

УДК 615.03:616-092.9.001.8

Вплив трофіну на рецепторні структури внутрішнього вуха морських свинок

Тімен Г.Е.

ДУ «Інститут отоларингології імені О.С. Коломійченко НАМН України»
(дир. – академік Д.І. Заболотний)

Голод О.М.

ДУ «Інститут отоларингології імені О.С. Коломійченко НАМН України»
(дир. – академік Д.І. Заболотний)

Руденька К.Л.

ДУ «Інститут отоларингології імені О.С. Коломійченко НАМН України»
(дир. – академік Д.І. Заболотний)

Резюме

В останні роки все більшу увагу приділяють препаратам, у склад яких входять нейротрофічні фактори. Серед таких препаратів є Трофін - суспензія з ембріональної нервової тканини людей. Проведені дослідження засвідчили, що препарат Трофін володіє протекторними властивостями, нівелюючи тим самим розвиток гострої гентаміцинової сенсоневральної приглухуватості. Доказовою базою слугував метод отоакустичної емісії, який вперше в Україні був використаний в ході експерименту і дав можливість щоденно контролювати функціональні зміни зовнішніх волоскових клітин кортієвого органу морських свинок.

Ключові слова: дослідження, рецепторні структури внутрішнього вуха.

З кожним днем зростає кількість лікарських препаратів, токсична дія яких впливає на внутрішнє вухо і призводить до порушення слуху. Особливо це актуально, коли неможливо відмовитися від застосування таких лікарських засобів, у зв'язку з тим, що призначають за життєвими показаннями (онкологічні захворювання, тяжкий перебіг інфекційних захворювань, перебування в реанімації). Найчастіше у клініці використовують аміноглікозидні антибіотики (гентаміцину сульфат, канаміцин, амікацин, неоміцин, тобраміцин), саліцилати, діуретики, препарати платини при онкозахворюваннях та ін., які призводять до важких та незворотних токсичних уражень внутрішнього вуха, що найчастіше розвиваються у пацієнтів, які мають ниркову недостатність, у вагітних, новонароджених і немовлят.

Має значення також одночасне використання двох препаратів, тривалість курсу (понад 10 днів), дози та супутні захворювання [1-7].

Кількість хворих зі зниженням слуху стрімко зростає та призводить до постійного пошуку нових препаратів лікування та профілактики. В останні роки, для пошуків ефективного медикаментозного лікування хворих з порушеннями слуху, все більшу увагу приділяють препаратам, у склад яких входять нейротрофічні фактори. Серед таких препаратів, нашу увагу привернула суспензія з ембріональної нервової тканини, створена у ДУ «Інститут нейрохірургії імені академіка А.П. Ромоданова НАМН України» за методикою Цимбалюка В.І. та Васильєвої І.Г. (2001р.) [8]. «Трофін» – екстракт з ембріональної нервової тканини людей, 4-6 тижнів гестації, який отримують з абортивного матеріалу. Завдяки наявності у препараті нейротрофічних факторів, суспензія має нейропротекторні та нейростимулюючі властивості, що підтверджено у ході успішної клінічної апробації при дитячому церебральному паралічі, ішемічному інсульті, черепно-мозковій травмі, паркінсонізмі та розсіяному склерозі [9-12].

Вивчення впливу будь-якого медикаментозного препарату, механізм дії якого може позитивно вплинути на стан внутрішнього вуха, повинен мати відповідну доказову базу. На сучасному рівні – це морфологічні та функціональні дослідження. До останніх відносяться: коротколатентні викликані слухові потенціали (КСВП) та отоакустична емісія (ОАЕ). На превеликий жаль, останній метод дослідження широко використовується лише в західних країнах. В той же час, в доступних вітчизняних літературних джерелах, нами не знайдено жодної згадки про використання ОАЕ у експериментальних тварин і це незважаючи на те, що даний метод є неінвазивним, на відмінну від КСВП.

Отоакустична емісія, запропонована D. T. Kemp у 1978, представляє собою мікромеханічну відповідь на звуковий стимул зовнішніх волоскових клітин Кортієвого органу, яка за допомогою високочутливого мікрофону реєструється у зовнішньому слуховому проході [13]. Характеризується ОАЕ рівнем звукового тиску (інтенсивність, амплітуда)

та вимірюється у дБ за допомогою скринінгових та клінічних приладів.

За класифікацією Probs (1990) розрізняють спонтанну та викликану ОАЕ. Викликана, в свою чергу, поділяється на затриману викликану ОАЕ, ОАЕ на частоті продуктів спотворення та ОАЕ на частоті стимуляції [14]. Серед видів викликаної ОАЕ, нами було вибрано ОАЕ на частоті продуктів спотворення, так як саме даний вид дозволяє по частотно охарактеризувати функціональну збереженість зовнішніх волоскових клітин. Тест ОАЕ на частоті продуктів спотворення (DPOAE - англ.) – це акустичні сигнали, які можуть бути визначені у зовнішньому слуховому ході об'єкта з нормально функціонуючими зовнішніми волосковими клітинами (ЗВК) після стимуляції слухової системи двох чистих тонів f_1 та f_2 . Емісія, яка виникає у результаті цього, являється продуктом спотворення тону на частоті $2f_1 - f_2$.

Метою роботи являлось вивчення об'єктивної оцінки функціональної активності зовнішніх волоскових клітин під час впливу трофіну на фоні аміноглікозидного ототоксикозу на рецепторний стан внутрішнього вуха експериментальних тварин.

Матеріал та методи обстеження.

Експериментальні дослідження виконані на 28 здорових статевозрілих морських свинок, вагою від 250 до 900 г. Морські свинки розподілені на чотири групи. I група (6 тварин, 12 вух) - інтактні тварини, II (6 шт., 12 вух) - тварини, які отримували розчин трофіну в дозі 0,4 мг/кг, внутрішньом'язово через день упродовж 14 днів та III (10 тварин, 20 вух) - штучно моделювали патологічний процес глухоти за допомогою ототоксичного антибіотика аміноглікозидного ряду – гентаміцину сульфат, який вводився щоденно протягом 14 днів з розрахунку 50 мг/кг ваги. Морські свинки IV групи (6 тварин, 12 вух) щоденно отримували аміноглікозидний антибіотик у вищезазначеній дозі протягом 14 днів (аналогічно III групі) та трофіну внутрішньом'язово, в дозі 0,4 мг/кг ваги, через день протягом 14 днів.

Всім дослідним тваринам як на початку експерименту, так і по його закінченню, слухову функцію визначали за допомогою отоакустичної емісії на частоті продуктів спотворення (DPOAE - англ.) на приладі «Audera» фірми «Grason-Stadler» (США).

Даний тест дозволяє по частотно характеризувати функціональну збереженість зовнішніх волоскових клітин в діапазоні від 0,5 кГц до 12 кГц, так як саме у морських свинок слухове сприйняття зміщене в сторону височастотних звуків максимально досягаючи до 10 кГц.

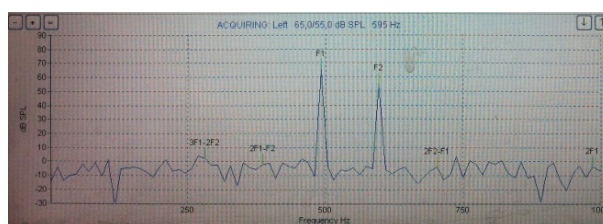
Дослідження проводилось по черзі кожній тварині з двох сторін по індивідуально-діагностичних вимірах, без введення у медикаментозний сон. Час обстеження в середньому тривав 5-7 хвилин.

Реєстрація ОАЕ виконувалась у звукоізолюваному приміщенні, після ретельної обтурації зовнішнього слухового ходу стандартною індивідуальною вкладкою грибоподібної форми окремо на кожному вусі (рис. 1).

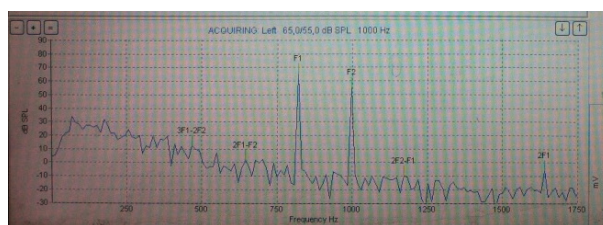


Рисунок 1. Реєстрація ОАЕ у морської свинки «Audera» фірми «Grason-Stadler» (США).

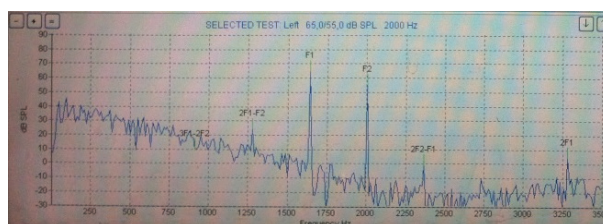
Отримані результати фіксувались приладом. Інтенсивність парних стимулів на вказаних частотах складала 65-55 дБ (РЗТ) при співвідношенні частот 1,22 (рис. 2).



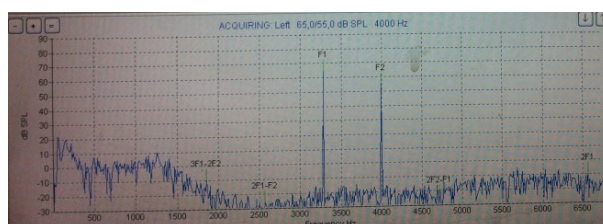
595 Гц



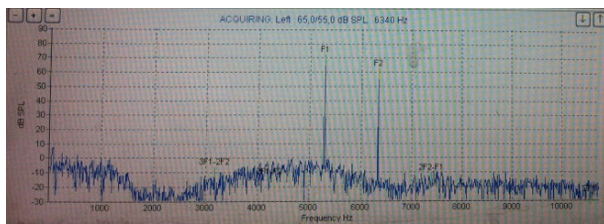
1000 Гц



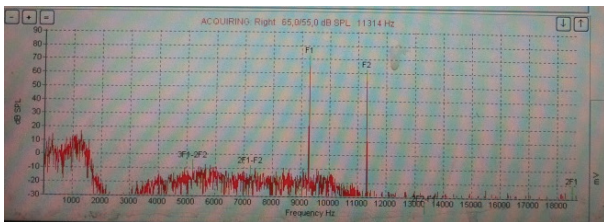
2000 Гц



4000 Гц



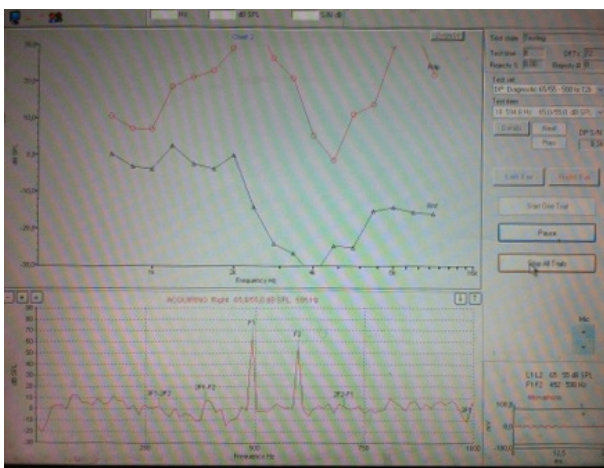
6340 Гц



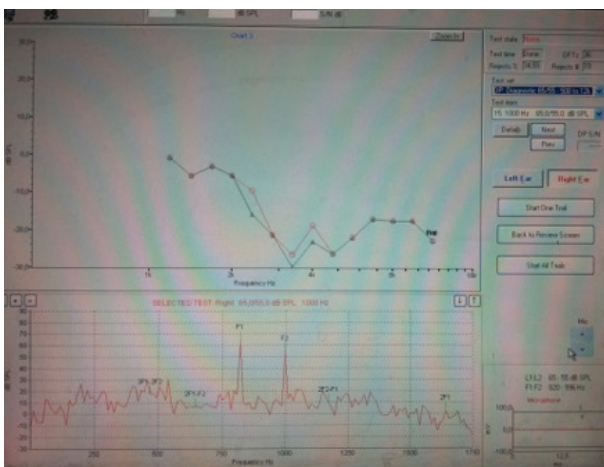
11314 Гц

Рисунок 2. Вигляд стимулу для отримання ОАЕ на частоті продуктів спотворення на різних частотах тестування на приладі «Audera» фірми «Grason-Stadler» (США).

Позитивною реєстрація ОАЕ вважалась за умов рівня амплітуди по шкалі не нижчою мінус 10 дБ РЗТ та співвідношенням сигнал/шум вищим 6 дБ на частоті вимірювання (рис. 3).



а)



б)

Рисунок 3. Приклад позитивної (а) і негативної (б) реєстрації ОАЕ у морської свинки.

Результати дослідження

На початку проведення експерименту, всі 28 морських свинок були рухливі, активні, їх шерсть блискуча, гладка. Ознак соматичної та отомікроскопічної патології не виявлено. Рефлекс Preyer'a позитивний. Дослідні тварини I (інтактні), II (трофін внутрішньом'язово в дозі 0,4 мг/кг) та IV (модель СНП та внутрішньом'язове введення трофіну) групи протягом 14 днів знаходились під щоденним спостереженням, ніяких поведінкових змін та патологічних порушень у них не виявлено. В той же час, у тварин III (гентаміцин внутрішньом'язово в дозі 50 мг/кг) групи, які отримували аміноглікозидний антибіотик гентаміцин, в дозі 50 мг/кг, починаючи з 8-9 доби дослідження, з'являлися ознаки інтоксикації, які проявлялись в'ялістю, зниженням рухливості, частим діурезом та слабопозитивним рефлексом Preyer'a. На 12-14 добу експерименту у 4 морських свинок (з вагою 250 г на початку експерименту) з'явилися випадіння шерсті пасмами, неконтрольована дефекація, різке зменшення ваги до 50 % та відсутній рефлекс Preyer'a.

Оцінка слухової функції за допомогою ОАЕ на частоті продуктів спотворення на апараті «Audera» у всіх 28 морських свинок було зафіксовано в діапазоні частот 0,5 - 12 кГц, в окремих випадках - починаючи з частот 0,7 - 1,0 кГц до початку експерименту. У переважній більшості випадків, крива ОАЕ графічно мала хвилястий вигляд, досягаючи максимуму амплітуди понад 30-40 дБ в двох зонах частот 2,5-3 і 9-12 кГц, а на частоті 4 кГц демонструвала зубець-западину у 100 % випадків (рис. 4). Відносно зниження амплітуди ОАЕ на частоті 4 кГц існує припущення, що воно пов'язане із зниженням слухової чутливості тварин внаслідок довготривалого перебування в постійному шумі віварію.

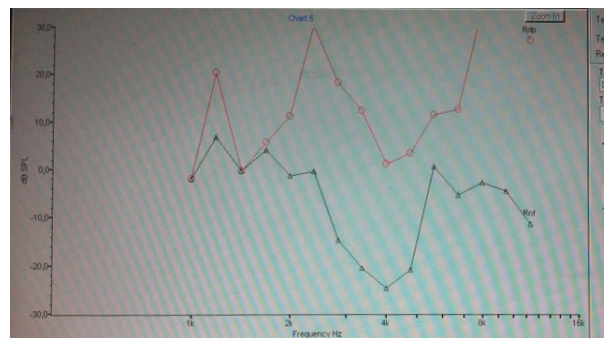
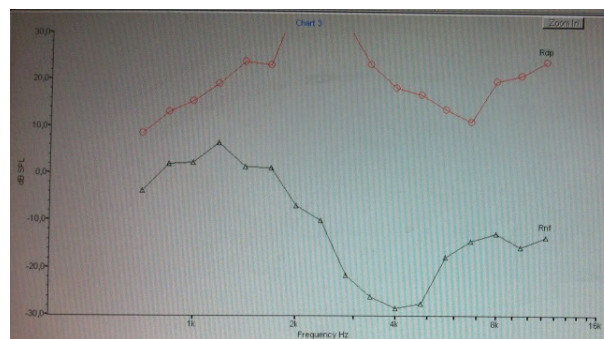


Рисунок 4. Графічний вигляд кривих ОАЕ у нормальноточуючих морських свинок I, II, III та IV груп до початку експерименту.

При повторних перевірочних обстеженнях показники ОАЕ на однакових частотах не завжди були стабільними і в поодиноких випадках на окремих частотах змінювались у порівнянні з попередніми показниками на 5-10 дБ.

За даними реєстрації ОАЕ оцінювалась зміна слухової чутливості на частотах 2 кГц і 8 кГц та загальний вигляд графіку у всіх тварин I, II, III та IV груп (табл.1).

Таблиця 1
Середньостатистичні значення показників об'єктивної аудіометрії за даними реєстрації ОАЕ у тварин I, II, III та IV груп на початку експерименту.

№ групи	Показник	Кількість спостережень	Значення, М ± m
	Рівень амплітуди на частоті 2 кГц, дБ РЗТ	12	24,7 ± 6,87
I	Співвідношення сигнал/шум на частоті 2 кГц, дБ	12	24,8 ± 11,82
	Рівень амплітуди на частоті 8 кГц, дБ РЗТ	12	26,7 ± 5,87
	Співвідношення сигнал/шум на частоті 8 кГц, дБ	12	33,5 ± 6,24
	Рівень амплітуди на частоті 2 кГц, дБ РЗТ	12	22,1 ± 4,60
II	Співвідношення сигнал/шум на частоті 2 кГц, дБ	12	28,5 ± 9,89
	Рівень амплітуди на частоті 8 кГц, дБ РЗТ	12	25,94 ± 6,42
	Співвідношення сигнал/шум на частоті 8 кГц, дБ	12	34,9 ± 5,61
	Рівень амплітуди на частоті 2 кГц, дБ РЗТ	20	23,7 ± 8,49
III	Співвідношення сигнал/шум на частоті 2 кГц, дБ	20	29,9 ± 10,13
	Рівень амплітуди на частоті 8 кГц, дБ РЗТ	20	24,9 ± 6,13
	Співвідношення сигнал/шум на частоті 8 кГц, дБ	20	32,2 ± 7,02
	Рівень амплітуди на частоті 2 кГц, дБ РЗТ	12	22,4 ± 7,84
IV	Співвідношення сигнал/шум на частоті 2 кГц, дБ	12	31,06 ± 10,11
	Рівень амплітуди на частоті 8 кГц, дБ РЗТ	12	24,68 ± 5,52
	Співвідношення сигнал/шум на частоті 8 кГц, дБ	12	32,37 ± 6,84
	Рівень амплітуди на частоті 2 кГц, дБ РЗТ	12	22,4 ± 7,84

На початку експерименту у всіх морських свинок I (інтактні), II (трофін внутрішньом'язово в дозі 0,4 мг/кг), III (гентаміцин внутрішньом'язово в дозі 50 мг/кг) та IV (модель СНП та внутрішньом'язове введення трофіну) груп функціональних змін слухового аналізатора не було виявлено (рис. 5). Однак, після закінчення експерименту лише у тварин I, II та IV груп відмінностей від початкових даних ОАЕ не спостерігалось, що також було підтверджено і патоморфологічними дослідженнями равлика мурчаків в наших попередніх роботах [15,16].

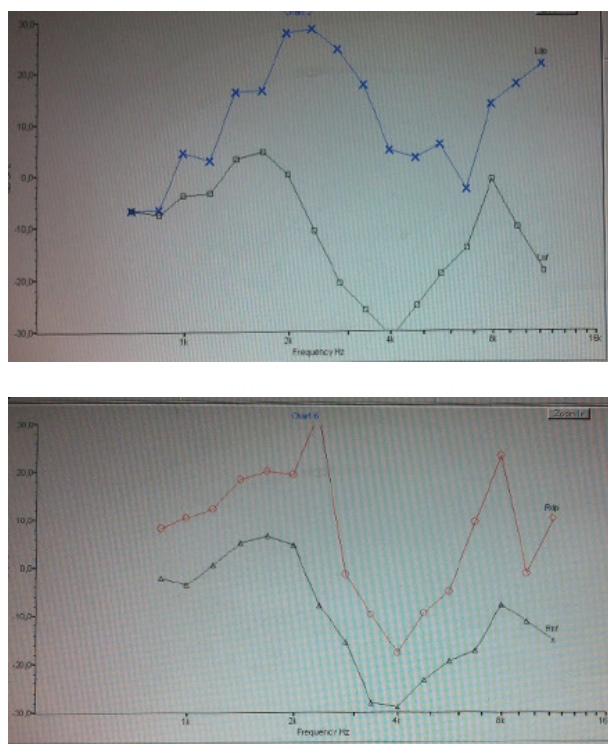


Рисунок 5. ОАЕ у морських свинок I групи по закінченню експерименту.

У той же час, на 15-й день експерименту, у тварин III групи, яким після штучно змодельованого аміноглікозидного ототоксикозу, проводили повторно ОАЕ, було виявлено пригнічення функції зовнішніх волоскових клітин у звуженому діапазоні частот після дії гентаміцину, а у 4 тварин, з масою тіла менше 200 г, взагалі відсутня позитивна реєстрація ОАЕ на діапазоні частот 6 та 8 кГц (табл. 2).

Таблиця 2

Середньостатистичні значення показників об'єктивної аудіометрії за даними реєстрації ОАЕ у тварин III групи, що отримували гентаміцин у дозі 50 мг/кг протягом 14 діб.

Показник	Значення, М ± m		Критерій достовірності,
	до (n=20)	після (n=20)	
Рівень амплітуди на частоті 2 кГц, дБ РЗТ	23,7 ± 8,49	9,06 ± 4,87	P < 0,05
Співвідношення сигнал/шум на частоті 2 кГц, дБ	29,9 ± 10,13	19,14 ± 9,62	P < 0,05
Рівень амплітуди на частоті 8 кГц, дБ РЗТ	24,9 ± 6,13	16,45 ± 9,56*	P < 0,05
Співвідношення сигнал/шум на частоті 8 кГц, дБ	32,2 ± 7,02	27,32 ± 6,38*	P < 0,05

Примітка * - показник підрахований у 6 тварин (12 вух).

Також, у тварин III групи за даними ОАЕ відсутній акустичний інтервал між кривими виміру шумового рівня та амплітудою продуктів спотворення, що свідчить про ураження зовнішніх волоскових клітин (рис. 6).

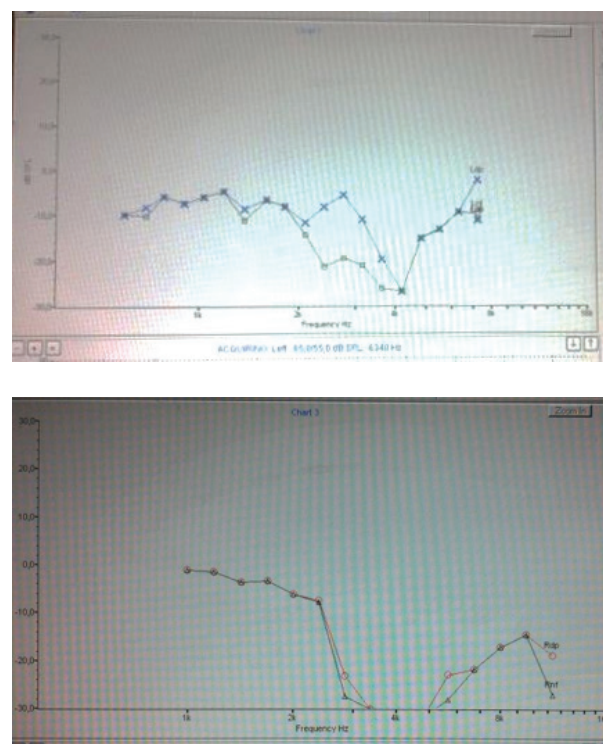


Рисунок 6. Вигляд кривої ОАЕ у морської свинки II групи після дії гентаміцину, 50 мг/кг ваги протягом 2 тижнів.

Висновки. Таким чином, використання вітчизняного препарату Трофін, дозволило нівелювати ототоксичну дію аміноглікозидного антибіотика гентаміцин, що беззаперечно вказує на його протекторну дію. Доказовою базою чого і слугувала отоакустична емісія, яка являється неінвазивним функціональним дослідженням тонотопічної характеристики слухової функції у дослідних тварин, що не потребує седатії, на відміну від коротколатентних слухових викликаний потенціалів, що в свою чергу, не лише скорочує тривалість обстеження, а й дає можливість щоденно контролювати функціональний стан рецепторного апарату внутрішнього вуха морських свинок.

Література:

1. Scott P.M.J., Griffiths M.V. A clinical review of ototoxicity// Clin Otolaryngol. – 1994. - Vol. 19. – P. 465-475.
2. Matz G.J. Aminoglycoside cochlear ototoxicity// Otol. Clin. – 1993. - Vol. 26(5). – P.605-713.
3. Roberts J.A., Norris R., Paterson D.L., Martin J.H. Therapeutic drug monitoring of antimicrobials// British journal of clinical pharmacology. - 2012. - Vol.73. – P. 27-36.
4. Tokgoz B., Somdas M.A., Ucar C., Kocyigit I., Unal A., et al. Correlation between hearing loss and peritonitis frequency and administration of ototoxic intraperitoneal antibiotics in patients with CAPD// Renal failure. - 2010. - Vol. 32. – P.179-84.
5. Allen U. D., MacDonald, N., Fuite, L., Chan, F., Stephens, D. Risk factors for resistance to 'first-line' antimicrobials among urinary tract isolates of Escherichia coli in children// Canadian Medical Association Journal. - 1999. - Vol. 160. – P. 1436–40.
6. Nakashima T., Teranishi M. et al. Vestibular and cochlear toxicity of aminoglycosides-a review//Acta Otol. 2000. - Vol.120. – P.904-911.
7. Богомільський М.Р., Дьяконова І.Н., Рахманова І.В., Сапожников Я.М., Стаховська О.А., Тихомиров А.М. Електрофізіологічна оцінка слухової функції після введення цисплатини // Вестник отоларингології.- 2010.- № 3.- с.24-26.
8. Патент 34141 А Україна. МПК А 61К 35/28. Спосіб отримання лікарського препарату з ембріонального мозку /Цимбалюк В.І., Васильєва І.Г. (Україна). — Заявл. 08.06.99; Опубл. 15.02.01 // Бюл. №1.
9. Цимбалюк В. І., Лісяний М. І., Маркова О. В., Пічкур Л. Д. Результати хірургічного лікування експериментального алергічного енцефаломієліту // Трансплантологія. – 2003. – Т. 4, № 1. – С. 115-117.
10. Цимбалюк В.І., Латишев Д.Ю., Пічкур Л.Д. Вплив нейротрансплантації на перебіг судомного синдрому у хворих з апалічним синдромом та його наслідками // Український нейрохірургічний журнал. – 2005.- № 4. – С. 90-93.
11. Цимбалюк В.І., Васильєва І.Г., Парій К.С. Вивчення специфічності дії трансплантату на відновлення вмісту дофаміну у мозку при експериментальній черепно-мозковій травмі // Вісн. наук. досліджень. — 2006. — №1. — С.116–119.
12. Сіпітій В.І., Кочін О.В., Петренко О.Ю. Експериментальне морфологічне та біохімічне обґрунтування застосування кріоконсервованих ембріональних нервових клітин у хірургічному лікуванні епілепсії // Український нейрохірургічний журнал. – 2005.- № 1. –С. 52-56.
13. Kemp D.T. Stimulated acoustic emission from within the human auditory system // J. Acoust. Soc. Am. – 1978. – Vol. 64. – P.1386-1391.
14. Таварткиладзе Г.А. Руководство по клинической аудиологии. – М.: Медицина. – 2013. – с. 676.
15. Тимен Г.Е., Белоусова А.О., Руденька К.Л., Вінничук П.В., Чубко С.П. Терапевтична дія трофіну та глутаргіну при аміноглікозидному ототоксикозі (морфологічне дослідження)//Журнал вушних, носових і горлових хвороб. – 2015. - № 5. – с. 13-21.
16. Цымбалюк В.И., Тимен Г.Э., Белоусова А.А., Винничук П.В., Руденька Е.Л. Нейротрофические факторы и их влияние на течение экспериментальной нейросенсорной тугоухости//Оториноларингология. Восточная Европа. – 2016. – т. 6.- № 1. – с. 77- 86.

Влияние трофина на рецепторные структуры внутреннего уха морских свинок**Тимен Г.Э.**

ГУ «Институт отоларингологии им. проф. А.И.Коломийченко НАМН Украины»
(дир. – академик Д.И. Заболотный)

Голод А.Н.

ГУ «Институт отоларингологии им. проф. А.И.Коломийченко НАМН Украины»
(дир. – академик Д.И. Заболотный)

Руденька Е.Л.

ГУ «Институт отоларингологии им. проф. А.И.Коломийченко НАМН Украины»
(дир. – академик Д.И. Заболотный)

Резюме

В последние годы большое внимание уделяют препаратам, в состав которых входят нейротрофические факторы. Одним из таких препаратов есть Трофин – суспензия из эмбриональной нервной ткани людей. Проведенные исследования показали, что препарат Трофин обладает протекторными свойствами, нивелируя тем самым развитие острой гентамициновой нейросенсорной тугоухости. Доказательной базой служил метод отоакустической эмиссии, впервые в Украине был использован в ходе эксперимента, и который дает возможность ежедневно контролировать функциональные изменения наружных волосковых клеток кортиевого органа морских свинок.

Ключевые слова: исследования, рецепторные структуры внутреннего уха.

The impact of trofin in receptor structures on the inner ear of guinea pigs

Timen G.

Institute of Otolaryngology named after Prof. A.I. Kolomiychenko of NAMS of Ukraine, SI

Golod A.

Institute of Otolaryngology named after Prof. A.I. Kolomiychenko of NAMS of Ukraine, SI

Rudenska K.

Institute of Otolaryngology named after Prof. A.I. Kolomiychenko of NAMS of Ukraine, SI

Resume

In recent years, more attention is paid to coarse dispersion, which includes neurotrophic factors. These coarse dispersions include Trofin - coarse dispersion of human embryonic nerve tissue. Past studies showed that the drug has Trofin protective properties, thus leveling development of sensorineural hearing loss. Evidence base served as a method of otoacoustic emissions for the first time in Ukraine was used in the experiment and allows to monitor daily changes in external hair cells spiral organ of guinea pigs.

Key words: experiment, receptor structures on the inner ear.
