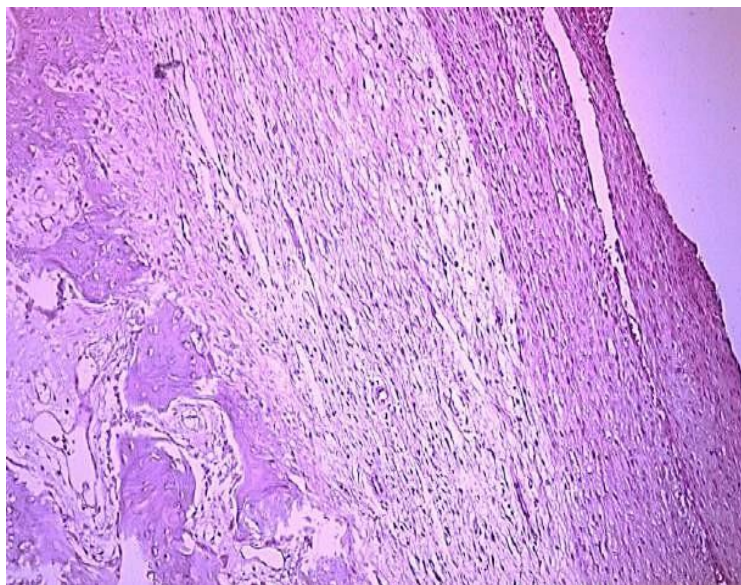


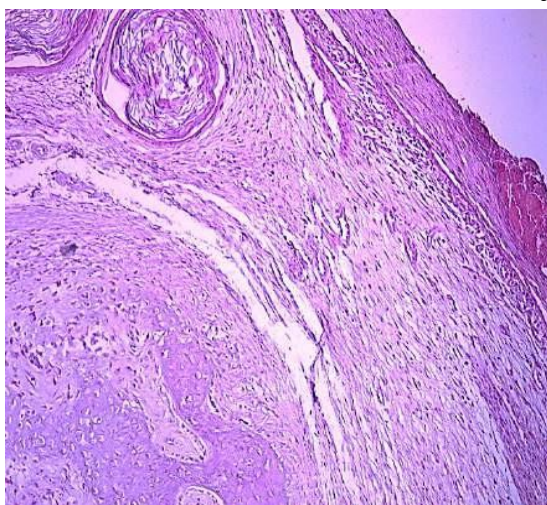
Рисунок 18 – Барабанная перепонка, миринопластика децеллюляризованным матриксом ксенобрюшины, срок 21 сутки: а, б – созревание волокнистой соединительной ткани с пучковым расположением, в пограничной зоне остатки гемостатической губки; в, г – уменьшение количества сосудов, формирование параллельно расположенных пучков волокон зрелой соединительной ткани; д, е – созревание волокнистой ткани. Окраска: гематоксилином и эозином. Ув.: а, б – X 100; в, г – X 200

На 30 сутки эксперимента, гистологическое исследование, материала зоны пластики дефекта барабанной перепонки децеллюляризованным матриксом ксенобрюшины комплекса «имплантат-перепонка» после миринопластики, показало, что происходит формирование зрелой

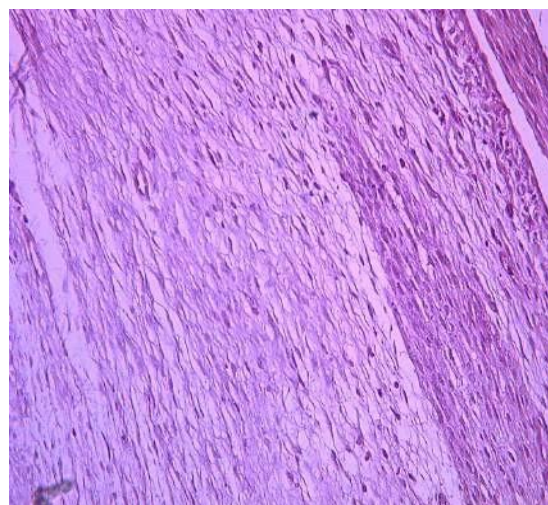
волокнистой соединительной ткани, где отмечается регресс сосудов капиллярного типа, клеточная лимфоидно-макрофагальная реакция отсутствует. Морфологическая оценка результатов гистологического исследования показало отражение положительной динамики репаративного процесса (рис.19).



а



б



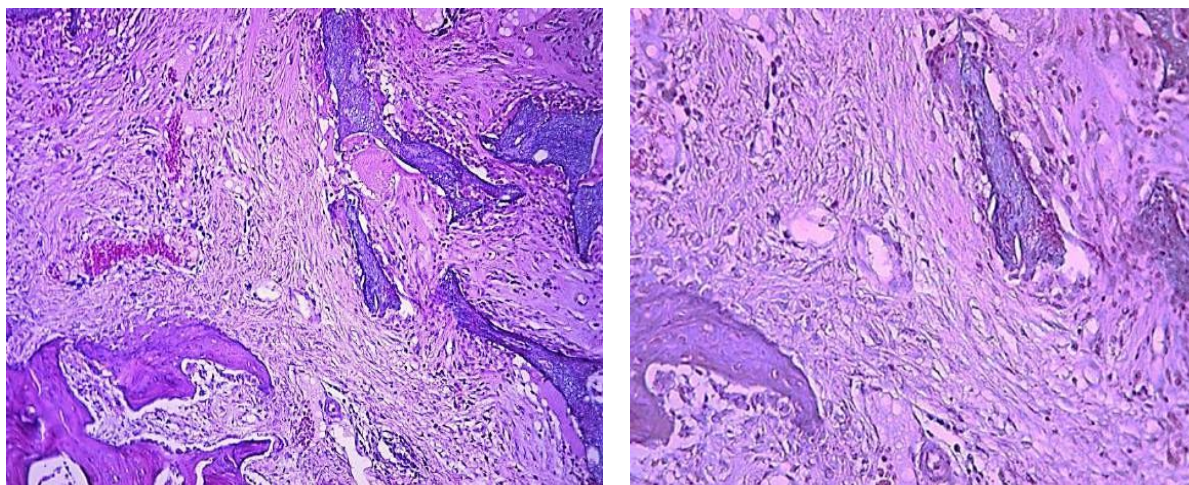
в

Рисунок 19 – Барабанная перепонка, срок 30 суток. Мирингопластика децеллюляризированным матриксом ксенобрюшины, комплекс «имплантат-перепонка»: формирование зрелой волокнистой соединительной ткани с параллельным расположением волокон соединительной ткани (а,б,в). Окраска: гематоксилином и эозином.

Ув.: а – X 200; б, в - X 400

В других группах проведенного эксперимента также мы при гистологическом исследовании отмечали фазовое созревание грануляционной ткани с формированием зрелой волокнистой соединительной ткани, в некоторых наблюдениях в пограничной зоне выявляются фрагменты остатков гемостатической губки (рис. 20).

Таким образом, результаты проведенного сравнительного анализа гистологической картины в зоне комплекса «имплантат-перепонка» показало динамику фаз репаративного процесса в разные сроки эксперимента после миринопластики децеллюляризированным матриксом ксенобрюшины.



а

б

Рисунок 20 – Барабанная перепонка, срок 30 сутки. Миринопластика децеллюляризированным матриксом ксенобрюшины: отмечается формирование грубоволокнистой ткани с тенденцией параллельно-пучковым расположением волокон соединительной ткани в пограничной зоне «а, б – зона «имплантат-перепонка». Окраска: гематоксилином и эозином. Ув.: X 200

При этом отмечено, что формирование юной грануляционной ткани с новообразующимися сосудами отмечается на 7 сутки эксперимента, на 21 сутки происходит созревание грануляционной ткани с формированием волокнистой соединительной ткани и на 30 сутки опыта отмечено созревание зрелой волокнистой соединительной ткани с параллельным расположением волокон, что является показателем положительной динамики репаративного процесса [106].

3.4.2 Морфометрический анализ тканевой реакции в зоне «имплантат- перепонка»

Для достижения цели и решения поставленной задачи было проведено сравнительное морфометрическое исследование в представленных группах (1) тканевой реакции зоны имплантации используемого матрикса с барабанной перепонкой и (2) ремоделирования комплекса «имплант-перепонка». Оценка тканевой реакции и ремоделирования комплекса «имплант-перепонка» проводилась при большом увеличении объектива микроскопа (x200) на 10 случайных полей зрения.

Основные морфометрические измерения и фотографирование проводилось с помощью микроскопа «Leica DM1000» с цифровым цветным микрофотографированием и программным обеспечением «Image».

Морфометрические измерения осуществляли в соответствии с рекомендациями 10993-6 (ISO10993-6.).

Тканевая реакция.

Воспаление оценивали количественным методом путем морфометрии полиморфноядерных гранулоцитов в зоне имплантации. Рассчитывалось среднее количество полиморфноядерных гранулоцитов на увеличении $\times 200$ на 10 полей зрения.

Неоваскуляризация. Сосуды идентифицировали по наличию красных кровяных телец и эндотелиальных клеток. При оценке васкуляризации количество сосудов оценивали на тех же участках ткани, что и клеточный инфильтрат. Среднее количество сосудов рассчитывалось на 10 полей зрения на увеличении $\times 200$.

Ремоделирование комплекса «имплант-перепонка». Была проведена сравнительная морфометрическая количественная оценка толщины барабанной перепонки с имплантом, оценка эпителизации барабанной перепонки и качественная оценка созревания коллагена собственной пластинки.

Оценка толщины барабанной перепонки с имплантом является относительным показателем восстановления непрерывности барабанной перепонки и патологической репарации (гипорегенерации - истончение в динамике от различных сроков и гиперрегенерации – утолщение в динамике от различных сроков).

В каждом образце исследовалось наличие или отсутствие эктодермального и энтодермального эпителиального слоя с целью определения восстановления нормальной трехслойной структуры.

Для структурной оценки созревания собственной пластинки проводили полуколичественную оценку организации коллагеновых волокон. Для коллагена собственной пластинки оценивалось распределение коллагеновых волокон (хаотичное или упорядоченное). В каждом представленном образце оценивался паттерн коллагена. При наличии паттерна присваивалось значение «1», при отсутствии - значение «0». Основная морфологическая характеристика паттернов распределения коллагеновых волокон представлена в таблице 10.

Морфометрический анализ тканевой реакции в зоне «имплант-перепонка» не показал статистически значимых различий в исследуемых группах/подгруппах (Таблица 11). Клеточная инфильтрация носила фокальный, лёгкой степени характер, отражающий реактивный процесс, направленный на формирование репаративного микроокружения в зоне комплекса «имплант- перепонка» (рисунок 21). Структурная оценка тканевой реакции демонстрировала позитивный динамический процесс относительного снижения количества воспалительных элементов в различных сроках с фокальными единичными лимфо-макрофагальными клетками на 30 день.

Таблица 10 - Распределение коллагена в собственной пластинке

	Хаотичное	Упорядоченное
Патологическое строение - структурная незрелость	Коллагеновые волокна различной ширины, извитые, с завихрениями, с неравномерным Расстоянием между волокнами, наличие звездчатых гиперхромных клеток. Подобное строение ассоциируется с относительно низкой степенью эластичности (как по степени, так и по длительности); может также встречаться при склерозе и хроническом воспалении.	
Нормальное строение - структурная зрелость		Коллагеновые волокна одинаковой ширины, равномерно извитые, параллельно расположены с равномерным расстоянием между волокнами, с наличием уплощённых клеток, расположенных в линейном порядке между волокнами.

На 7 сутки эксперимента зона «имплант-перепонка» характеризовалась активной тканевой реакцией, но с умеренной клеточной инфильтрацией в обеих группах. В группе с пластикой твёрдой мозговой оболочкой в большей части исследуемых гистологических срезов отмечалось относительно большее количество полиморфноядерных лейкоцитов, равномерно распределённых по всей поверхности трансплантата, без образования микроабсцессов и выраженной инфильтрации. При использовании ксенобрюшины полиморфноядерные лейкоциты преимущественно распределялись на границе трансплантата с собственными тканями, частично проникая в трансплантат без выраженной инфильтрации. Статистически значимых отличий по количеству полиморфноядерных лейкоцитов между

группами с использованием твёрдой мозговой оболочки (13 [9.25; 15.0]) и ксенобрюшины (11 [8.25; 11.5]) выявлено не было ($p=0.353$).

Таблица 11 – Морфометрические значения тканевой реакции в исследуемых группах/подгруппах

	Полиморфноядерные лейкоциты (Me [Q1; Q3])	Неоваскуляризация (Me [Q1; Q3])
7 суток		
ТМО	13 [9.25; 15.0]	20.5 [19; 22.75]
ДеКБ	11 [8.25; 12.5]	23 [18.75; 24.5]
P-value	0.353	0.436
21 сутки		
ТМО	4.5 [3; 6.75]	17 [12.5; 18.75]
ДеКБ	3 [1.25; 5.5]	14 [9.5; 18.5]
P-value	0.190	0.481
30 суток		
ТМО	0 [0; 1]	4 [2; 5]
ДеКБ	0 [0; 0]	2.5 [1.25; 4]
P-value	0.280	0.353

Через 21 сутки эксперимента клеточная реакция значительно снизилась в обеих группах. В большинстве исследуемых образцов в обеих группах отмечались единичные полиморфноядерные лейкоциты, и только в 1 случае в группе с использованием твёрдой мозговой оболочки был выявлен микроабсцесс. По количеству полиморфноядерных лейкоцитов статистически значимых различий между группами выявлено не было ($p=0.190$).

На 30 сутки эксперимента в обеих группах только в единичных случаях отмечались единичные полиморфные лейкоциты. По количеству полиморфноядерных лейкоцитов статистически значимых различий между группами выявлено не было ($p=0.280$) (рисунок 21).

Морфометрический анализ количества сосудов в каждом из рассматриваемых сроков не показал статистических различий между твёрдой мозговой оболочкой и ксенобрюшиной.

На 7 сутки эксперимента вокруг трансплантата в обеих группах отмечалась активная тканевая реакция в виде выраженного неоангиогенеза и вазодилатации микрососудов. Большая часть сосудов расширена, сосуды тонкостенные с периваскулярным отеком. В просвете сосудов отмечалось краевое стояние лейкоцитов и моноцитов с миграцией в окружающую ткань через трансэндотелиальный переход. Медиана количества сосудов в группе с твёрдой мозговой оболочкой и ксенобрюшиной составила 20.5 [19; 22.75] и 23 [18.75; 24.5] соответственно ($p=0.436$).

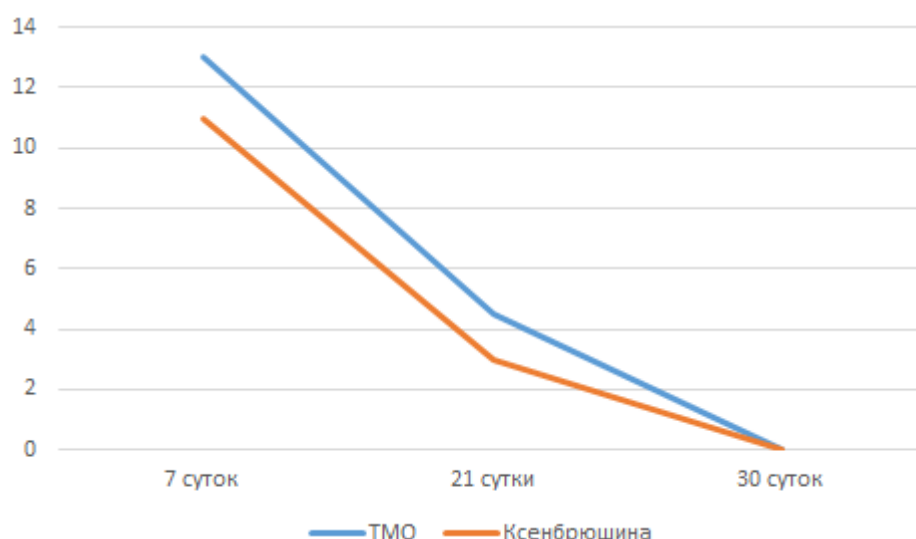


Рисунок 21 – Морфометрический анализ клеточного инфильтрата в зоне имплантации «имплант- перепонка»

На 21 сутки эксперимента количество визуализируемых сосудов в группе с твердой мозговой оболочкой и ксенобрюшиной уменьшилось (17 [12.5; 18.75] и 14 [9.5; 18.5] соответственно), просвет определяющихся сосудов был значительно сужен, в нем определялись единичные эритроциты. Статистически значимых отличий между группами по количеству сосудов не выявлено ($p=0.481$).

На 30 сутки эксперимента в обеих группах по краю трансплантатов расположено небольшое количество сосудов, представленных преимущественно артериолами и капиллярами с единичными эритроцитами в просвете сосудов (рисунок 22).

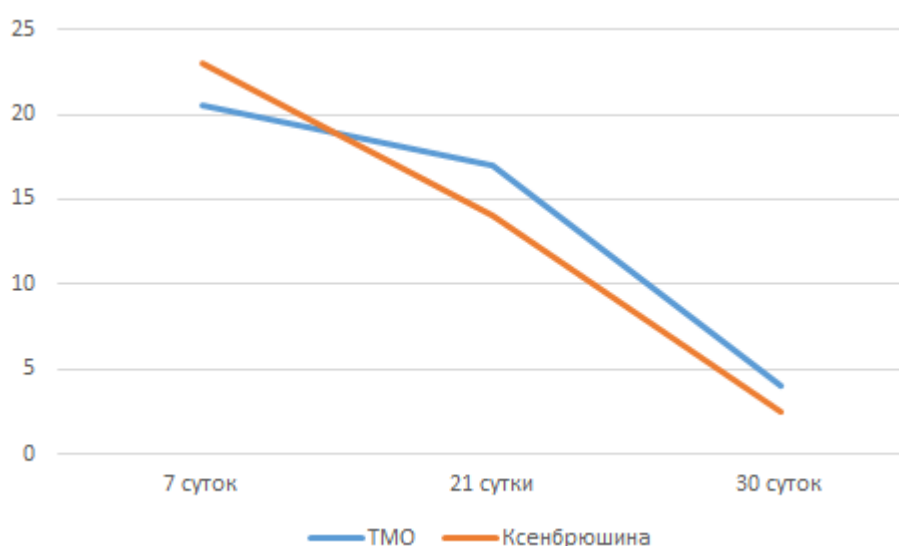


Рисунок 22 – Морфометрический анализ неоваскуляризация в зоне имплантации «имплант- перепонка»

Таким образом, результаты морфологического исследования в динамике показали, что на 7 сутки в обеих группах происходит ранняя

умеренная реактивная/репаративная тканевая реакция без признаков некротического воспаления. Вокруг аутотрансплантата развиваются острые/подострые реактивные воспалительные изменения с развитием демаркационного вала из тонкостенных сосудов. Клетки имеют преимущественно лимфо-гистиоцитарное и моноцитарно-макрофагальное происхождение. Различий в активности воспаления между группами не выявлено, но в ксенобрюшине, в отличие от твёрдой мозговой оболочки, клеточный компонент в меньшей степени проникает в толщу трансплантата, и в большей степени, окружают его с разных сторон.

Установлено, что к 21-му дню эксперимента, реактивная тканевая реакция стабилизируется, а на 30-е сутки в обеих группах сравнительное гистологическое исследование не показало морфологических признаков активной тканевой реакции и активного воспалительного паттерна на трансплантат.

Полученные показатели результатов морфометрического исследования являются морфологическими критериями биосовместимости ксенобрюшины. Они демонстрируют, что материалы как ксенобрюшины, так и твердой мозговой оболочки биосовместимы и хорошо переносятся животными, вызывают приемлемые тканевые реакции, включая минимальную реактивную клеточную реакцию и неоваскуляризацию ткани после имплантации, как стадийно-фазовый репаративный процесс. Компоненты используемых имплантатов в процессе ремоделирования и репарации на 7, 21 и 30 сутки эксперимента не показали фокальных структурных патологических тканевых реакций.

Таким образом, твердая мозговая оболочка и ксенобрюшина хорошо переносятся животными и на протяжении всего исследования демонстрируют высокую биосовместимость.

Гистоморфометрический анализ выявил статистически значимые различия между исследуемыми группами/подгруппами как по толщине барабанной перепонки/собственной пластинки, так по эпителизации с восстановлением исходной трехслойной структуры барабанной перепонки (Таблица 12).

На 7 сутки эксперимента в группе с использованием твердой мозговой оболочки толщина барабанной перепонки (124 [122.2;125.4]) была больше, чем в группе с использованием ксенобрюшины (117.8 [116.3; 120.7]). Активная фаза воспаления в обеих группах характеризовалась отеком, набуханием и разволокнением собственной пластинки.

На 21 сутки эксперимента в обеих группах произошло некоторое уменьшение толщины собственной пластинки за счёт снижения отека и активной фазы тканевой реакции. Собственная пластинка становится уплотнённой, волокнистые структуры гомогенизированы, без набухания и разрыхления. Медиана толщины барабанной перепонки в группе с ксенобрюшиной была меньше, чем в группе с твёрдой мозговой оболочкой и составляла соответственно 61.6 [53.5; 62.3] и 86.8 [80.1; 88.4].

Таблица 12 - Толщина барабанной перепонки и мезодермальной пластинки барабанной перепонки в исследуемых группах

	Толщина барабанной перепонки с имплантом, μm (Me [Q1; Q3])	Толщина собственной пластинки, μm (Me [Q1; Q3])	Наличие эктодермального эпителия n (%)	Наличие энтодермального эпителия n (%)
7 суток				
ТМО	124 [122.2; 125.4]	-	-	-
ДеКБ	117.8 [116.3; 120.7]	-	-	-
P-value	<0,0001			
21 сутки				
ТМО	86.8 [80.1; 88.4]	83.9 [75.5; 85.2]	2 (20%)	3 (30%)
ДеКБ	61.6 [53.5; 62.3]	59.4 [51.7; 60.1]	4 (40%)	6 (60%)
P-value	<0,0001	<0,0001	0.626	0.369
30 суток				
ТМО	56.0 [55.4; 57.3]	53.9 [52.5; 55.2]	4 (40%)	3 (30%)
ДеКБ	41.7 [40.7; 47.9]	38.4 [38.0; 40.4]	7 (70%)	9 (90%)
P-value	<0,0001	<0,0001	0.369	0.023
<i>Жирным шрифтом выделены статистически значимые отличия ($p < 0,05$)</i>				

Одновременно в обеих группах наблюдалась эпителизация поверхности со стороны среднего уха. При этом регенеративная активность эпителия увеличивалась и происходила постепенная эпителизация поверхности трансплантата. На периферии трансплантата отмечался многорядный и гиперхромный эпителий. Со стороны наружного уха эпителизация в обеих группах проходила медленнее (4(40%) животных в группе с ксенобрюшиной и 2(20%) животных в группе с твёрдой мозговой оболочкой). В обеих группах в части гистологических срезов отмечались дистрофические изменения, акантоз и паракератоз в многослойном плоском эпителии. В обеих группах исследования эпителизация происходила в виде появления сначала однослойного, затем многослойного эпителия. Эпителий постепенно смещался с краёв к середине трансплантата. Статистически значимых различий в образовании экто- и энтодермального эпителия в 21 сутки эксперимента между группами не выявлено.

На 30 сутки между группами выявлено различие по частоте встречаемости энтодермального эпителия ($p=0,023$). В группе с ксенобрюшиной статистически значимо чаще отмечалось полная эпителизация внутренней поверхности комплекса «имплантат-перепонка» в

сравнении с твёрдой мозговой оболочкой (9 (90%) и 3 (30%) соответственно). Мы считаем, что это связано с относительно более ранней эпителизацией внутреннего слоя при применении ксенобрюшины в сравнении с эпителизацией при использовании твёрдой мозговой оболочки. Более ранняя или ускоренная эпителизация внутреннего слоя возможно связано с более ранним ремоделированием и созревании собственной пластинки при пластике ксенобрюшиной в отличие от твёрдой мозговой оболочки.

Результаты морфологического исследования показали, что через месяц после имплантации ксенобрюшины в месте перфорации барабанной перепонки происходит восстановление исходной трёхслойной структуры барабанной перепонки. В группе с использованием ксенобрюшины в зоне имплантации все клеточно-тканевые элементы наиболее близки по гистологическому строению к неповреждённой/нативной ткани барабанной перепонки в и вне зоны перфорации. Со стороны наружного слухового прохода, покровный эпителий представлен многослойным плоский эпителием, состоящим из равномерно расположенных слоев плоского эпителия. Со стороны среднего уха покровный эпителий представлен многорядным призматическим эпителием. Расположенная под эпителием собственная пластинка представлена тонкой и однородной фиброзной тканью.

Таблица 13 – Паттерны распределения коллагена в собственной пластинке в исследуемых группах

	Хаотичное	Упорядоченное	P-value
7 суток			
ТМО	-	-	-
ДеКБ	-	-	
21 сутки			
ТМО	10(100%)	0 (0%)	p=0,039
ДеКБ	5 (50%)	5 (50%)	
30 суток			
ТМО	8 (80%)	2 (20%)	p= 0.008
ДеКБ	1 (10%)	9 (90%)	

Анализ показал статистически значимые различия паттернов распределения коллагена между группами (Таблица 13). В группе с ксенобрюшиной, в отличие от твёрдой мозговой оболочки, преобладали гистологические паттерны более упорядоченного восстановления коллагеновых волокон собственной пластинки.

На 21 сутки в группе с ксенобрюшиной в 5 (50%) случаев и 0 (0%) в группе с твёрдой мозговой оболочкой определялись коллагеновые волокна примерно одинаковой ширины, равномерно извитые, расположенные преимущественно параллельно с равномерным расстоянием между волокнами и с наличием уплощённых клеток, расположенных в линейном порядке между волокнами. Напротив, 5 (50%) участках ксенобрюшины и 10 (100%) случаев

в группе с твердой мозговой оболочкой определялись коллагеновые волокна различной ширины, выражено извитые, с участками завихрений и неравномерным расстоянием между волокнами, а также с наличием звездчатых гиперхромных клеток.

На 30 сутки в группе с ксенобрюшиной количество участков с гистологическим паттерном, соответствующим «упорядоченному» распределению коллагена наблюдалось в 2 (20%) случаях в группе с твердой мозговой оболочкой и 9 (90%) случаях в группе с ксенобрюшиной. В 8 (80%) случаях в группе с твердой мозговой оболочкой и 1 (10%) случае с ксенобрюшиной собственная пластинка выглядела структурно дезорганизованной, с хаотичным и выражено извитым расположением коллагена.

Таким образом, в обеих группах наблюдается последовательное увеличение отложения коллагена в lamina propria, однако использование ксенобрюшины приводит к образованию ткани, имеющей наиболее организованный коллагеновый матрикс, с преобладанием паттерна «упорядоченного» коллагена, сходного с нативной тканью.

В этом исследовании мы сравнили два материала (твердую мозговую оболочку и ксенобрюшину) в использовании для пластики барабанной перепонки. Оба материала продемонстрировали свою эффективность: плотно прилегали к месту дефекта и обеспечивали стабильную поддержку в период регенерации, ускоряя и улучшая процесс заживления.

Импланты ксенобрюшины и твердой мозговой оболочки демонстрировали лёгкую воспалительную реакцию без гистопатологических признаков аллергического, гнойного процесса и некротических изменений. Активность тканевой реакции в зоне имплант-перепонка с течением времени (7, 21 и 30 день) постепенно уменьшалась, не переходя в хроническую фазу воспаления. Постепенное заселение ткани импланта, как ксенобрюшины, так и ТМО, мезенхимальными элементами в совокупности с неоваскуляризацией сопровождалось постепенным ремоделированием области имплантации.

Морфометрический анализ показал, что восстановление барабанной перепонки наблюдалось как в группе с твердой мозговой оболочкой, так и с ксенобрюшиной. В то же время применение ксенобрюшины демонстрирует более высокий потенциал восстановления непрерывности, толщины и исходной трёхслойной структуры барабанной перепонки. В группе с пластикой ксенобрюшиной чаще встречалось полное трёхслойное восстановление барабанной перепонки в комплексе с имплантатом на 30 день эксперимента. Мы полагаем, что это связано с анатомическими особенностями и физическими свойствами биологического матрикса ксенобрюшины, а именно его толщиной и структурным гистологическим строением, которое является благоприятной основой для миграции мезенхимальных элементов, их упорядоченного прорастания с формированием плотного эластичного остова собственной пластинки.

Использование механической опоры трансплантата важно для заживления перфорации барабанной перепонки, так как для процесса

регенерации барабанной перепонки необходимо наполнение эпителия в место дефекта. Механическая опора улучшает заживление за счёт обеспечения структурной поддержки для миграции эпителия и закрытия дефекта. Кроме того, она обеспечивает подходящую среду для инфильтрации мезенхимальных клеток и ангиогенеза, в результате чего происходит восстановление фиброзного слоя. Также трансплантат регулирует заживление фиброзного слоя, предотвращая высыхание повреждённой барабанной перепонки и закрывает место перфорации.

При использовании биоматериалов для мирингопластики следует помнить, что имплантат может потерять упругость, эластичность и долговечность из-за утолщения и нарушения морфологической структуры. Изменённая структура коллагеновых волокон, очаговая гиперклеточность и пролиферация сосудов может нарушить нормальную функцию ткани, ухудшая снижение межволоконного сцепления пучков коллагена, что вызывает структурную жёсткость. Количественный дисбаланс между структурными компонентами также приводит к уменьшению упругости ткани.

Ксенобрюшина, в отличие от твёрдой мозговой оболочки, является более тонким и эластичным материалом, поэтому при пластике образуется меньший объем ткани после частичной деградации и ремоделирования биологического материала, а также это облегчает выравнивание фибробластов и коллагеновых волокон упорядоченным и стабильным образом, что приводит к образованию мембраны с хорошо организованной коллагеновой структурой и минимальным рубцеванием. Мы полагаем, что более частая встречаемость в группе с ксенобрюшиной гистологических паттернов упорядоченного расположения коллагена обусловлена специфическими особенностями строения данного материала (эластичность, толщина, жёсткость), но данное предположение требует дальнейшего изучения.

Таким образом, результаты исследования показывают, что ксенобрюшина является биосовместимым материалом и улучшает структурное восстановление барабанной перепонки с формированием трёхслойной структуры, хорошо организованными коллагеновыми волокнами собственной пластинки и эпителизацией обеих поверхностей. Мы предлагаем использование ксенобрюшины как альтернативный пластический биоматериал с высоким репаративным потенциалом восстановления структуры и функции барабанной перепонки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Лечение больных с хроническими перфоративными отитами все еще остается актуальной проблемой среди заболеваемости органов слуха. Вопросы хирургического и без хирургического восстановления целостности барабанной перепонки различными тканями, как собственными, так и трансплантатами, остаются открытыми. Поиск оптимальных материалов схожих по своему строению тканям используемых для аутопластики при закрытии дефектов барабанной перепонки является одним из нерешенных вопросов в отохирургии. Причина состоит в том, что барабанная перепонка не имеет однородных по своему строению тканей в человеческом организме.

Известно, что в клинической практике используются различные пластические материалы: фасция височной мышцы, хрящ и надхрящница, периост, слизистая оболочка щеки, слизистая оболочка тонкой кишки, носовая перегородка, стенка вены, твердая мозговая оболочка, амнион, склера, культура аллофибробластов человека, полимерные имплантаты, двух и трехслойные трансплантаты различного состава. Однако следует отметить, что на основании многолетней клинической практики, так и в клинических испытаниях, перечисленные трансплантаты показали с одной стороны, как достаточную эффективность материалов, с другой стороны установлено, что они имеют существенные недостатки. Среди возможных осложнений чаще всего встречается отторжение трансплантата, рассасывание коллагеновых волокон, смещение лоскута, либо отмечается не полное закрытие дефекта барабанной перепонки, рубцевание, либо сращение с медиальной стенкой барабанной полости, не редко также встречается нагноение и рецидив дефекта барабанной перепонки, что в последующем ведет к снижению слуха.

Вышеописанные положения позволяет отохирургам вести опытным путём поиски новых высокоэффективных материалов для закрытия дефектов барабанной перепонки, что определяет актуальность данной проблемы.

Актуальным остаются вопросы поиска альтернативных материалов, обладающих пластическими свойствами, которые бы снижали риск послеоперационных осложнений, улучшали бы функциональность среднего уха и как следствие, способствовали улучшению качества жизни пациента, среди них представляют интерес использование известных имплантатов биологического происхождения в отохирургии.

Целью диссертационной работы являлось провести экспериментальное обоснование применения нового биологического материала для мирингопластики при перфорации барабанной перепонки посредством восстановления барабанной перепонки, оценка аудиометрических данных слуха, оценки иммунной реакции макроорганизма в ответ на имплантацию децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины и морфологической характеристики гистоструктуры зоны имплантации с оценкой морфометрических данных.

В ходе проведенного исследования была разработана экспериментальная модель пластики барабанной перепонки с применением

децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины на лабораторных кроликах. Был смоделирован дефект барабанной перепонки «острая перфорация» у лабораторных животных (кроликов), с последующей тимпанопластикой I типа, с применением децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины. Доступ к среднему уху производился по разработанному нами методу.

В процессе эксперимента оценили реакцию иммунной системы макроорганизма в ответ на имплантацию децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины и консервированной твердой мозговой оболочки и провели сравнительный анализ. В качестве маркеров использовали базовые показатели лейкограммы и фракций ЦИК, как показатели системной воспалительной реакции и косвенного отражения гуморального иммунитета.

Показатели общего анализа крови в течение всего времени наблюдения не выходили за пределы референтных значений и не отличались в изученных группах, что говорит о низкой системной реакции и отсутствии осложнений воспалительного и аллергического характера в результате эксперимента.

Следует подчеркнуть, что результаты по ЦИК получились несколько неожиданными и не совсем согласуются с ранними наблюдениями. Известно, что иммунные комплексы являются комплексом антитело-антиген, которые не успевают утилизироваться базовыми механизмами и могут быть причиной иммунокомплексных реакций. Наиболее активно они образуются при избытке антигена или дефиците комплимента и системе фагоцитоза. В нашем случае в течение 21-го дня эксперимента – априорного периода выработки и достижения максимума антителообразования на новый антиген не наблюдалось, также не было отмечено отклонений со стороны изученных показателей. Данное положение, видимо, можно объяснить малым объемом трансплантата и отсутствием активного воспаления. Процессы гуморального иммунного ответа проходили в рамках физиологических сдвигов и иммунные комплексы любых размеров не накапливались.

Однако к 30 дню наблюдений нами было зафиксировано многократное увеличение концентрации всех видов иммунных комплексов. Так, следует отметить, что высокомолекулярные ЦИК возрастали в равной степени в обеих группах. В группе эксперимента с ксенобрюшиной отмечено резкое возрастание низкомолекулярных ЦИК, различия были значимыми не только с контрольной группой, но и с группой ТМО, тогда как после применения ТМО было зафиксировано резкое повышение средне-молекулярных ЦИК, данные были выше не только контрольных, но и группах сравнения (ксенобрюшины).

Существует мнение, что высокомолекулярные ЦИК легко фагоцитируются и активируют комплимент и поэтому не представляют угрозы для развития иммунокомплексных реакций. Считают, что низкомолекулярные комплексы обладают наибольшими патогенными свойствами, так как избегают захвата фагоцитами и активации комплимента и могут откладываться под эндотелием, что и является главной причиной системных иммунокомплексных реакций. При этом ЦИК среднего размера

обладают высокой комплемент связывающей способностью и являются наиболее патогенными.

Однако необходимо учесть несколько факторов, так фракции ЦИК у кроликов могут не однозначно соответствовать фракциям ЦИК у человека, как и динамика антителообразования.

На основании анализа полученных результатов показателей крови в исследуемых группах следует отметить, что мы не выявили признаков системного воспаления, что свидетельствовало бы о признаках развития местного воспалительного ответа и иммунопатологического процесса.

Таким образом, вероятней всего уровень ЦИК в сроке на 30 день эксперимента отражает период физиологического процесса имплантации трансплантата, как проявление компенсаторно-приспособительной реакции. Известно так же, что антитела могут играть роль в защите трансплантата от агрессии иммунной системы и блокировке антигенов, что видимо и было отражением при мирингопластики в нашем эксперименте.

Однако данные указывают, что показатели в группе с использованием ТМО и в группе общепринятого ДеКБ, хоть и имели особенности, но в целом были сравнимы и не отличались по иммуногенности, при этом не показывали клинических признаков отторжения или иммунопатологии.

Проведена количественная оценка слуха с помощью штатного симулятора нейро-волновой активности мозга и штатного программного обеспечения ВАЕРСОМ РС.

Для количественной оценки полученных результатов было необходимо формализовать графики и при этом получить цифровое значение, максимально отражающее обобщенный результат каждого отдельного исследования. С этой целью нами, после выставления стандартной изолинии и приведения всех графиков в соответствие с ней, было проведено измерение высоты трех наиболее выраженных пиков. Высоту пиков (в мм) измеряли для каждого исследования отдельно. Далее суммировали высоту трех пиков и получали общее цифровое значение, выраженное в миллиметрах (мм).

Рассчитав суммарную величину пиков аудиограммы видно, что в первой группе, где был применен децеллюляризованный матрикс ксенобрюшины, статистически значимых различий между средними значениями суммы трех пиков аудиограммы оперированного и не оперированного уха не выявлено, соответственно - $40,6 \pm 9,77$ мм и $53,2 \pm 13,55$ мм ($p > 0,05$). Во второй группе материала сравнения, (ТМО), так же статистически значимых различий между группами оперированного и не оперированного уха не наблюдалось: соответственно $32,2 \pm 3,36$ мм против $43,8 \pm 0,84$ мм ($p > 0,05$), что может свидетельствовать о равной степени способности данного вида биологического имплантата восстанавливать слуховые функции среднего уха после мирингопластики

Таким образом, полученные результаты демонстрируют, что острота слуха после мирингопластики с применением нового биологического материала «децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины» выше, то есть ближе к исходным значениям, чем при использовании консервированной

твёрдой мозговой оболочки, как во внутри групповых, так и в межгрупповых, однако статистически значимых различий между группами не выявлено ($p > 0,05$).

С целью оценки структурных изменений после мирингопластики в эксперименте в зоне комплекса «имплантат-перепонка» с использованием консервированной твёрдой мозговой оболочки или децеллюляризованого матрикса ксенобрюшины нами был проведен сравнительный анализ гистологической картины в сроки на 7 сутки, 24 и 30 день после завершения опыта. Морфологическое исследование проводилась простым слепым методом, при этом каждая группа животных по срокам опыта получило своё цифровое обозначение. После завершения микроскопического описания материала комплекса «имплантат-перепонка» проводилась расшифровка групп эксперимента. В последующем на основании полученных результатов гистологического исследования был проведен сравнительный анализ морфологической картины при использовании консервированной твёрдой мозговой оболочки или децеллюляризованого матрикса ксенобрюшины в зоне дефекта барабанной перепонки после мирингопластики.

В сроке эксперимента на 7 сутки после мирингопластики с применением консервированной твёрдой мозговой оболочки в зоне контакта со стенками дефекта ткани барабанной перепонки в комплексе «имплантат-перепонка» отмечается формирование нежной соединительной ткани с рыхло переплетающимися волокнами, однако в краевых зонах наблюдается инфильтрация макрофагами и лимфоцитами, что является ответной местной компенсаторной реакцией. В эти же сроки эксперимента, в группе с имплантацией децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины зоны дефекта барабанной перепонки комплекса «имплантат-перепонка» отмечается формирование юной грануляционной ткани, что характеризуется наличием мелких тонкостенных сосудов капиллярного типа, расположенных в структуре волокнистой соединительной ткани, при этом клеточная инфильтрация отсутствовало. Хорошо прослеживается пограничная зона в контакте с тканями барабанной перепонки в виде гиалинового хряща, где отмечен умеренный межуточный отек ткани, инфильтрация макрофагами и лимфоцитами также отсутствовала.

В сроке на 21 сутки эксперимента гистологическое исследование материала барабанной перепонки в комплексе «имплантат-перепонка» после мирингопластики с использованием ткани консервированной твёрдой мозговой оболочки отмечено созревание и формирование нежной волокнистой соединительной ткани в строме с умеренной инфильтрацией лимфоцитами и макрофагами, хорошо прослеживается зона васкуляризации тонкостенными сосудами и рассеянная лимфоидная инфильтрация. В пограничной зоне имплантата и ткани барабанной перепонки наблюдается диффузная лимфо-лейкоцитарная инфильтрация. В этом же сроке при гистологическом исследовании зоны имплантата барабанной перепонки после мирингопластика децеллюляризованный матриксом ксенобрюшины было отмечено в комплексе «имплантат-перепонка» происходит созревание

волокнистой соединительной ткани, которая характеризовалась пучковым расположением волокон. В эти сроки было характерно уменьшение количества сосудов капиллярного типа. В других группах эксперимента в эти же сроки мы уже наблюдали, что происходит формирование соединительной ткани, когда пучки волокон принимали параллельное расположение.

Таким образом, в сроке на 21 сутки эксперимента отмечена динамика смены фаз репаративных процессов после миринопластики децеллюляризованным матриксом ксенобрюшины с формированием волокнистой соединительной ткани.

На 30 сутки после завершения эксперимента в зоне комплекса «имплантат-перепонка» с использованием консервированной твердой мозговой оболочки, отмечается фаза формирования грубоволокнистой ткани с хаотическим расположением волокон, в краевых зонах имплантата сохраняется рассеянная инфильтрация лимфоцитами и отдельные очаги васкуляризации сосудами капиллярного типа, что указывает на продолжающийся репаративный процесс после повреждения. Гистологическое исследование материала из зоны пластики дефекта барабанной перепонки децеллюляризованным матриксом ксенобрюшины комплекса «имплантат-перепонка» после миринопластики на 30 сутки эксперимента, показало, что происходит формирование зрелой волокнистой соединительной ткани, где отмечается регресс сосудов капиллярного типа, клеточная лимфоидно-макрофагальная реакция отсутствует. Сравнительная морфологическая оценка результатов гистологического исследования показало отражение положительной динамики репаративного процесса.

Таким образом, проведенный сравнительный анализ гистологической картины в зоне комплекса «имплантат-перепонка» показало динамику смены фаз-стадии репаративного процесса в разные сроки эксперимента после миринопластики с использованием децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины. При этом отмечено формирование на 7 сутки эксперимента юной грануляционной ткани с новообразующимися тонкостенными сосудами, на 21 сутки наблюдается последовательное созревание грануляционной ткани с формированием волокнистой соединительной ткани, на 30 сутки после завершения опыта отмечено созревание зрелой волокнистой соединительной ткани, где имело место параллельное расположение волоконистых структур, что является объективным показателем положительной динамики репаративного процесса.

Полученные результаты экспериментального исследования по обоснованию применения нового биологического материала децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины для миринопластики при перфорации барабанной перепонки позволили сделать следующие **выводы:**

1. Разработанный метод миринопластики в эксперименте позволил получить адекватный доступ к структурам среднего уха у кроликов и проведению оперативного вмешательства.
2. Сравнительный анализ реакции иммунной системы макроорганизма

в ответ на имплантацию децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины показали, что в обеих группах не наблюдается различий между опытными группами и с группой сравнения, и полученные данные не выходят за пределы от физиологических значений на 7 и 21 сутки, однако на 30 сутки отмечаются статистически значимые различия с группой сравнения ($p=0,007$) для СМ ЦИК, и ($p=0,015$) для НМ ЦИК.

3. Полученные количественные аудиометрические данные после мирингопластики с применением децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины в эксперименте, показали, что острота слуха в группе ДеКБ 40[32; 48]мм отмечаются статистически значимые различия с группой сравнения 32 [30; 35]мм ($p=0,045$), однако с группой контроля 44,5 [43; 50] статистически значимых различий не отмечается ($p=0,104$).

4. Сравнительный морфологический анализ показал положительную динамику репаративного процесса в разные сроки эксперимента после мирингопластики децеллюляризованным матриксом ксенобрюшины. Таким образом морфометрические показатели стадийно-фазового процесса заживления ткани регрессировали с (11 [8.25; 11.5]) на 7 сутки до (0 [0;0]) на 30 сутки.

Практические рекомендации:

1. Разработанный метод мирингопластики на экспериментальных животных (кроликах) позволяет в дальнейшем проводить исследования на структурах среднего уха.

2. Результаты научного исследования обосновывают возможность применения децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины в качестве альтернативного материала для мирингопластики и позволяют проведение следующего этапа работы – клинических испытаний по оценке безопасности и эффективности децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины в практике отохирургии.

3. Полученные результаты расширяют знания об особенностях репаративного процесса в зоне имплантации децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины с тканями барабанной перепонки после мирингопластики в эксперименте, на основании оценки состояния гистоструктуры раневого процесса с учетом результатов показателей морфометрии и количественной оценкой клеточного инфильтрата.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Курмашова Л. М., Сопко О. Н., Болознева Е. В. Клинические результаты мирингопластик при острых травматических перфорациях. // Российская оториноларингология №1(68)2014 С.126.
2. Гаров Е.В., Сидорина Н.Г., Зеленкова В.Н., Лаврова А.С., Акмулдиева Н.Р. Анализ эффективности тимпаноластики у больных хроническим перфоративным средним отитом. // Вестник оториноларингологии 2014; 6: С. 8-11.
3. Полякова С. Д., Батенева Н. Н., Попова Е. А. Комплексный подход к диагностике и лечению травматических отитов. // Российская оториноларингология №4 (41) 2009 с. 114-118.
4. Абатов Н.Т., Тусупбекова М.М., Есниязов Д.К., Бадыров Р.М., Дуйсенов Г.Н., Бадырова Е.С. Исторические аспекты поиска эффективных биоматериалов для миринголастики. // Медицина и экология, п. 4 (97), 2020, pp. 8-18.
5. Teh BM, Marano RJ, Shen Y, Friedland PL, Dilley RJ, Atlas MD. Tissue engineering of the tympanic membrane. // Tissue Eng Part B Rev 2013; 19: 116-32.
6. Хоров О.Г., Плавский Д.М. Тимпаноластика с применением хрящевой пластины при обширных дефектах барабанной перепонки. // Новости хирургии №1- 2010 - том 18 С. 108-113.
7. Razan A. Basonbul, Michael S. Cohen. Use of porcine small intestinal submucosa for pediatric endoscopic tympanic membrane repair. // World Journal of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery (2017) 3, 142-147.
8. Lou, Z.-C., He, J.-G. A randomised controlled trial comparing spontaneous healing, gelfoam patching and edge-approximation plus gelfoam patching in traumatic tympanic membrane perforation with inverted or everted edges. // 2011 Blackwell Publishing Ltd • Clinical Otolaryngology 36, 221–226.
9. Маркова М. В. Опыт применения новой полимерной пленки «Омидерм» для закрытия травматических перфораций барабанной перепонки у детей. // Российская оториноларингология №2 (45) 2010. С. 177-179.
10. Shen Y, Guo Y, Wilczynska M, Li J, Hellström S, Ny T. Plasminogen initiates and potentiates the healing of acute and chronic tympanic membrane perforations in mice. // J Transl Med 2014; 12: 5. doi: 10.1186/1479-5876-12-5.
11. Gates GA, Klein JO, Mogi G, Ogra PL. Definitions, terminology, and classification of otitis media. // Ann Otol Rhinol Laryngol. 2002 March;111(3):8-18.
12. Lindeman P, Edström S, Granström G, Jacobsson S, von Sydow C, Westin T, et al. Acute traumatic tympanic membrane perforations. // Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1987; 113: 1285-7.
13. Салий О. В. Опыт использования различных материалов для тимпаноластики. // Российская оториноларингология № 5 (66) 2013 С. 150-153.
14. Neumann A. Long-term results of Palisade cartilage tympanoplasty // Otolaryngology

- and Neurotology. – 2012. – Vol. 31, N 6. – P. 936–939.
15. Onal K. Perichondrium cartilage island flap and temporalis muscle fascia in type I tympanoplasty// J. Otolaryngol. Head Neck Surg. – 2011. – N 40 (4). – P. 295–299.
16. Haisch A. Functional and audiological results of tympanoplasty type I using pure perichondrial grafts// HNO. – 2013. – Vol. 61, N 7. – P. 602–608.
17. Карпов В. П. «Аллоплант» – Новый материал для реконструкции барабанной перепонки у больных хроническим перфоративным средним отитом // Российская оториноларингология №5 (36) 2008 С. 78–83.
18. Peng R., Lalwani A.K. Efficacy of „hammock” tympanoplasty in the treatment of anterior perforations // Laryngoscope. – 2013. – Vol. 123, N 5. – P. 1236–1240.
19. Хакимов А. М., Исроилов Р. И., Ботиров А. Ж. Мирингопластика с применением ксенотрансплантата из перикарда овцы // Российская оториноларингология № 6 (55) 2011. С. 169-173.
20. Дворянчиков В. В., Кочергин Г. А., Сыроежин Ф. А. Современные возможности фиксации многослойных трансплантатов при мирингопластике // Вестник оториноларингологии. – 2012. – № 4. – С. 51–53
21. Гарифзянова С. М., Рахматуллин Р. Р., Щетинин В. Н. Формирование неотимпанальной мембраны при хирургическом лечении больных хроническим гнойным и острым посттравматическим средним отитом // Российская оториноларингология №2 (27) 2007- С. 25-28.
22. Алагирова З. З. Хирургическое лечение больных хроническим средним отитом с аттикальными ретракционными карманами барабанной перепонки // Мат. IX Всерос. конгресса оториноларингологов «Наука и практика в оториноларингологии». – М., 2010. – С. 57–58.
23. Аникин М. И. Хирургическая тактика при латерализации тимпанальной мембраны // Российская оториноларингология. – 2010. Приложение № 2. – С. 107–110.
24. Ахмедов Ш. М. Метод тимпаноластики у больных мезотимпанитом // Российская оториноларингология № 3 (70) 2014. – С. 6–11.
25. Д.К. Есниязов, Н.Т. Абатов, Р.М. Бадыров, Е.М. Асамиданов, З.А. Юсифов. Мирингопластика с применением децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины в эксперименте с количественной оценкой остроты слуха после операции // вестник КазНМУ - № 1 – 2020 – С. 338-342.
26. Selmin Karataylı Özgürsoy, M. Emin Tunçkaşık, Fatma Tunçkaşık, Egemen Akıncıoğlu, Handan Doğan, Sinan Kocatürk, Platelet-Rich Plasma Application for Acute Tympanic Membrane Perforations. J Int Adv Otol 2017; 13(2): 195-9.
27. Иванова Н.И., Долгов В.А., Шевлюк Н.Н., Федюнина П.С., Деннер В.А. / Эффективность использования наноструктурированного биологического материала при мирингопластике острых посттравматических дефектов барабанной перепонки. // Альманах молодой науки, №4, 2016г. С. 27-28
28. Snyder D.L., Sullivan N., Schoelles K.M. Skin substitutes for treating chronic wounds. Technology Assessment Report. - ECRI Institute Evidence-based

PracticeCenter (EPC), 2012. – 290 p.

29. Максяткина Л.В., Абатов Н.Т., Ахмалтдинова Л.Л., Бадыров Р.М., Трошин В.В. Применение биоимплантов при пластике дефектов передней брюшной стенки (обзор литературы) // вестник КазНМУ - № 1 – 2020 – С. 338-342.

30. Бадыров Р. М., Абатов Н. Т., Тусупбекова М.М., Альбертон И. Н., Мусабеков И. К. Результаты применения внеклеточного матрикса ксенобрюшины для реконструкции передней брюшной стенки в отдаленные сроки эксперимента // Наука и здравоохранение, 1, 2018 с 24-35

31. Абатов Н.Т., Бадыров Р.М., Абатова А.Н., Асамиданов Е.М., Каукенов Б.Н. Биологические имплантаты в хирургическом лечении грыжи передней брюшной стенки (обзор). // georgian medical news no 2 (251) 2016. С.7-12.

32. Абатов Н.Т.; исполн.: Бадыров Р.М. Разработка и применение внеклеточного матрикса ксенобрюшины в хирургическом лечениии грыж передней брюшной стенки: отчет о НИР (итоговый) / Караг. гос. мед. унив-т; рук. – К., 2017. – 111 с. – № ГР 0115РК00305. – Инв. № 0215РК02890.

33. Бадыров Р.М. Экспериментальное обоснование применения внеклеточного матрикса ксенобрюшины для пластики дефектов передней брюшной стенки: дисс... доктор фил.PhD. – Караганда: Карагандинский государственный медицинский университет, 2018. – 90 с.

34. Дайхес Н.А., Диаб Х.М., Корвяков В.С., Кондратчиков Д.С., Пацинина О.А., Умаров П.У., Михалевич А.Е., Медеулова А.Р. Тактика ведения и результаты хирургического лечения пациентов с хроническим гнойным средним отитом. // Альманах клинической медицины. 2016 Октябрь; 44 (7): 814–820.

35. Brackmann DE, Shelton C, Arriaga MA. Otologic surgery. 3rd edition. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2010г. 831 p.

36. Briggs RJ, Luxford WM. Chronic ear surgery: a historical review. Am J Otol. 1994 Jul;15(4):558-67.

37. So Young Park, Hyuk Jae Lee, Myung Joo Shim, Dong Kee Kim, Byung Do Suh, Shi Nae Park. / Swing-Door Overlay Tympanoplasty: Surgical Technique and Outcomes. / Clinical and Experimental Otorhinolaryngology Vol. 11, No. 3: 186-191, September 2018.

38. Lou Z. C. / A prospective study evaluating spontaneous healing of aetiology, size and type-different groups of traumatic tympanic membrane perforation / Clin. Otolaryngol. – 2011. – N 36 (5). – P. 450–460.

39. Lou Z.C., Hu Y.X., Tang Y.M. Prognosis and outcome of the tympanic membrane flap at traumatic tympanic membrane perforation edge // ORL J. Otorhinolaryngol. Relat. Spec. 2011; 73 (4): 212–218.

40. Кочеров С.Н. Сравнительная оценка эффективности восстановления перфораций барабанной перепонки в зависимости от их локализации. Бюллетень сибирской медицины. 2016; 15 (4): 59–66. DOI 10.20538/1682-0363-2016-4-59–66

41. Santa Maria P.L., Redmond S.L., Atlas M.D., Ghassemifar R. Histology of

- the healing tympanic membrane following perforation in rats // *Laryngoscope*. 2010; 120 (10):2061–2070
42. Rollin M., Rogers P., Robinson P. Natural history of pediatric tympanic membrane perforation // *Otol. Neurotol.* 2011; 32 (2): 246–251.
43. Абатова А. Н., Асамиданов Е. М. Клинико-морфологические аспекты биологических имплантов в реконструктивной урологии. // *Медицина и экология*, 2018, 1 С. 8-11.
44. Пробст Р., Гревенс Г., Иро Г.; пер. с англ. под ред. Лопатина А.С. / *Оториноларингология в клинической практике* /– М.: практическая медицина, 2012. – С 217 –240.
45. Uslu C., Tek A., Tatlipinar A., Kiliçarslan Y., Durmuş R., Ayöğredik E., Karaman M., Oysu C. Cartilage reinforcement tympanoplasty: otological and audiological results. *Acta Otolaryngol* 2010; 130: 3: 375—383.
46. Якшин А.А. Оптимизация послеоперационного ведения пациентов с мезотимпанитом после тимпаноластики: Автореф. дис. канд. мед. наук. М 2013.
47. Albu S., Trabalzini F., Amadori M. Usefulness of cortical mastoidectomy in myringoplasty. *Otology Neurotology* 2012; 33: 4: 604— 609.
48. Mohanty, Sanjeev; Manimaran, Vinoth; Umamaheswaran, Preethi / *Endoscopic cartilage versus temporalis fascia grafting for anterior quadrant tympanic perforations — A prospective study in a tertiary care hospital* / *Auris Nasus Larynx V.*: 45 Edition: 5 Pages: 936-942 Published: Oct. 2018.
49. Çağatay Han Ulkü. Cartilage tympanoplasty with island technique for reconstruction of tympanic membrane perforation: anatomic and audiology results. *Kulak Burun Bogaz Ihtis Derg.* Jan-Feb 2010;20(1):7-12.
50. Sarah A Lyons, Tanly Su, Linda E T Vissers, Jeroen P M Peters, Adriana L Smit, Wilko Grolman. Fascia compared to one-piece composite cartilage-perichondrium grafting for tympanoplasty. *Laryngoscope* 2016 Jul;126(7):1662-70. doi: 10.1002/lary.25772.
51. Onal K, Arslanoglu S, Songu M, Demiray U, Demirpehlivan I A. Functional results of temporalis fascia versus cartilage tympanoplasty in patients with bilateral chronic otitis media. *J Laryngol Otol.* 2012 Jan;126(1):22-5. doi: 10.1017/S0022215111002817.
52. Emily Iacovou, Petros V Vlastarakos, Angie Panagiotakopoulou, Marina Chrysostomou, Dimitrios Kandiloros, George Adamopoulos, Eleftherios Ferekidis. Effect of type I tympanoplasty on the resonant frequency of the middle ear: comparison between chondrotympanoplasty and temporalis fascia grafting. *J Otolaryngol Head Neck Surg.* 2012 Feb;41(1):14-9.
53. Ejder Ciğer, Mustafa Koray Balcı, Akif İşlek, Kazım Önal. The wheel-shaped composite cartilage graft (WsCCG) and temporalis fascia for type 1 tympanoplasty: a prospective, randomized study. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2018 Dec;275(12):2975-2981. doi: 10.1007/s00405-018-5171-5.
54. Abdelghany A M. The button graft technique for perforations affecting less than 25% of the tympanic membrane: a non-randomised comparison of a new modification to cartilage tympanoplasty with underlay and overlay grafts. *Clin*

- Otolaryngol. 2013 Jun;38(3):208-16. doi: 10.1111/coa.12112.
55. Iacovou E, Vlastarakos PV, Papacharalampous G, Kyrodimos E, Nikolopoulos TP. Is cartilage better than temporalis muscle fascia in type I tympanoplasty. Implications for current surgical practice. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2013; 270:2803–13
56. Yang T, Wu X, Peng X, Zhang Y, Xie S, Sun H. Comparison of cartilage graft and fascia in type 1 tympanoplasty: systematic review and meta-analysis. *Acta Otolaryngol.* 2016; 136:1085–90.
57. Barake R, El Natout T, Bassim M, El Natout MA. Loop underlay tympanoplasty for anterior, subtotal and total tympanic membrane perforations: a retrospective review. *J Otolaryngol Head Neck Surg.* 2019; 48:12.
58. Ayache S, Beltran M, Guevara N. Endoscopic transcanal myringoplasty for anterior tympanic membrane perforation. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis.* 2019; 136:413–5.
59. Eren SB, Tugrul S, Ozucer B, Veyseller B, Aksoy F, Ozturan O. Endoscopic transcanal inlay myringoplasty: alternative approach for anterior perforations. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2015; 153:891–3.
60. Zheng Cai Lou. Endoscopic myringoplasty: comparison of double layer cartilage-perichondrium graft and single fascia grafting. *J Otolaryngol Head Neck Surg.* 2020 Jun 22;49(1):40. doi: 10.1186/s40463-020-00440-7.
61. Dae Bo Shim, Hyun Ji Kim, Mi Joo Kim, In Seok Moon. Three-point fix tympanoplasty. *Acta Otolaryngol* 2015 May;135(5):429-34. doi: 10.3109/00016489.2014.985800.
62. Решетов, И. В. Ребрикова И. В., Андреева Ю. Ю. Экспериментальные основы пересадки эпителия для реконструкции дефектов органов головы и шеи технологией микрографтинга // *Head and Neck/Голова и шея. Российское издание. Журнал Общероссийской общественной организации Федерация специалистов по лечению заболеваний головы и шеи.* – 2014. – № 4. – С. 23-27. – EDN TFLZUT.
63. Астащенко С.В. Повышение эффективности тимпаноластики с использованием ультратонких аллохрящевых трансплантатов: дисс. раб. – Санкт-Петербург. НИИ уха, горла, носа и речи, 2005.
64. Родин В.И. Боечко С.К., Ткач Ю.Н. // Пластика барабанной перепонки с применением твердой мозговой оболочки эмбриона. // *Вестник оториноларингологии* № 4 1990 С. 60-62.
65. Douglas W. Laidlaw, BA; Peter D. Costantino, MD; Satish Govindaraj, MD; David H. Hiltzik, BA; Peter J. Catalano, MD. Tympanic Membrane Repair With a Dermal Allograft // *Laryngoscope*, 111:702–707, 2001.
66. Щетинин В.И. Пластика дефектов барабанной перепонки трансплантатом из пуповины человека при хирургическом лечении больных хроническим мезотимпанитом: дисс. раб. – Санкт-Петербург. НИИ уха, горла, носа и речи, 2007.
67. Alan Johnson, Charles Mixson, and John Munday. Suitability of Formaldehyde-Treated Acellular Dermis for Tympanic Membrane Repair in Chinchillas // *Otology & Neurotology*. 28:778Y781 2007, *Otology & Neurotology*,

Inc.

68. Ahilasamy N., Badra Shanti, Sivaprakasam Rajasekaran. Endoscopic Tympanoplasty Using Nasal Septal Cartilage Allograft // *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg*. Received: 9 July 2016 / Accepted: 9 January 2017. DOI 10.1007/s12070-017-1065-x
69. He Qin, Jianjun Sun, Xuesheng Li, Yang Liu & Zhonghong Jia. An experimental study on tympanic membrane reconstruction with acellular dermal matrix. // *Acta Oto-Laryngologica*, 2012; 132: 1266–1270. DOI: 10.3109/00016489.2012.701327.
70. Christine Barron, MD, Jordan Lukens, BS, Weston Niermeyer, BS, Amanda Onwuka, PhD, MPH, Tandy Chiang, MD, and Charles Elmaraghy, MD. Investigation of Novel Grafts in Use for Pediatric Tympanoplasty // *Annals Otolology, Rhinology & Laryngology* 1–5. 2019 Article reuse guidelines: sagepub.com/journals-permissions DOI: 10.1177/0003489419862575
71. Lee J M, Seo Y J, Shim D B, Lee H J, Kim S H. Surgical outcomes of tympanoplasty using a sterile acellular dermal allograft: a prospective randomised controlled study. // *Acta Otorhinolaryngol Ital* 2018 Dec;38(6):554-562. doi: 10.14639/0392-100X-1839.
72. Zifei Yanga, Xianmin Wua, Xiaoyun Chena, Yideng Huanga, Lian Fanga, Xiaofei Lib, Yue Zhanga and Minghui Jiaa. Comparison of type I tympanoplasty with acellular dermal allograft and cartilage perichondrium // *Acta Oto-Laryngologica*, 2019 DOI: 10.1080/00016489.2019.1637541
73. Мельников М.Н. Экспериментальное обоснование и клиническое применение консервированных хрящевых ксенотрансплантатов в оториноларингологии: дисс. раб. – Россия г. Новосибирск. Новосибирский ордена Трудового Красного Знамени медицинский институт 1994.
74. Spiegel JH, Kessler JL. Tympanic membrane perforation repair with acellular porcine submucosa. *Otol Neurotol*. 2005;26: 563-566.
75. Jeffrey H. Spiegel and Joshua L. Kessler. Tympanic Membrane Perforation Repair with Acellular Porcine Submucosa // *Otology & Neurotology* 26:563–566. 2005.
76. D Eredita` R. Porcine small intestinal submucosa (SIS) myringoplasty in children: a randomized controlled study. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2015; 79:1085-1089.
77. Razan A. Basonbul, Michael S. Cohen. / Use of porcine small intestinal submucosa for pediatric endoscopic tympanic membrane repair. / *World Journal of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery* (2017) 3, 142-147.
78. Shi L, Ronfard V. Biochemical and biomechanical characterization of porcine small intestinal submucosa (SIS): a mini review. *Int J Burns Trauma*. 2013; 3:173-179.
79. Robert J. Yawn, Matthew M. Dedmon, yBrendan P. O’Connell, Frank W. Virgin, and Alejandro Rivas. Tympanic Membrane Perforation Repair Using Porcine Small Intestinal Submucosal Grafting // *Otology & Neurotology* 39: e332–e335, 2018.
80. Zhihong Deng, Junjie Wu, Jianhua Qiu, Jinling Wang, Yongsheng Tian, Yuan

- Li, Yan Jin. Comparison of Porcine Acellular Dermis and Dura Mater as Natural Scaffolds for Bioengineering Tympanic Membranes // Tissue engineering: part a Volume 15, Number 12, 2009. Mary Ann Liebert, Inc. DOI: 10.1089=ten.tea.2008.0460
81. Clotilde de Dorlodot, Gersende De Bie, Naima Deggouj, Monique Decat, Jean-Marc Ge´rard. Are bovine pericardium underlay xenograft and butterfly inlay autograft efficient for transcanal tympanoplasty? // Eur Arch Otorhinolaryngol Accepted: 3 December 2013. DOI 10.1007/s00405-013-2855-8
82. Долгов В. А., Иванова Н. И., Лунькова Л. Б. Особенности регенерации тканей барабанной перепонки после ее перфорации при гнойном среднем отите у собак. // Морфология. 2016. Том 149. № 3 XIII конгресс МАМ.
83. Soo Hyeon Kim, Ho Jun Lee, Ji-Chul Yoo, Hyun Jung Park, Ju Yeon Jeong, YeBeen Seo. // Novel transparent collagen film patch derived from duck’s feet for tympanic membrane perforation. // Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition // Accepted author version posted online: 01 Sep 2017. Published online: 07 Sep 2017.
84. Абатов Н.Т., Бадыров Р.М., Абатова А.Н., Асамиданов Е.М., Каукенов Б.Н.
/Биологические имплантаты в хирургическом лечении грыжи передней брюшной стенки (обзор). / Georgian medical news No 2 (251) 2016.
85. Абатов Н.Т., Бадыров Р.М., Огай В.Б., Абугалиев К.Р., Ахмалтдинова Л.Л., Абатова А.Н., Асамиданов Е.М., Каукенов Б.Н. // Внеклеточный матрикс ксенобрюшины: изучение аллергизирующих свойств нового пластиче-ского материала для герниопластики. // Аллергология и иммунология 2015; 16(4): 377.
86. Efsandiari S., Dendukuri N., McGregor M. Clinical efficacy and cost of Allogenic Acellular Dermal Matrix (AADM) in implant-based breast reconstruction of post mastectomy cancer patients // Report. Montreal, QC: Technology Assessment Unit of the McGill University Health Centre (MUHC). - 2009. - 40 p.
87. Hiles M., Ritchie R., Altizer A. Are biologic grafts effective for hernia repair? A systematic review of the literature // Surg. Innov. – 2009. – №16(1). – P. 26-37.
88. Абугалиев К.Р., Огай В.Б., Данлыбаева Г.А. Патент №30382 РК. Биологическое покрытие для лечения ожогов и ран /– 2014. – 5 с
89. Бадыров Р.М. Экспериментальное обоснование применения внеклеточного матрикса ксенобрюшины для пластики дефектов передней брюшной стенки: дисс... доктор фил. PhD. – Караганда: Карагандинский государственный медицинский университет, 2018. – 90 с.
90. Abatov N.T., Tussupbekova M.M., Alberton J.N., Abatova A.N., Assamidanov Y.M. The Morphometric analysis of the Decellularized Bovine-Derived Peritoneum in the Nephropexy at the Early Stages of the experiment //Eur Surg Res. – 2017. - Suppl 2, - P. 45
91. Abatova A., Tussupbekova M., Abatov A., Alberton J., Assamidanov E. Comparative morphology analysis of kidneys at different kinds of implants in

- nephropexy: Experimental study //Virchows Archiv, - 2016. – Suppl 1. – 469 – S.228.
92. Tussupbekova M., Abatov N., Abatova A., Assamidanov Y., Badyrov R. Morphological aspects of bovine-derived peritoneum implant for the nephropexy in early stage of experiment //Eur Surg Res. – 2016. - Suppl 1, - P. 88
93. Абатов Н.Т., Бадыров Р.М., Огай В.Б., Абатова А.Н., Асамиданов Е.М. Приоритетная справка по поданной заявке на патент Республики Казахстан на изобретение «Внеклеточный матрикс ксенобрюшины для пластики грыж передней брюшной стенки» № 2017/0864.1. – 2017.
94. Albus U. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (8th edn). Laboratory Animals. 2012. –Vol.46. –№3. –P.267-268.
95. Charan J., Biswas T. How to calculate sample size for different study designs in medical research? // Indian Journal of psychological medicine. – 2013. – Vol. 35, №2. – P. 121-126.
96. Алексеев В.В. и др. Под ред. А.И. Карпищенко Название: Медицинские лабораторные технологии. Т1 Руководство по клинической лабораторной диагностике. В 2 томах. Издательство: Гэотар-МедиаСтраницы: 472. Дата издания: 2012
97. Чуваев И.В. Влияние различных факторов на проведение ВАЕР-теста у собак, ошибки и артефакты // Актуальные вопросы ветеринарной биологии № 1 (33), 2017.
98. Чуваев И.В. Количественная оценка остроты слуха у животных при проведении ВАЕР-теста. // Актуальные вопросы ветеринарной биологии № 3 (31), 2016.
99. Тусупбекова М.М. Клиническая патоморфология. Алматы: «Эверо», 2013. 184с
100. Гусаров В. М Статистика. – Москва, 2003. - 463 с.
101. Отчет по НИР Разработка и применение внеклеточного матрикса ксенобрюшины в хирургическом лечении грыж передней брюшной стенки (2015-2017 гг., МОН РК)
102. Отчет по НИР Разработка и внедрение новых видов имплантатов при лапароскопической нефропексии (2015-2017 гг., МОН РК)
103. Никитин В. Ю., Сухина И. А., Цыган В. Н., Гусев Д. А. Иммунологическая характеристика стадий хронического гепатита С и оценка факторов иммунной системы как прогностических критериев течения заболевания. Журнал инфектологии Том 1, № 1 (2009) <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2009-1-1-30-40>
104. И.М. Хоменко, Л.В. Кузнецова, В.И. Литус, А.П. Назаренко, А.Г. Кузнецов, Г.И. Назаренко. Уровень циркулирующих иммунных комплексов и фагоцитарной активности моноцитов у пациентов с заболеваниями щитовидной железы, которые проживают в регионах, пострадавших вследствие Чернобыльской катастрофы Семейная медицина 2016 «2(64) с 99-102
105. D. K. Yesniyazov, N. T. Abatov, M.M. Tussupbekova, R. M. Badyrov, Ye. M. Assamidano. Decellularized matrix of xenoperitoneum: a quantitative

assessment of hearing sense presence after myringoplasty with a biological implant in an experiment // Медицина и экология, no. 4 (97), 2020, pp. 94-97.

106. Yesniyazov D., Tussupbekova M., Abatov N., Yukhnevich Y., Badyrov R. Myringoplasty with Morphological Rationale of Application of Xenoperitoneum Decellularized Matrix in Experiment // Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences. - 2021 Oct 05; №9(A):811-816.

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ

РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

АВТОРЛЫҚ ҚҰҚЫҚПЕН ҚОРҒАЛАТЫН ОБЪЕКТІЛЕРГЕ ҚҰҚЫҚТАРДЫҢ
МЕМЛЕКЕТТІК ТІЗІЛІМГЕ МӘЛІМЕТТЕРДІ ЕНГІЗУ ТУРАЛЫ

ҚУӘЛІК
2020 жылғы «31» желтоқсан № 14256

Автордың (лардың) жөні, аты, әкесінің аты (егер ол жеке басын куәландыратын құжатта көрсетілсе):
ЕСНИЯЗОВ ДИАС ҚАЙРАТОВИЧ

Авторлық құқық объектісі: **ҒЫЛЫМИ ТУЫНДЫ**

Объектінің атауы: **МЕТОД МИРИНГ ОПЛАСТИКИ С ПРИМЕНЕНИЕМ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА
КСЕНОБРЮШИНЫ НА КРОЛИКАХ**

Объектіні жасаған күні: **10.10.2019**



Құжат түпнұсқалығын <http://www.kazpatent.kz/rz> сайтының
"Авторлық құқық" бөлімінде тексеруге болады <https://copyright.kazpatent.kz>

Подлинность документа возможно проверить на сайте kazpatent.kz
в разделе «Авторское право» <https://copyright.kazpatent.kz>

ЭЦҚ қол қойылды

Оспанов Е.К.

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ



РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

СВИДЕТЕЛЬСТВО

О ВНЕСЕНИИ СВЕДЕНИЙ В ГОСУДАРСТВЕННЫЙ РЕЕСТР ПРАВ НА ОБЪЕКТЫ, ОХРАНЯЕМЫЕ АВТОРСКИМ ПРАВОМ

№ 14256 от «31» декабря 2020 года

Фамилия, имя, отчество, (если оно указано в документе, удостоверяющем личность) автора (ов):
ЕСНІЯЗОВ ДІАС ҚАЙРАТОВИЧ

Вид объекта авторского права: **произведение науки**

Название объекта: **МЕТОД МИРИНГОПЛАСТИКИ С ПРИМЕНЕНИЕМ ВНЕКЛЕТОЧНОГО
МАТРИКСА КСЕНОБРИУШНЫ НА КРОЛИКАХ**

Дата создания объекта: **10.10.2019**



Құжат түпнұсқасын <http://www.kazpatent.kz/ru> сайтының
"Авторлық құқық" бөлімінде тексеруге болады <https://copyright.kazpatent.kz>

Подлинность документа возможно проверить на сайте [kazpatent.kz](https://copyright.kazpatent.kz)
в разделе «Авторское право» <https://copyright.kazpatent.kz>

Подписано ЭЦП

Оспанов Е.К.



«ХИ ВЕРЖДАЮ»
 Проректор по академической работе
 В.П.Риклефс
 2022_г.

**АКТ
 ВНЕДРЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ
 Некоммерческое акционерное общество «Медицинский университет Караганды»**

(наименование учреждения, где внедряется работа)

Наименование предложения: Экспериментальные методы проведения внутривенного наркоза экспериментальным животным (кроликам) для проведения оперативных вмешательств в программу изучения дисциплины «Экспериментальная хирургия» в магистратуре и докторантуре

Работа внедрена из диссертации на соискание степени доктора философии (PhD) 6D110100 – Медицина на тему: «Экспериментальное обоснование применения децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины при миринопластики»

(республиканского, областного, областного планов внедрения)

планов внедрения научно-исследовательских, учебных институтов:

внедрена в инициативном порядке; заимствована из методических рекомендаций,

журнальных статей, диссертации, монографии - указать)

Форма внедрения: внедрение алгоритмов проведения внутривенного наркоза экспериментальным животным (кроликам) для проведения оперативных вмешательств в обучение ориентированного на исследования (RBL) для обучающихся по программе постдипломного образования (резидентура, магистратура, докторантура)

(внедрение метода, способа, аппарата в лечебно-профилактическом учреждении

лекции, семинары, подготовке на рабочем месте и прочее - указать)

Ответственный за внедрение и исполнитель: Абагов Н.Т. Еспиязов Д.К.

Эффективность внедрения: повышение компетенций, обучающихся в вопросах экспериментальной хирургии (учебная, компетенционная)

(лечебно-диагностическая, экономическая, социальная - указать конкретно)

Предложения, замечания, учреждения, осуществляющего внедрение: рекомендуется более широкое внедрение данного метода в учебный процесс и клиническую практику

Сроки внедрения: 2022-2023 год

Председатель комиссии,
 Проректор по академической работе НАО МУК

Риклефс В.П.

Ответственный за внедрение:
 Профессор кафедры хирургических болезней, к.м.н.

Абагов Н.Т.



Проректор по академической работе
В.П.Риклефс
09 2022 г.

**АКТ
ВНЕДРЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ
Некоммерческое акционерное общество «Медицинский университет Караганды»**

(наименование учреждения, где внедряется работа)

Наименование предложения: Морфологическая характеристика состояния зоны дефекта барабанной перепонки при имплантации биологического материала в программу изучения дисциплины «Экспериментальная хирургия» в магистратуре и докторантуре
Работа внедрена из диссертации на соискание степени доктора философии (PhD) 6D110100 – Медицина на тему: «Экспериментальное обоснование применения децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины при мирингопластики»

(республиканского, областного, областного планов внедрения)
планов внедрения научно-исследовательских, учебных институтов:

внедрена в инициативном порядке; заимствована из методических рекомендаций,

журнальных статей, диссертации, монографии - указать)

Форма внедрения: Морфометрический анализ тканевой реакции в зоне «имплант-перепонка» в обучение ориентированного на исследования (RBL) для обучающихся по программе постдипломного образования (резидентура, магистратура, докторантура)

(внедрение метода, способа, аппарата в лечебно-профилактическом учреждении

лекции, семинары, подготовке на рабочем месте и прочее - указать)


Ответственный за внедрение и исполнитель: Тусупбекова М.М. Есниязов Д.К.

Эффективность внедрения: повышение компетенций, обучающихся в вопросах экспериментальной хирургии (учебная, компетенционная)
(лечебно-диагностическая, экономическая, социальная - указать конкретно)

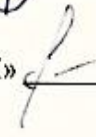
Предложения, замечания, учреждения, осуществляющего внедрение: рекомендуется более широкое внедрение данного метода в учебный процесс и клиническую практику

Сроки внедрения: 2022-2023 год

Председатель комиссии,
Проректор по академической работе НАО МУК

 Риклефс В.П.

Ответственный за внедрение:

Профессор кафедры патологии д.м.н. профессор НАО «МУК»  Тусупбекова М.М.

**КЕАҚ «Қарағанды медициналық университеті»
Биоэтика бойынша комитеттің шешімі**

Отырыс № 12

Мерзімі (К/А/Ж) 06.02.2019ж.

Хаттама № 12

Тағайындалған нөмір 16

Хаттаманың атауы: «Клинико-экспериментальное обоснование применения децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины при посттравматической перфорации барабанной перепонки».

Негізгі зерттеуші: Есниязов Диас Кайратович

Институт: КЕАҚ «ҚМУ»

Қаралған элементтер Тіркелген Тіркелмеген

Қайта қаралуы иә жоқ Алдыңғы қараудың мерзімі:

Шешімі: Рұқсат етілді (Р) Ұсыныстармен рұқсат етілді (Ұсын.) Қайта өтініш (ҚӨ) Рұқсат етілмеді (РЕ)

№.	БЭК мүшелерінің дауысы	Шешімі			
		Р	Ұсын.	ҚӨ	РЕ
1.	Молотов-Лучанский В.Б.	✓			
2.	Мацневская Л.Л.				
3.	Куаныш Ж.М.	✓			
4.	Агеев Д.В.	✓			
5.	Бадыров Р.М.	✓			
6.	Бакирова Р.Е.	✓			
7.	Битнер Е.С.	✓			
8.	Блок О.Г.	✓			
9.	Вистерничан О.А.	✓			
10.	Калиева Ш.С.	✓			
11.	Касапиди Д.И.	✓			
12.	Омаркулов Б.К.	✓			
13.	Понамарева О.А.	✓			
14.	Сорокина М.А.				
15.	Тулесутасва С.Т.	✓			
16.	Никифорова С.А.	✓			

Ескерту: Р – Рұқсат етілді; Ұсын. – Ұсыныстармен рұқсат етілді;
ҚӨ – Қайта өтініш; РЕ – Рұқсат етілмеді

Қолтаңбасы

Төраға: Молотов-Лучанский В.Б.

Мерзімі: 06.02.2019 ж.



Жауапты хатшы: Куаныш Ж.М.

**Решение Комитета по биоэтике
НАО «Медицинского университета Караганды»**

Заседание №_12____
Протокол №_12____

Дата (Д/М/Г) 06.02.2019г.
Присвоенный номер_16__

Название протокола: «Клинико-экспериментальное обоснование применения децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины при посттравматической перфорации барабанной перепонки».	
Основной исследователь:	Есниязов Диас Кайратович
Институт:	НАО «МУК»
Рассмотренные элементы	<input checked="" type="checkbox"/> Приложены <input type="checkbox"/> Не приложены
Повторное рассмотрение <input type="checkbox"/> да <input checked="" type="checkbox"/> Нет	Дата предыдущего рассмотрения:
Решение:	<input checked="" type="checkbox"/> Разрешено (Р) <input type="checkbox"/> Разрешено с рекомендациями (Рек) <input type="checkbox"/> Повторная заявка (ПЗ) <input type="checkbox"/> Не разрешено (НР)

№.	Голосование членов КБЭ	решение			
		Р	Рек	ПЗ	НР
1.	Молотов-Лучанский В.Б.	✓			
2.	Мациевская Л.Л.				
3.	Куаныш Ж.М.	✓			
4.	Агеев Д.В.	✓			
5.	Бадыров Р.М.	✓			
6.	Бакирова Р.Е.	✓			
7.	Битнер Е.С.	✓			
8.	Блок О.Г.	✓			
9.	Вистерничан О.А.	✓			
10.	Калиева Ш.С.	✓			
11.	Касапиди Д.И.	✓			
12.	Омаркулов Б.К.	✓			
13.	Понамарева О.А.	✓			
14.	Сорокина М.А.				
15.	Тулугтаева С.Т.	✓			
16.	Никифорова С.А.	✓			

*Примечание: Р - Разрешено; Рек – Разрешено с рекомендациями;
ПЗ – Повторная заявка; НР – Не разрешено*

Подпись:

.....
Председатель Комитета по биоэтике
Молотов-Лучанский В.Б.



.....
Ответственный секретарь
Куаныш Ж.М.

Дата: 06.02.2019г.

Стандартная операционная процедура анестезии экспериментальных животных (кроликов)

1 Материалы

- 1.1 Диэтиловый эфир;
- 1.2 ксилазин 7 мг/кг;
- 1.3 кетамин 35 мг/кг;
- 1.4 NaCl 0,9% 1мл/кг
- 1.5 венозный катетер 22G

2 Процедуры

2.1 фиксировали кролика к операционному столу в боковом положении, после удаления шерсти в область ушной раковины.

2.2 установка венозного катетера в вену ушной раковины, с последующим капельным введением раствора анестетика.

2.3 Критериями нахождения экспериментального животного (кролика) в наркозе считаются отсутствие реакции на прикосновение, болевой раздражитель, отрицательный рефлекс, брадикардия и участие вспомогательной мускулатуры в акте дыхания.

2.3.1 Восстановление: Продолжительность наркоза около 40 мин. Выход из наркоза сопровождается двигательной активностью кролика.

Стандартная операционная процедура моделирования дефект барабанной перепонки «острая перфорация» у лабораторных кроликов, с последующей пластикой барабанной перепонки (мирингопластика)

1 Материалы

- 1.1 Анестетики;
- 1.2 Анальгетики;
- 1.3 Стерильные хирургические инструменты (скальпель, зажимы, пинцет);
- 1.4 стандартный набор инструментов для тимпаноластики Karl Storz,
- 1.5 Марля;
- 1.6 70% спирт;
- 1.7 Раствор хлоргексидина 2%;
- 1.8 Стерильные ватные шарики;
- 1.9 Шовный материал.
- 1.10 Операционный микроскоп Carl Zeiss Meditec AG / OPMI pico

2 Процедуры

2.1 Выполнение предоперационных процедур проводится на безопасном расстоянии от стерильной хирургической зоны в целях предотвращения ее загрязнения.

2.2 Предоперационные мероприятия:

2.2.1 Провести анестезию и анальгезию экспериментального животного (кролика) в соответствии с СОП анестезии кролика.

2.2.2 Удалить шерсть в околоушной области экспериментального животного (кролика), таким образом, чтобы волосистый край кожи отступал от хирургической раны не менее чем 1 см. (5,0см*5,0см)

2.2.3 Подготовленный участок кожи обработать раствором хлоргексидина 2%.

2.2.4 Уложить животное на операционный столик, зафиксировать.

2.2.5 Обработать операционное поле ватным шариком, смоченным 70% спиртом.

2.2.6 Подготовка хирурга:

2.2.6.1 Помыть руки.

2.2.6.2 Надеть маску и чистый хирургический костюм.

2.2.6.3 Провести асептическую обработку рук.

2.2.6.4 Надеть стерильные перчатки.

2.2.6.5 Хирург должен избегать контакта с нестерильными поверхностями.

2.2.7 Накрыть экспериментальное животное стерильным операционным бельем в случае больших разрезов и/или длительной операции, для предотвращения контакта раны с кожей, шерстью вокруг операционного поля. При малых разрезах операционное белье может быть использовано только при ушивании раны.

2.3 Моделирование раны:

2.3.1 Убедитесь, что все необходимые материалы под рукой.

2.3.2 Обозначьте стерильную зону на рабочей поверхности для стерильного материала (инструментов, шовного материала, марлевых шариков и т.д.)

2.3.3 Произвести горизонтальный разрез длиной 10 мм у переднего края основания ушной раковины. После разведения краев раны кожи с помощью ранорасширителя, тупым путем разводите края раны по направлению первоначального разреза, до обнажения передней стенки наружного слухового прохода.

Стандартная операционная процедура закрытия биоимплантатом перфорацию барабанной перепонки на экспериментальном животном (кролик)

1 Материалы

1.1 Биоимплантат (децеллюрезированный матрикс ксенобрюшины или консервированная твердая мозговая оболочка);

1.2 Игла из набора тимпаноластики

1.3 Ушная воронка;

1.4 Пинцет анатомический;

1.5 Силиконовой полоски;

- 1.6 Шовный материал на атравматичной игле толщиной не более 4/0;
- 1.7 Губка Merocel
- 1.8 Иглодержатель;
- 1.9 Марлевые салфетки;
- 1.10 Стерильный физиологический раствор;
- 1.12 Бинт;
- 1.13 Пластырь;

2 Процедуры

2.1 После процедуры создания модели дефекта барабанной перепонки у экспериментального животного (кролика).

2.2 иглой из набора для тимпаноластики производили надрыв барабанной перепонки в натянутой части, более 50% барабанной перепонки.

2.3 Укладка лоскута по методу overlay, из биоматериала децеллюляризованного матрикса ксенобрюшины или консервированной твердой мозговой оболочки

2.4 наложением на лоскут силиконовой полоски для фиксации лоскута и губки Merocel.

2.5 Контроль на гемостаз

2.6 Производится ушивание раны известными способами, асептическая повязка.

Протокол окраски соединительной ткани по Ван-Гизону БиоВитрум™- пикрофуксином

1. Удалить парафин из срезов в ксилоле и провести срезы через спирты нисходящей крепости до 800 этанола (орто-ксилол – 2 порции по 5 минут, 960 этанол – 3 мин, 900 этанол – 3 мин, 800 этанол - 3 мин).

2. Окрасить срезы в рабочем растворе железного гематоксилина Вейгерта 5 мин

3. Промыть в двух порциях проточной воды 2 минуты.

4. Окрасить в БиоВитрум™-пикрофуксине (красителе Ван-Гизона) 3 мин

5. Быстро сполоснуть в дистиллированной воде 15 сек.

6. Обезводить в двух порциях 960 этанола по 1 мин, одной порции абсолютного этанола 15 сек, и просветлить в двух порциях ортоксилола по 2 мин.

7. Заключение окрашенные гистологические срезы в синтетическую среду BioMount под покровное стекло.

В результате окраски ядра клеток приобретают черный цвет, коллаген – красный, другие тканевые элементы (включая мышечные волокна и эритроциты) – желтые, фибрин – желтый или оранжевый.

Протокол окраски гематоксилином и эозином

1. Удалить парафин из срезов в ксилоле и довести через IsoPrep до дистиллированной воды (ортоксилол – 2 порции по 5 минут, IsoPrep – 2 порции по 3 мин, дистиллированная вода – 5 мин).
2. Окрасить срезы в течение 5 минут в гематоксилине Джилла.
3. Промыть в дистиллированной воде 2 минуты.
4. Поместить в подсиняющий раствор (1 капля 10% раствора аммиака на 100 мл дистиллированной воды) на 1 минуту.
5. Промыть в дистиллированной воде 5 минут.
6. Поместить в 1% раствор водного эозина на 60 секунд.
7. Быстро промыть в дистиллированной воде.
8. Удалить воду из срезов в двух порциях IsoPrep по 2 мин, просветлить в двух порциях ортоксилота по 2 мин.
9. Заключить окрашенные гистологические срезы в синтетическую среду BioMount под покровное стекло. В результате окраски гематоксилином ядра клеток приобретают синий или сине-фиолетовый оттенок, а цитоплазма клеток и коллагеновые волокна соединительной ткани окрашиваются эозином в различные оттенки розового цвета.

Протокол инфильтрации ткани химическими реактивами в автоматическом тканевом процессоре «Leica TP1020» карусельного типа

Общее время фиксации и проводки материала в химических реактивах (4% забуферный нейтральный формалин, IsoPrep, ксилол, парафиновая среда HistoMix) составило 41 час.

- 1 Фиксация в 4% растворе забуферного нейтрального формалина в течение 24 часов.
- 2 IsoPrep 1 час
- 3 IsoPrep 1,5 часа
- 4 IsoPrep 1,5 часа
- 5 IsoPrep 1,5 часа
- 6 IsoPrep 2 часа
- 7 IsoPrep 2 часа
- 8 Ксилол 1 час
- 9 Ксилол 1 час
- 10 Ксилол 1 час
- 11 Парафин 2 часа
- 12 Парафин 2,5 часа

Далее материал помещается в диспенсер заливочной станции «LeicaIG1150» для заливки ткани парафиновой средой HistoMix в гистологические кассеты с формированием парафинового блока и последующим охлаждением на охлаждающей плате заливочной станции.

Затем охлажденные блоки с исследуемыми материалами фиксируются в санном микротоме фирмы «Leica SM2000R», для получения гистологических срезов толщиной 3 микрона.