4. Ясинская А. А. Аудиологический скрининг, основанный на регистрации стационарных слуховых вызванных потенциалов. Автореф. дис. ... канд. мед. наук/ А. А. Ясинская. – М., 2006. – 28 с.
5. Ясинская А. А Возможность повышения эффективности аудиологического скрининга у детей раннего возраста. / А. А. Ясинская. 2-ой Национальный конгресс аудиологов и 5-й Международный симпозиум «Современные проблемы физиологии и патологии слуха» Россия, Суздаль: Тез. докл. – М. 2006 171–172
6. Giebel A., Redemann E. Hearing J 1992; 45: 25–28.
7. Hall J. W. Auditory brainstem frequency following responses to waveform envelope periodicity /J. W. Hall// Science. – 1979. – . № 205. – С. 1297–1306.
8. Lins O. G. Auditory steady-state responses to multiple simultaneous stimuli/O. G. Lins, T. W. Picton // Electroencephalogr Clin Neurophysiol. – 1995. – № 96. – С. 420–452.
9. Regan D. Human brain electrophysiology: Evoked potentials and evoked magnetic fields in science and medicine / D. Regan. – New York: Elsevier, 1989.
10. Regan D. Some characteristics of average steady-state and transient responses evoked by modulated light. / D. Regan // Electroencephalogr Clin Neurophysiol. – 1966. – № 20. – С. 238–286.

УДК: 616. 285: 612. 017. 1

О РОЛИ ИНТЕРЛЕЙКИНА-8 В РАЗВИТИИ ТИМПАНОСКЛЕРОТИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА

Р. Р. Миниахметова

ГУ «Санкт-Петербургский НИИ уха, горла, носа и речи Росмедтехнологий» (Директор – Засл. РФ, проф. Ю. К. Янов)

Тимпаносклероз (ТС) – это патологический процесс, характеризующийся образованием беловатых плотных конгломератов в толще барабанной перепонки и слизистой оболочки полости среднего уха. ТС развивается, как правило, на фоне хронического гнойного среднего отита. Гистологическими признаками ТС являются увеличение количества коллагеновых волокон в склеротическом очаге, их гиалинизация, кальцификация и оссификация [1, 3, 9, 13].

Тимпаносклеротический процесс в барабанной перепонке развивается в собственной пластинке, в то время как в полости среднего уха поражается базальная мембрана слизистой оболочки [8].

При локализации тимпаносклеротического процесса в барабанной перепонке его чаще называют «мирингосклерозом» (МС), а при распространении в полостях среднего уха используют термин «интратимпанальный ТС». [14].

Этиология и патогенез данного заболевания в настоящее время остаются неясными, однако большинство отиатров считают ТС исходом хронического патологического процесса в среднем ухе, который может иметь место при хроническом гнойном среднем отите, хроническом экссудативном среднем отите, после острых средних отитов или после травмы барабанной перепонки, связанной с установкой тимпано-вентиляционной трубки [1, 8, 9].

Ряд исследователей рассматривают ТС как процесс эктопического образования кости и указывают на участие в данном процессе матричных металлопротеиназ [13], оксида азота, свободных радикалов, супероксиддисмутазы, каталазы [7], факторов оссификации: остеонектина, остеопротегерина, остеопонтина [5], интерлейкина-6 (ИЛ-6) [10].

В последние 10–15 лет появились данные об участии цитокинов в воспалительном процессе среднего уха [6, 12]. Одним из главных медиаторов локальной островоспалительной реакции является интерлейкин-8 (ИЛ-8) [4]. Это провоспалительный цитокин, появляющийся в области внедрения патогена и повреждения тканей для организации защитной реакции. Главными клетками-продуцентами его служат моноциты/макрофаги и эндотелиоциты. ИЛ-8 регулирует привлечение лейкоцитов в места проникновения инфекции с целью инактивации и удаления из организма патогенов. Кроме того, ИЛ-8 может стимулировать ангиогенез, что имеет значение для полноценного заживления поврежденных тканей [2]. Учитывая, что ТС рассмат-

ривается как возможный результат хронического воспаления среднего уха, а также нарушения репарации поврежденной слизистойоболочки [11], представляется актуальным исследование участия ИЛ-8 в развитии тимпаносклеротического процесса. В доступной литературе указана значительная вариабельность уровней ИЛ-8 в ушных смывах у пациентов с хроническим гнойным средним отитом (ХГСО) без какой-либо зависимости от формы ХГСО и от стадии воспалительного процесса (обострение, ремиссия) [4]. При этом мы не встречали работ по исследованию уровней ИЛ-8 в ушных смывах и в операционном материале при тимпаносклеротическом процессе.

Цель исследования

Определение роли интерлейкина-8 (ИЛ-8) в развитии тимпаносклеротического процесса в среднем ухе.

Материалы и методы

Клиническое обследование пациентов проводилось на базе клиники реставрационной хирургии уха СПб НИИ ЛОР. Иммунологические исследования проводились на базе СПб НИИ особо чистых биопрепаратов. В исследование были включены 34 больных с хроническим средним отитом (16 женщин и 18 мужчин в возрасте от 16 до 65 лет). Группы исследования формировались после тщательного сбора анамнеза. В исследование не включались пациенты с сопутствующей ЛОР-патологией и хронической соматической патологией в стадии обострения. Всем пациентам было выполнено традиционное клинико-аудиологическое обследование. Пациенты были разделены на две группы: I – с ТС, установленным при отомикроскопии или интраоперационно – 16 человек (6 женщин и 10 мужчин), II – без признаков ТС – 18 человек (10 женщин и 8 мужчин).

У всех пациентов были определены уровни ИЛ-8 в смывах из полости среднего уха. Забор материала для исследования осуществляли до операции под контролем зрения. Перед забором материала тщательно протирали поверхность кожи наружного слухового прохода сухой ватой, затем проводили 2-кратную обработку кожи наружного слухового прохода 76 % раствором спирта с помощью металлического зонда с ватой.

Для получения смывов использовался шприц инсулинового типа объемом 1 мл с длинной изогнутой иглой. Срез иглы для уменьшения возможности травматизации слизистой оболочки предварительно обтачивали надфилем. Получение смыва выполняли следующим образом. Промывную жидкость (стерильный физиологический раствор) объемом 1 мл вводили в полость среднего уха в несколько этапов (из-за небольших объемов барабанных полостей) с помощью шприца и через несколько секунд тем же шприцем под контролем зрения извлекали обратно. Полученный материал центрифугировали при комнатной температуре при 6000 g в течение 15 мин. Супернатант переносили в пластиковые пробирки однократного применения, замораживали при температуре – 20°С и сохраняли до проведения иммунологического исследования.

У всех пациентов с ТС осуществлялся забор операционного материала (тимпаносклеротические бляшки) из полости среднего уха (либо из барабанной перепонки) во время хирургического вмешательства под визуальным контролем. Операционный материал замораживался при температуре – 6°С до проведения исследований, за 1 час до постановки реакции биоптаты помещались в 0. 05М фосфатный буферный раствор pH 7.2 с 0.1 % детергентом NP-40 для экстракции определяемого цитокина. В экстракте операционного материала определялся уровень ИЛ-8.

Определение концентраций ИЛ-8 в супернатантах смывов со слизистой оболочки среднего уха и в экстрактах операционного материала осуществлялось методом твердофазного иммуноферментного анализа. Использовались полистироловые планшеты, тест-системы. Сначала на планшет сорбировали первые моноклональные антитела к ИЛ-8 в количестве 50 мкл на лунку в концентрации 10 мкг/мл в сорбционном карбонатном буферном растворе 0.1М pH 9.0 в течение 1 часа при комнатной температуре на шейкере. После этого проводили двукратную отмывку фосфатным буферным раствором 0.05М pH 7.2 с 0.1 % детергентом NP-40. При отмывке в каждую лунку планшета вносили по 100 мкл отмывочного фосфатного буферного ра-

створа 12-канальной автоматической пипеткой, после чего аккуратно декантировали и аспирировали пипеткой внесенный буфер. По окончании отмывки проводили стадию блокировки, внося в каждую лунку по 100 мкл фосфатного 0.05М буфера с 1 % бычьим сывороточным альбумином, после чего так же проводили двукратную отмывку, как описано выше. На следующей стадии вносили исследуемые образцы супернатантов и экстрактов в количестве 50 мкл на лунку, проводя 2–3 двукратных разведения в 3 параллелях. Разведения супернатантов и экстрактов проводили в отмывочном фосфатном буферном растворе. Одновременно с образцами в один из рядов планшета вносили стандартный образец цитокина в разной концентрации. Планшет с образцами инкубировали 1 час на шейкере при комнатной температуре, либо оставляли на ночь при +4°С. По окончании инкубации с образцами проводили двукратную отмывку, как описано выше. Затем в планшет вносили вторые поликлональные кроличьи антитела к ИЛ-8 в количестве 50 мкл на лунку в концентрации 1мкг/мл. Инкубацию со вторыми антителами проводили в течение 1 часа при тех же условиях, что и предыдущие стадии. На последнем этапе после очередной двукратной отмывки в планшет вносили козьи антикроличьи антитела, меченные пероксидазой хрена для открытия поликлональных кроличьих антител. Инкубацию с последними коньюгатами проводили в течение 1 часа в тех же условиях, концентрация этих коньюгатов подбиралась опытным путем. По окончании последнего этапа проводили четырехкратную отмывку и затем проводили окрашивание в фосфатно-цитратном буферном растворе 0.1М pH 5.0 с внесенным красителем ортофенилендиамином в концентрации 0. 5мг/мл и перекисью водорода 0.06 % в качестве субстрата. Окрашивание проводили в темноте при комнатной температуре в течение 15–20 мин до полного проявления окрашенного продукта ферментной реакции. Остановку реакции осуществляли внесением в лунки равного объема 1М серной кислоты. Результаты реакции учитывали при длине волны 495нм на спектрофотометре.

Концентрацию ИЛ-8 в образце определяли по калибровочной кривой соотношения оптической плотности раствора в лунке и известной концентрации ИЛ-8 в качестве стандарта, умножая на соответствующее разведение образца.

Результаты

Исследование концентрации ИЛ-8 в смывах у больных I группы выявило значительную вариабельность этого показателя. Вместе с тем, анализ интраоперационных находок у этих больных позволил нам установить ряд закономерностей, представленных в таблице.

Таблица

Уровни ИЛ-8 в смывах из полости среднего уха у пациентов с ТС с различными интраоперационными находками

Количество пациентов	Интраоперационные особенности	Уровень ИЛ-8 в ушных смывах, пг/мл
8	Нет патологических изменений со стороны слизистой, кроме тимпаносклероза	43,75±10,96
2	Отечность слизистой медиальной стенки	329,9±6,3
4	Рубцовый процесс в барабанной полости	363,45±6,45
2	Кариозно измененная наковальня	444,8±4,9

Уровни ИЛ-8 в экстрактах операционного материала пациентов с ТС значительно варьировали. Статистический анализ полученных данных не позволил нам выявить зависимости уровней ИЛ-8 в экстрактах операционных материалов от интраоперационных находок. У 2-х пациентов с помощью наших методов ИЛ-8 не был обнаружен. Именно у этих двух больных во время операции помимо тимпаносклеротичекого процесса, были выявлены рубцовые изменения со стороны слизистой оболочки. Вместе с тем, максимальная концентрация ИЛ-8 (1250 пг/мл) определялась у пациента с кариозным процессом.

У пациентов II группы уровни ИЛ-8 в ушных смывах варьировали от 113,9 пг/мл до 594,7 пг/мл. При этом максимальная концентрация ИЛ-8 (594,7 пг/мл) была у пациента с холестеатомой в

antrum, aditus ad antrum, барабанной полости с распространением в фациальный и тимпанальный синусы, обнаруженной во время операции. Наиболее низкие показатели уровня ИЛ-8 (136,7±18,3 пг/мл) выявлялись у пациентов с минимальными патологическими изменениями со стороны слизистой оболочки барабанной полости: незначительные отечность или рубцовый процесс – или без них. У больных со значительными фиброзным или грануляционным процессом концентрация ИЛ-8 имела средние значения: 361,75±21,65 пг/мл.

Обсуждение

При анализе уровней ИЛ-8 в ушных смывах пациентов с ТС мы обратили внимание, что, несмотря на их значительную вариабельность, уровни данного цитокина, участвующего в развитии локальной островоспалительной реакции, у пациентов с интратимпанальным ТС без каких-либо сопутствующих изменений со стороны слизистой оболочки полости среднего уха на порядок ниже, чем уровень этого же цитокина в ушных смывах пациентов, у которых ТС сочетается с другими патологическими процессами в полости среднего уха: рубцовым или кариозным процессом, отечностью слизистой оболочки.

Уровни ИЛ-8 в ушных смывах пациентов с хроническим средним отитом, у которых при отомикроскопии или во время операции не были обнаружены тимпаносклеротические изменения, также оказались значительно выше, чем у пациентов без каких-либо патологических изменений со стороны слизистой оболочки среднего уха, кроме ТС. При этом максимальная концентрация ИЛ-8 определялась у пациента с распространенным холестеатомным процессом: в antrum, aditus ad antrum, барабанной полости, фациальном и тимпанальном синусах.

Данные, полученные при анализе уровней ИЛ-8 в экстракте биоптатов, свидетельствуют о высокой степени их вариации. У двух пациентов ИЛ-8 в данном материале с помощью нашего метода исследования выявить не удалось. У остальных пациентов его концентрация варьировала от 17,8 до 1250 пг/мл вне зависимости от типа тимпаносклеротического процесса.

Выводы:

1. *Обнаружение провоспалительного цитокина ИЛ-8 в смывах из полости среднего уха у пациентов с тимпаносклерозом и в экстрактах биоптатов тимпаносклероза подтверждает факт синтеза ИЛ-8 в этих структурах при хроническом среднем отите.*
2. *Концентрация провоспалительного цитокина ИЛ-8 в смывах из полости среднего уха у пациентов с тимпаносклерозом без других патологических изменений в среднем ухе на порядок ниже, чем уровни этого же цитокина в ушных смывах при сочетании тимпаносклероза с отечностью слизистой оболочки, рубцовым или кариозным процессом.*
3. *Уровень ИЛ-8 в мывах из полости среднего уха у больных с хроническим отитом, не сопровождающимся тимпаносклерозом, значительно выше, чем у больных с тимпаносклерозом, но без выраженных патологических изменений слизистой оболочки.*
4. *Концентрация ИЛ-8 в экстрактах биоптатов тимпаносклероза обладает большой вариабельностью (от 20 до 1250 пг/мл) вне зависимости от давности и распространенности тимпаносклеротического процесса.*

ЛИТЕРАТУРА

1. Артюшина Е. И. Сравнительная характеристика слуховой функции у больных с тимпаносклерозом и хроническим гнойным средним отитом / Е. И. Артюшина, А. Н. Петровская // Вестн. оториноларингол. – 2006. – № 5. – С. 137–139.
2. Симбирцев А. С. ИЛ-8 и другие хемокины/ А. С. Симбирцев //Иммунология. – 1999. – № 4. – С. 9–14.
3. Тарасов Д. И. Заболевания среднего уха/ Д. И. Тарасов, О. К. Федорова., В. П. Быкова. – М.: Медицина, 1988. – 288 с.
4. Чернушевич И. И. Рекомбинантный интерлейкин-1b (беталейкин) в лечении хронического гнойного среднего отита/ И. И. Чернушевич, А. С. Симбирцев // Новости оториноларингол. и логопатол. – 1999. – № 3. – С. 58–61.
5. Calcium deposition and expression of bone modelling markers in the tympanic membrane following acute otitis media / G. Raustyte, P. Caye-Thomasen, A. Hermansson et al. // International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology. – 2006. – Vol. 70. – P. 529–539.
6. Chung J. W. Different production of interleukin-1alpha, interleukin-1beta and interleukin-8 from cholesteatomatous and normal epithelium. / J. W. Chung, T. H. Yoon. // Acta Otolaryngol. – 1998. – Vol. 118, N. 2. – P. 386–391.
7. Comparison of free radicals and antioxidant enzymes in chronic otitis media with and without tympanosclerosis/ T. Karlidag, N. Ilhan, I. Kaygusuz et al. // Laryngoscope. – 2004. – Vol. 114, N 1. – P. 85–89.

8. Definitions, Terminology, and Classification of Otitis Media / C. D. Bluestone, C. G. Gates, J. O. Klein et al. // Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. – 2002. – Vol. 111. – P. 8–18.
9. Forseni M. A study of Inflammatory Mediators in the Human Tympanosclerotic Middle Ear / M. Forseni, D. Bagger-Sjoback, M. Hultcrantz. // Eur. Arch. Otorhinolaryngol. Head Neck Surg. – 2001. – Vol. 127. – P. 559–564.
10. Forseni M. Possible inflammatory mediators in tympanosclerosis development / M. Forseni, M. Hultcrantz// International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology. – 2002. – Vol. 63, N 2. – P. 149–154.
11. Gibb A. G. Current considerations in the etiology and diagnosis of tympanosclerosis / A. G. Gibb, Y. T. Pang // Eur. Arch. Otorhinolaryngol. – 1994 – Vol. 251, N8. – P. 439–451.
12. Interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta and interleukin-8 gene expression in human aural cholesteatomas / C. S. Kim, C. H. Lee, J. W. Chung et al. // Acta Otolaryngol. – 1996. – Vol. 116, N. 2. – P. 302–306.
13. The effect of topical Doxycycline in the Prevention of Experimental Tympanosclerosis / Ozcan, A. Selcuk, K. M. Ozcan et al. //Laryngoscope. – 2008. – Vol. 118. – P. 1051–1056.
14. Tympanosclerosis: review of literature and incidence among patients with middle-ear infection / S. Asiri, A. Hasham, F. Al Anazy et al. // J. Laryngol. Otol. – 1999. – Vol. 113. – P. 1076–1080.

УДК: 616. 285–089. 853

ХИРУРГИЧЕСКАЯ ТАКТИКА ПРИ ТИМПАНОСКЛЕРОЗЕ

Р. Р. Миниахметова

ГУ «Санкт-Петербургский НИИ уха, горла, носа и речи Росмедтехнологий» (Директор – Засл. врач РФ, проф. Ю. К. Янов)

Тимпаносклероз (ТС) является завершающим этапом хронического воспалительного процесса в среднем ухе и считается процессом неспецифичным и необратимым [12]. ТС развивается в результате гиалиновой дегенерации фиброзного и эластического слоев в собственной пластинке барабанной перепонки и базальной мембране слизистой оболочки среднего уха с отложением солей кальция и формированием хрящеподобной или похожей на кость ткани. ТС имеет вид желтоватых или белых плотных очаговых утолщений – так называемых тимпаносклеротических бляшек, располагающихся в толще слизистой оболочки барабанной полости или под эпидермальным слоем барабанной перепонки [2, 7, 9, 15, 16, 18].

Этиология и патогенез ТС до настоящего времени остаются невыясненными [18, 21].

Наиболее важным вопросом является взаимоотношение склеротических образований со звукопроводящими структурами среднего уха, т. к. от этих взаимоотношений зависит степень влияния ТС на слуховую функцию. Кроме того, выяснение указанного вопроса во многом определяет хирургическую тактику при выполнении слухоулучшающих операций.

При локализации ТС в пределах барабанной перепонки ряд авторов использует термин «мирингосклероз» (МС), хотя гистопатология склеротических конгломератов, локализующихся в барабанной перепонке и в слизистой барабанной полости, идентична [9, 12, 13, 21].

По мнению некоторых авторов, в отличие от простых петрификатов бляшки ТС в толще барабанной перепонки всегда связаны с костной тканью рукоятки молоточка, реже с бороздкой барабанного кольца (sulcus tympanicis), или с плотной фиброзной тканью (umbo, фиброзное кольцо) [2].

Поскольку бляшки, расположенные в пределах барабанной перепонки (МС), могут оказывать влияние на слуховую функцию, распространенность этого процесса имеет важное значение в отохирургии.

В литературе предлагается несколько вариантов классификации распространенности МС. Так, C. Ozcan и соавт. (2002) при исследовании экспериментального МС под световым микроскопом оценивали его степень по четырехбальной шкале: отсутствие (no visible MS) – собственная пластинка барабанной перепонки свободна от склеротических отложений, случайный (occasional MS) – несколько отдельных участков в собственной пластинке, умеренный (moderate MS) – отдельные сливающиеся участки в собственной пластинке, существенный (serious MS) – обширные сливающиеся склеротические участки, наблюдаемые в собственной пластинке [19].