

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи



Мокоян Жанна Тиграновна

**Применение метода тканевой инженерии с использованием фактора
роста фибробластов для закрытия стойких дефектов барабанной перепонки**

3.1.3. Оториноларингология

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор
Свистушкин Валерий Михайлович

Научный консультант:

доктор химических наук, профессор
Тимашёв Пётр Сергеевич

Москва – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1.1. Медико-социальные аспекты стойкой тугоухости.....	11
1.2. Морфологические и механические характеристики барабанной перепонки и их влияние на слух.....	14
1.3. Эволюция хирургических способов закрытия стойких перфораций барабанной перепонки.....	24
1.4. Тканеинженерный подход к закрытию стойких перфораций барабанной перепонки.....	28
1.5. Поиск адекватной модели стойкой перфорации барабанной перепонки.....	38
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ.....	43
2.1. Обоснование выбора шиншиллы в качестве объекта экспериментального исследования.....	43
2.2. Условия содержания животных.....	44
2.3. Дизайн и структура экспериментальной работы.....	45
2.3.1. Общая характеристика первого этапа эксперимента.....	45
2.3.2. Общая характеристика второго этапа эксперимента.....	47
2.4. Общая характеристика методов исследования, использованных в эксперименте.....	49
2.4.1. Отовидеоэндоскопия.....	49
2.4.2. Морфологическое исследование.....	51
2.4.3. Атомно-силовая микроскопия.....	57
2.5. Методы статистической обработки полученных результатов.....	59
Глава 3. ПЕРВЫЙ ЭТАП ЭКСПЕРИМЕНТА: ПОИСК ЭФФЕКТИВНОЙ МОДЕЛИ СТОЙКОЙ ПЕРФОРАЦИИ БАРАБАНОЙ ПЕРЕПОНКИ.....	61

3.1. Общая характеристика техник формирования моделей стойких перфораций барабанной перепонки, исследованных в эксперименте.....	61
3.1.1. Холодная мириготомия с подворачиванием краев.....	61
3.1.2. Лазерная мириготомия.....	62
3.1.3. Холодная мириготомия с подворачиванием краев перфорации, дополненная установкой тимпаностомической трубки.....	63
3.2. Оценка эффективности моделей стойкой перфорации барабанной перепонки.....	64
3.3. Результаты первого этапа эксперимента.....	66
Глава 4. ВТОРОЙ ЭТАП ЭКСПЕРИМЕНТА: ЗАКРЫТИЕ СТОЙКОЙ ПЕРФОРАЦИИ БАРАБАННОЙ ПЕРЕПОНКИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОГО КОНСТРУКТА.....	73
Глава 5. РЕЗУЛЬТАТЫ ПРИМЕНЕНИЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОГО МЕТОДА ЗАКРЫТИЯ СТОЙКОЙ ПЕРФОРАЦИИ БАРАБАННОЙ ПЕРЕПОНКИ.....	79
5.1. Оценка сроков закрытия стойкой перфорации барабанной перепонки.....	79
5.2. Оценка морфологических свойств регенератов барабанной перепонки.....	81
5.3. Оценка локальных механических свойств регенератов барабанной перепонки.....	88
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	99
ВЫВОДЫ.....	115
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	116
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	117
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	118

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Тугоухость, несомненно, является важной медико-социальной проблемой современного здравоохранения. По данным Всемирной организации здравоохранения 2015 года около 5% людей в мире страдают стойким снижением слуха. По данным Министерства Здравоохранения в Российской Федерации в 2011 году зарегистрировано более 140 тысяч пациентов с кондуктивной и нейросенсорной тугоухостью. Основной причиной снижения слуха является нарушение целостности барабанной перепонки вследствие травмы или воспалительного процесса в среднем ухе. Острые перфорации барабанной перепонки часто закрываются спонтанно, однако, в 6% случаев они становятся стойкими, что приводит к постоянному снижению слуха и к развитию хронического воспаления в среднем ухе, которое сопровождается периодическими выделениями из уха, болью в ухе, ушным шумом, головокружением. На кондуктивную и смешанную формы тугоухости, обусловленные заболеваниями среднего уха, приходится около 30%, на сенсоневральную тугоухость - около 70% (Минздрав РФ, 2011). Лечение пациентов со стойкой перфорацией барабанной перепонки на сегодняшний день предполагает выполнение хирургического вмешательства, направленного на восстановление ее целостности. Данная операция относится к высокотехнологичным методам лечения, является дорогостоящей и травматичной, поскольку предполагает взятие аутоканей пациента для пластического закрытия перфорации. При этом, вероятность положительного морфофункционального результата хирургического лечения варьирует от 75% до 92%, зависит от многих факторов, и не исключает возникновения реперфорации барабанной перепонки. В настоящее время, список предложенных в литературе альтернативных методов лечения перфорации барабанной перепонки, достаточно велик. Однако, предлагаемые методы предназначены, в основном, для закрытия лишь острых перфораций небольшого

размера, и в той или иной мере их применение сопровождается различными негативными исходами, такими как отторжение, недостаточная эластичность, непрозрачность. Среди предлагаемых альтернативных методов закрытия дефекта барабанной перепонки наиболее активно изучаются методы тканевой инженерии. Согласно основному принципу тканевой инженерии, для регенерации тканей необходимо взаимодействие трех базовых компонентов: клеток, скаффолда и регуляторных факторов. В зарубежной литературе был проведен ряд исследований, доказывающих эндогенный регенеративный потенциал барабанной перепонки, так в области фиброзного кольца и рукоятки молоточка обнаружены фибробласты. Этот факт позволяет использовать тканевую инженерию *in situ*, то есть использовать лишь два компонента – скаффолд и регуляторный фактор для эффективного закрытия стойкой перфорации барабанной перепонки.

Цель исследования: обоснование в условиях эксперимента возможности применения тканеинженерного подхода с использованием коллагенового скаффолда и фактора роста фибробластов для закрытия стойкой перфорации барабанной перепонки.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Усовершенствовать модель формирования стойкой перфорации барабанной перепонки на малых лабораторных животных.

2. Изучить возможность применения фактора роста фибробластов в сочетании с коллагеновым скаффолдом для закрытия стойкой перфорации барабанной перепонки у малых лабораторных животных.

3. В эксперименте в условиях *in vivo* изучить закрытие стойкой перфорации барабанной перепонки после применения фактора роста фибробластов в сочетании с коллагеновым скаффолдом в сравнении с использованием только коллагенового скаффолда.

4. Оценить строение нативной и восстановленной с помощью тканеинженерного метода барабанной перепонки шиншиллы при помощи гистологического исследования.

5. Методом атомно-силовой микроскопии оценить механические свойства восстановленной с помощью тканеинженерного подхода барабанной перепонки.

Работа выполнена на базе кафедры болезней уха, горла и носа (заведующий кафедрой – д.м.н., профессор Свистушкин В.М.) Института Клинической Медицины имени Склифосовского ФГАОУ ВО Первого Московского Медицинского Университета имени И.М.Сеченова (Сеченовский Университет), а также на базе Института Регенеративной Медицины (директор института – д.х.н., профессор Тимашев П.С.) ФГАОУ ВО Первого Московского Медицинского Университета имени И. М. Сеченова (Сеченовский Университет).

Научная новизна работы

Впервые в Российской Федерации в эксперименте *in vivo* изучено применение основного фактора роста фибробластов в сочетании с коллагеновым скаффолдом для закрытия стойкой перфорации барабанной перепонки.

В рамках данного исследования впервые была сформирована усовершенствованная экспериментальная модель морфологически верифицированной стойкой перфорации.

Впервые по данным отомикроскопии изучено закрытие стойкой перфорации барабанной перепонки после применения сочетания основного фактора роста фибробластов и коллагенового скаффолда в сравнении с использованием только коллагенового скаффолда.

Впервые при помощи гистологического исследования изучено строение восстановленной с помощью сочетания фактора роста фибробластов и коллагенового скаффолда барабанной перепонки шиншиллы.

Впервые методом атомно-силовой микроскопии проведен анализ механических свойств барабанной перепонки, восстановленной с помощью тканеинженерного подхода.

Впервые показана эффективность использования коллагенового скаффолда и фактора роста фибробластов в восстановлении локальных механических свойств барабанной перепонки после закрытия стойкой перфорации.

Теоретическая и практическая значимость работы

Усовершенствованная в ходе исследования экспериментальная модель формирования стойкой перфорации на малых лабораторных животных может быть использована в дальнейшем для преclinical изучения эффективности различных методов закрытия дефектов барабанной перепонки.

Экспериментально доказана возможность применения основного фактора роста фибробластов в сочетании с коллагеновым скаффолдом с целью закрытия стойкой перфорации барабанной перепонки.

Результаты гистологического исследования и атомно-силовой микроскопии наглядно и достоверно демонстрируют, что тканеинженерный подход с использованием основного фактора роста фибробластов является эффективным методом восстановления структуры и локальных механических свойств барабанной перепонки.

Методология и методы исследования

В основе работы лежит экспериментальное исследование эффективности тканеинженерного метода закрытия стойких перфораций барабанной перепонки. Исследование выполнено на лабораторных шиншиллах. Объектом исследования являлась модель стойкой перфорации барабанной перепонки. Всего в исследование было включено 36 стойких перфораций, которые были разделены на три равные группы.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Миринготомия с последующим подворачиванием краев перфорации и установкой вентиляционной трубки на срок 4 недели является эффективным

способом создания адекватной модели стойкой перфорации барабанной перепонки у малых лабораторных животных

2. Применение фактора роста фибробластов в сочетании с коллагеновым скаффолдом является эффективным для закрытия стойкой перфорации барабанной перепонки на экспериментальной модели

Публикации по теме исследования

По результатам исследования автором опубликовано 6 работ, в том числе 1 научная статья в журнале, включенном в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета/ Перечень ВАК при Минобрнауки России, 2 статьи в изданиях, индексируемых в международной базе данных Scopus, 1 обзор в издании, индексируемом в базе данных Scopus, 2 патента.

Внедрение результатов исследования

Разработанная модель, материалы и методы исследования, основные научные положения и выводы исследования используются в научно-исследовательских работах кафедры болезней уха, горла и носа и Института регенеративной медицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова МЗ России (Сеченовский Университет).

Ряд теоретических положений и практических рекомендаций, сформулированных в диссертации, включены в курс лекций и практических занятий для студентов и слушателей факультета последипломного образования ФГАОУ ВО Первого МГМУ имени И.М.Сеченова (Сеченовский Университет).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация «Применение метода тканевой инженерии с использованием фактора роста фибробластов для закрытия стойких дефектов барабанной перепонки» соответствует паспорту специальности 3.1.3. Оториноларингология. Результаты научно-исследовательской работы соответствуют области исследования специальности, конкретно – пунктам 1 (исследования по изучению

этиологии, патогенеза и распространения ЛОР-заболеваний) и 3 (экспериментальная и клиническая разработка методов лечения ЛОР-заболеваний и внедрение их в клиническую практику) паспорта специальности.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность и обоснованность результатов работы основана на подробном обзоре и анализе литературы, посвященной теме диссертации, достаточных размерах экспериментальных групп, четком соблюдении методик исследования, тщательной обработке полученных результатов при помощи современных методов статистической обработки данных. При проверке статистических гипотез критический уровень значимости был выбран на уровне 0,05 ($p < 0,05$). Полученные результаты не противоречат опубликованным данным зарубежных исследований по теме диссертации.

Достоверность первичной документации исследования подтверждена их экспертной оценкой.

Тема работы утверждена – выписка из протокола № 14 заседания учебно-методической конференции кафедры болезней уха, горла и носа лечебного факультета от 24.01.2017, выписка из приказа № 3525/АС-32 О научно-квалификационных работах ФГАОУ ВО Первого МГМУ имени И.М.Сеченова МЗ РФ (Сеченовский Университет)) РФ от 06.10.2016.

Проведение диссертационного исследования одобрено Локальным Этическим Комитетом – протокол № 10-20 от 13.05.2020.

Основные положения и результаты работы доложены и обсуждены на: Всероссийском конгрессе «Наука и практика в оториноларингологии» (Москва, 2019 г.), Научно-практической конференции оториноларингологов ЦФО «Современные вопросы оториноларингологии» (Ярославль, 2019 г.), Конференции CEORL-HNS (Брюссель, 2019 г.), Научно-практической конференции «Современные вопросы оториноларингологии» (Тула, 2019 г.), VIII Петербургском форуме оториноларингологов России (Санкт-Петербург, 2019г.), XX Съезде оториноларингологов России (Москва, 2021 г.).

Личный вклад автора

Автором проведен анализ литературы, изучена степень разработанности и обоснована актуальность работы. Автор принимал непосредственное участие во всех этапах проведения исследования, в том числе самостоятельно проводил эксперименты, связанные с хирургическими методами на малых лабораторных животных. Диссертант лично проводил сбор материала, его анализ и статистическую обработку данных. Основные результаты исследования оформлены диссертантом в виде публикаций, патентов на изобретения, а также доложены на российских и международных конференциях.

Объём и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы, посвященной общей характеристике проведенной работы и описания использованных методов исследования, двух глав собственных экспериментальных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и библиографического списка используемой литературы.

Работа изложена на 143 страницах машинописного текста, содержит 11 таблиц и 30 рисунков. Указатель литературы содержит 243 наименований источников, из них 61 работ на русском языке, 182 на иностранных языках.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Медико-социальные аспекты стойкой тугоухости

Слух является неотъемлемой частью полноценного взаимодействия человека в социальной среде. В современном мире слабослышащий человек испытывает существенный дискомфорт, в связи с невозможностью полноценного восприятия обилия поступающей звуковой информации [243].

Тугоухость является важной медико-социальной проблемой современного здравоохранения. По статистическим данным Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) за последние 5 лет наблюдается значительное увеличение числа людей со стойким снижением слуха. Так, в 2015 году в мире насчитывалось около 275 миллионов, а в 2020 году уже 466 миллионов людей (из них 34 миллиона детей) страдающих стойкой тугоухостью. По предварительным прогнозам ВОЗ, к 2050 году эта цифра увеличится до 900 миллионов человек. При этом, под стойким снижением слуха подразумевается повышение порогов восприятия звука более, чем на 40 дБ на лучше слышащем ухе у взрослого и на 30 дБ и более у детей. По данным ВОЗ количество молодых людей трудоспособного возраста, находящихся в группе риска потери слуха, достигает 1,1 миллиарда [243].

На современном этапе рост тугоухости обусловлен не только увеличением продолжительности жизни, или так называемым «старением популяции», но и увеличением воздействия пагубного шума и звуков излишней громкости на людей активного возраста [39].

Термином тугоухость обозначают нарушение слуха, варьирующее от субъективного ощущения заложенности уха до полной потери слуха. Существует множество различных классификаций степеней тугоухости. В 2008 году ВОЗ была предложена классификация, основанная на определении среднего порога на четырех частотах (0,5, 1, 2 и 4 кГц) для лучше слышащего уха. Согласно данной классификации, выделяют четыре степени тугоухости [8].

В зависимости от того, нарушено звукопроведение или звуковосприятие, выделяют кондуктивную и сенсоневральную тугоухость, при их сочетании говорят о смешанной форме. К сенсоневральной тугоухости приводит патология внутреннего уха и слухового нерва. Лечение пациентов с данной патологией предполагает системное и местное применение препаратов, улучшающих кровоснабжение и обмен веществ внутреннего уха, а также реабилитацию, в том числе использование слуховых аппаратов [52, 59]. Причины кондуктивной тугоухости можно разделить на патологию наружного и среднего уха. В частности, звукопроведение может быть нарушено ввиду выраженного отека кожи слухового прохода, нарушения целостности или наоборот, утолщения барабанной перепонки, а также нарушения ее подвижности, наличия патологического экссудата в барабанной полости, нарушения подвижности или целостности цепи слуховых косточек [52].

Наиболее распространена среди взрослого населения сенсоневральная тугоухость, доля которой увеличивается у людей пожилого возраста [23, 75]. Далее по частоте встречаемости среди взрослых - стойкая кондуктивная тугоухость.

В детской популяции ведущей причиной нарушения звукопроведения, как правило, служит экссудативный средний отит. В то же время, у взрослых наиболее часто кондуктивная тугоухость бывает вызвана нарушением целостности барабанной перепонки или цепи слуховых косточек вследствие хронического среднего отита [1, 11, 24, 27, 39, 52, 60, 172]. Острые перфорации барабанной перепонки нередко закрываются самостоятельно, всё же, по разным данным в 6-24 % случаев становятся стойкими [73, 227, 230]. Наличие стойкого дефекта барабанной перепонки приводит к снижению слуха и развитию хронического воспаления в среднем ухе, которое сопровождается отореей, иногда, болью в ухе, головокружением, ушным шумом [39, 52].

В России распространенность хронического гнойного среднего отита (ХГСО) составляет в среднем 31,8 случаев на 1000 взрослого населения, а в различных возрастных группах — от 15,3 до 52,0 или 0,8—1% среди всего населения [56].

В Центральном Федеральном округе России в 2018 году в структуре заболеваемости по данным оториноларингологических стационаров было зарегистрировано 37861 случаев госпитализации пациентов с заболеваниями среднего уха (в эту группу входят хронический средний отит и его осложнения), при этом летальность в этой группе составила 19 пациентов, из которых 17 случаев приходилось на послеоперационную летальность [56].

По современным представлениям стойкое нарушение целостности барабанной перепонки является хирургической оториноларингологической патологией [20, 22, 28, 61]. В настоящее время лечение пациентов со стойкой перфорацией предполагает выполнение хирургического вмешательства, направленного на ее закрытие барабанной перепонки – мирингопластики или тимпанопластики [20, 22, 39, 52].

Тимпанопластика предполагает помимо восстановления целостности барабанной перепонки, ревизию барабанной полости. Закрытие перфорации барабанной перепонки в данном случае подразумевает использование аутоканей пациента, наиболее часто фасции височной мышцы, перихондрия, истонченного хряща. Ввиду особенностей закрытия дефекта, таких как отсутствие швов и иной фиксации ауотрансплантата в ходе операции, в послеоперационном периоде предполагается длительная тампонада наружного слухового прохода (в среднем около 14 дней), которая должна обеспечить васкуляризацию трансплантата и его приживание [10, 33, 40]. Вероятность положительного морфофункционального результата хирургического лечения по данным литературы существенно варьирует. Так, по данным Сауе-Thomasen и соавт., положительные результаты мирингопластики отмечены в 94% случаев, в то же время Onal и соавт. описывают положительный результат в 65.9% операций с использованием фасции височной мышцы и в 92.3% случаев использования хряща [82, 180]. В серии клинических наблюдений, включающей 140 пациентов, авторы указывают на отсутствие реперфораций после 88% мирингопластик [92]. В целом, по данным зарубежных авторов частота реперфораций варьирует от 67% до 98% [74, 106, 119, 122, 207], в отечественной литературе говорится о 43-98 % [12, 34, 35, 58].

Эффективность хирургического лечения зависит от многих факторов, в том числе толщины используемого трансплантата, опыта хирурга, тщательности дезэпидермизации краев дефекта, и не исключает возникновения реперфорации барабанной перепонки [16, 43, 217]. Даже, несмотря на стремительное развитие инструментария и увеличение количества описанных техник закрытия стойких перфораций барабанной перепонки, необходимость в повторных операциях на среднем ухе возникает, по данным разных авторов, в 15–67 % всех случаев, поддерживая тем самым актуальность дальнейшего поиска альтернативных способов лечения тугоухости [3, 5, 38, 42, 183].

1.2. Морфологические и механические характеристики барабанной перепонки и их влияние на слух

Ухо - сложная биомеханическая система, направленная на обеспечение восприятия звуков. Человек способен воспринимать звуки в частотном диапазоне от 20 Гц до 20 кГц, и в диапазоне давления от 10^{-5} Па (порог тишины) до 10^2 Па (порог боли) [39, 52, 227].

Звук, как известно, представляет собой упругую волну механических колебаний, распространяющихся в твердой, жидкой или газообразной среде. Распространение звука в среде происходит по типу механической волны - давления и разрежения. Соответственно, такое колебание может быть описано изменением значений давления во времени [161].

В газообразной среде звук распространяется со скоростью 343 м/с при температуре 20,3 С и давлении 1 атм [55]. Согласно этим показателям у млекопитающих эволюционно возникло особое строение ушной раковины и наружного слухового прохода, позволяющее лучше улавливать звуковые волны и передавать их далее в среднее ухо [53]. Также стоит отметить, что у человека давление воздуха в полостях среднего уха в норме несколько ниже атмосферного.

Возникающий при этом градиент давления поддерживает барабанную перепонку в оптимально натянутом состоянии для лучшего улавливания звуковых колебаний [214].

В настоящее время в литературе представлено множество работ, посвященных описанию структуры барабанной перепонки человека и животных [112, 140, 151, 161, 191]. Существенные различия в ее строении определяются взаимосвязью между морфологическими и механическими параметрами барабанной перепонки, которая, фактически, по-своему настроена на восприятие звуковых колебаний определенных частот у разных видов в различной среде [109, 112].

Chole и соавт. в своей работе, сравнивая гистологические особенности барабанной перепонки человека, собаки, кошки, кролика, морской свинки и крысы, пришли к выводу, что имеющиеся отличия не влияют на риски развития ретракционных карманов и холестеатомы [88].

Барабанная перепонка, трансформируя звуковую волну в механическую вибрацию, играет ключевую роль в звукопроведении, так как представляет собой своеобразную границу между наружным и средним ухом. Для более подробного понимания механизма восприятия звуков стоит обратиться к описанным теориям происхождения слуха. Наиболее старая из них – резонаторная теория Гельмгольца (1868) [118]. Автор предположил, что барабанная перепонка служит своеобразным резонатором, который способствует усилению и передаче звуковых колебаний в среднее ухо. Процесс восприятия звуков складывается из трансформации механической энергии звуковых волн в биомеханический сигнал, который стимулирует специфические рецепторы, создающие нервный импульс. Этот процесс начинается с колебания барабанной перепонки под воздействием акустического давления. Колебательные свойства барабанной перепонки (БП) в свою очередь напрямую зависят от ее структуры и целостности [125].

Помимо прочего, наклонное положение барабанной перепонки позволяет получить для восприятия колебаний площадь, большую, чем площадь сечения наружного слухового прохода. У человека БП располагается под углом 140° к задне-верхней стенке и 30° к передне-нижней стенке слухового прохода. Это,

безусловно, затрудняет возможность исследования ее физических параметров *in vivo*, так как для физических измерений вязко-упругих параметров, любые подводимые к перепонке датчики должны располагаться перпендикулярно [103].

По периферии барабанная перепонка прикрепляется непосредственно к стенкам барабанной полости, на большей части своей окружности посредством фиброзного кольца, так называемой аннулярной связки [68]. Эта связка представляет собой фиброзное утолщение, вплетающееся в костное кольцо, за исключением верхних отделов, где она разделяет две части БП – ненатянутую и натянутую, именуемые некоторыми зарубежными авторами «субмембранами» [63]. Натянутая часть барабанной перепонки представляет собой многослойную мембрану, по форме близкую к кругу или эллипсу. Размеры ненатянутой части относительно натянутой существенно варьируют у разных видов млекопитающих [231]. У человека ненатянутая часть существенно меньше натянутой и отличается от нее по строению и функции [112, 109]. Механически, ненатянутая часть более податлива внешним воздействиям, поэтому ретракционные карманы при нарушении вентиляции среднего уха, чаще возникают именно в этом отделе [67].

Барабанная перепонка прикрепляется к рукоятке молоточка, причем эта фиксация наиболее прочная в области латерального отростка и пупка, на остальном протяжении перепонка может быть отсепарована без особых усилий [100].

По своей форме барабанная перепонка приближается к овалу, при этом в поперечном сечении она имеет вид конуса, вершина которого направлена к медиальной стенке барабанной полости. Вертикальный размер барабанной перепонки варьирует от 8,5 мм до 10 мм, горизонтальный – от 8 до 9 мм, среднее значение общей площади поверхности составляет 85 мм² [104].

Барабанная перепонка состоит из трех слоев: внутреннего эпителиального, наружного эпидермального и среднего – фиброзного (соединительнотканная собственная пластинка) [94, 125]. Тонкий эпидермальный слой, являющийся продолжением кожи наружного слухового прохода, представляет собой типичный ороговевающий эпителий и состоит из 4 слоев клеток разных типов [2, 161]. Эпителиальный слой представлен тонким монослоем клеток.

Как в натянутой, так и в ненапрянутой части барабанная перепонка состоит из эпидермального слоя, собственной пластинки и слизистого эпителиального слоя [104]. Однако, фиброзный слой в ненапрянутой части практически не выражен и представлен собственной пластинкой, поэтому многие авторы в этой части перепонку именуют двухслойной. Кровоснабжение и иннервация, а также клеточное строение и молекулярные аспекты собственной пластинки подробно описаны Lim и соавт. в 1995 г. [161].

Согласно гистологическому анализу в натянутой части барабанной перепонки наружный эпидермальный слой представлен кератиноцитами, средний фиброзный слой содержит фибробласты и коллаген II и III типа, внутренний эпителиальный представлен плоским неороговевающим эпителием [161]. Фиброзный слой барабанной перепонки представлен плотной соединительной тканью, которая состоит в основном из волокон и небольшого количества фибробластов - клеток вытянутой формы. Фибробласты синтезируют тропоколлаген, предшественник коллагена и основное вещество соединительной ткани - аморфное желеподобное вещество, заполняющее пространство между клетками и волокнами соединительной ткани. Фибробласты и макрофаги в случае повреждения способны мигрировать к пораженным участкам тканей и участвовать в их заживлении. В результате дифференцирования фибробласты превращаются в менее активные зрелые клетки – фиброциты [142].

Механические параметры барабанной перепонки, такие как упругость и эластичность, определяются средним фиброзным слоем барабанной перепонки, в котором также можно выделить два подслоя в зависимости от направления волокон [4, 227]. Внутренние волокна направлены циркулярно и представлены в основном коллагеном III типа, а наружные - радиально направленные, состоят в основном из коллагена II типа [4, 162]. Барабанная перепонка не является однородной структурой, ее толщина, по данным различных авторов, варьирует от 30 до 150 мкм [227]. Все исследователи сходятся в верности закономерности, что толщина барабанной перепонки всегда нарастает от периферии к пупку; соответственно, толщина волокон изменяется таким же образом [162].

Так, в натянутой части различимы два субэпидермальных соединительнотканых слоя, между ними два слоя коллагеновых волокон – радиально и циркулярно направленный. Радиальные волокна более выражены у рукоятки молоточка, в которую они вплетаются, в то время как циркулярные волокна толще по периферии барабанной перепонки [162].

Собственная пластинка в ненатянутой части барабанной перепонки представлена рыхлой соединительной тканью, состоящей в основном из коллагеновых волокон и в меньшей степени эластиновых [142]. Модуль упругости волокна коллагена, согласно данным литературы, составляет 1.5 ГПа [44]. Некоторыми авторами выполнены измерения молекул отдельных типов коллагена, так для II и III типа получены значения модулей упругости в интервале 3.0-5.1 ГПа [198].

Эти коллагеновые волокна определяют вязко-упругие свойства барабанной перепонки [91]. Последние, в свою очередь, характеризуют механику барабанной перепонки, а название этих свойств обусловлено тем, что биологические «мягкие» ткани наряду с упругостью, обладают вязкостью [26]. Данное свойство отличает механические свойства живых тканей от искусственных полимеров.

Важным параметром, определяющим колебательную способность барабанной перепонки, является ее толщина, так как именно она определяет распределение массы на быстро вибрирующей перепонке и влияет на эффективную жесткость [6]. В настоящее время точных данных относительно распределения толщины барабанной перепонки по ее поверхности в литературе не много [155]. Первые измерения принадлежат Коуо (1954), который получил данные, варьирующие от 30 до 120 мкм. [154] Для измерения толщины вплоть до 90-х гг XX столетия использовалась световая и электронная микроскопия, в литературе представлены работы с описанием небольшого количества срезов изъятых и обработанных барабанных перепонок. [80, 137, 150, 160, 190, 199, 222] Однако, полученные таким образом данные существенно варьируют, что может быть следствием значительного изменения свойств барабанной перепонки в процессе подготовки образцов. Относительно недавно Kuipers и соавт. опубликовали

экспериментальное обоснование метода конфокальной микроскопии, позволяющего получать карту распределения толщины по поверхности нативной барабанной перепонки на кошках [155]. Позднее теми же авторами были проведены первые измерения на трех образцах барабанных перепонки человека, при этом среднее значение толщины существенно варьировало (40, 50 и 120 мкм), что еще раз подчеркивает невозможность выделения единого нормального значения для этого показателя. Тем не менее, авторы обозначили общие тенденции распределения толщины, характерные для всех исследованных образцов. Так, согласно данным литературы, барабанная перепонка имеет наибольшую толщину в задне-нижнем квадранте, наименьшую - в передне-верхних отделах [155].

Другим важным механическим параметром при исследовании барабанной перепонки является амплитуда колебаний при внешнем воздействии звука, то есть ее непосредственная подвижность. Анатомически подвижность барабанной перепонки определяется подвижностью цепи слуховых косточек, а также состоянием самой перепонки, ее толщиной и структурой. Так, например, присутствие кальцинатов или участков фиброза уменьшают подвижность барабанной перепонки [63]. К наиболее ранним методам измерения колебаний перепонки относится голографическая интерферометрия, практически вытесненная в дальнейшем методами компьютерного моделирования. Полученные с использованием метода конечных элементов данные существенно варьируют от 10 до 100 нм при воздействии звуков различной частоты и громкости [63]. Учитывая находящиеся в нанометровом диапазоне незначительные смещения барабанной перепонки при воздействии на нее звука, известные контактные методы определения амплитуды являются менее точными по сравнению с лазерной доплеровской виброметрией [236]. Данный метод исследования основан на принципе лазерного автодина – изменение работы резонаторов при попадании в него отраженного рассеянного излучения от биоткани [19]. Преимущества и точность использования лазерного автодина продемонстрирована и в работе российских ученых, изучивших колебательную способность барабанной перепонки человека в норме и при патологии [19]. Основываясь на полученных

результатах авторы делают выводы о том, что колебательная способность барабанной перепонки существенно изменяется у пациентов с хроническим средним (перфоративным) отитом, коррелируя с размерами дефекта перепонки. У пациентов с нормальной аудиограммой при небольших перфорациях получены нормальные показатели по данным виброметрии. При наличии больших перфораций (более 25% площади) отмечено существенное повышение колебательной способности барабанной перепонки у пациентов, несмотря на наличие кондуктивной тугоухости по данным аудиометрии. Авторы работы делают вывод о том, что снижение слуха в этом случае обусловлено не нарушением целостности перепонки, а отсутствием градиента давления при воздействии звука [19].

Существенные различия в получаемых значениях, трудности их интерпретации и сложность проведения измерений барабанной перепонки *in situ* привели к поиску альтернативных методов исследования биомеханики барабанной перепонки. На современном этапе, широкое распространение получило создание компьютерных моделей вибрирующей барабанной перепонки с последующим применением метода конечных элементов для вычисления необходимых механических параметров [63].

Для расчета механических параметров неоднородных (негомогенных) материалов часто используется макро- и микромоделирование. Оба подхода ориентированы на использование метода конечных элементов и вычислительной техники [65, 178]. На первый взгляд, учитывая неоднородность барабанной перепонки такой метод выглядит идеальным для расчета ее механических параметров [63].

Своего рода первооткрывателями в этой области стали Funnell and Laszlo (1978) [109]. За последние 15 лет с развитием компьютерных технологий и совершенствованием программного обеспечения создаваемые модели стали более точно передавать свойства объекта. Примеры моделей нормальной барабанной перепонки человека описаны в многочисленных работах различных авторов [98, 110, 153, 157, 220, 233, 238, 242].

Однако, при изучении динамической компьютерной модели перепонки не стоит забывать о том, что ответные изменения свойств такой модели зависят от множества входящих данных, некоторые из них не до конца изучены [63]. Так, например, справедливо предположить, что ответ модели среднего уха во многом будет зависеть от эластических свойств барабанной перепонки, с другой стороны согласно результатам многочисленных работ с использованием моделирования наблюдается значительный разброс параметров эластичности барабанной перепонки даже среди представителей одного вида [65, 178]. Также следует помнить, что механические параметры вибрирующей барабанной перепонки при воздействии на нее звука, определяются не только физическим ее состоянием, но зависят также от фиксации в костном кольце наружного слухового прохода и цепи слуховых косточек, а также от состояния полости среднего уха.

В своем критическом обзоре литературы Volandri (2011) приходит к следующему выводу, «большое разнообразие возможных дизайнов построения моделей приводит к широкому разбросу получаемых результатов, что диктует необходимость дальнейшей стандартизованной экспериментальной работы по изучению свойств барабанной перепонки» [63].

Для описания механических свойств барабанной перепонки могут использоваться различные параметры – жесткость, прочность, кривая растяжение-разрыв [63]. Наиболее обобщенным показателем упругости для оценки вязко-эластических свойств ткани является модуль Юнга (модуль упругости) [76]. При этом, в литературе описывают два варианта измерения данного параметра – параллельно (in-plane) и перпендикулярно (out-of-plane) плоскости барабанной перепонки [63, 172]. В первом случае, модуль упругости измеряется с помощью теста на растяжение-разрыв и, как правило, для выполнения данного исследования используются предварительно вырезанные полоски барабанной перепонки. Для получения модуля упругости в перпендикулярной плоскости, или «по толщине» (through-thickness), используются различные варианты индентирования [125].

Первый труд, посвященный изучению эластических свойств барабанной перепонки, принадлежит Bekesy (1960 г), который получил значения среднего

модуля упругости 20 МПа. [228] Примерно в то же время другим коллективом авторов получены значения модуля Юнга 40 Мпа при измерении предварительно вырезанной полоски барабанной перепонки [149]. Позднее, с помощью методики одноосного натяжения были изучены вязко-эластические свойства различных «мягких» биологических тканей, в том числе барабанной перепонки, при выполнении теста предела прочности получены значения модуля упругости - 23 Мпа [93]. Модуль Юнга барабанной перепонки по плоскости определялся по релаксации при растяжении на разрыв прямоугольных образцов, предварительно вырезанных из барабанных перепонки в радиальном направлении.

Huang G. и соавт. также проводили измерения модулей упругости по плоскости на нескольких барабанных перепонках, и получили схожие значения, варьирующие в пределах 26-38 МПа [125].

В другой работе Люо и соавт. проводили тесты растяжения на разрыв в радиальном и кольцевом направлениях с получением следующих значений модуля Юнга – 45-59 МПа и 34-57 МПа, соответственно [167].

В рамках своей докторской диссертации Jef Aernouts (2012) подробно изучал эластические параметры структур среднего уха и барабанной перепонки у человека и грызунов [63]. По заключению автора, наиболее часто используемая методика проведения прямых механических исследований вырезанной полоски перепонки не является достоверной. Наиболее приемлемым и точным является метод индентирования барабанной перепонки, позволяющий получать значения модуля упругости перпендикулярно плоскости. Aernouts и соавт. использовали индентацию *in situ* для вычисления толщины барабанной перепонки и модуля Юнга на свежемороженой аутопсийной височной кости. В ходе измерений на трех разных образцах были получены следующие параметры: среднее значение модуля Юнга - 2.1 МПа, 4.4 МПа и 2.3 МПа [63]. Значения толщины барабанной перепонки, полученные с разных точек одного образца были практически одинаковыми, что противоречит данным в аналогичных публикациях [154, 155]. Возможно, это связано с небольшой площадью перепонки, доступной для индентации при условии

проведения исследований *in situ*. При этом, значения модуля Юнга увеличиваются прямо пропорционально увеличению толщины материала, но незначительно.

Авторами также отмечено значительное различие между показателями модуля Юнга песчанок и человека, большие показатели у грызунов, по заключению авторов, обеспечивают механические свойства, более подходящие для лучшего восприятия высоких частот [64].

В другой работе при измерении модуля упругости по толщине получены данные 2-15 МПа, при этом авторы уточняют, измерения проводились лишь с медиальной поверхности барабанной перепонки без удаления эпителиального слоя [91].

Очевидно, нормальное функционирование барабанной перепонки напрямую зависит от ее колебательной способности, которая определяется физическими свойствами фиброзного слоя барабанной перепонки [4]. Опираясь на данные литературы, можно сделать вывод о сложности проведения физических измерений биологических тканей в целом, и барабанной перепонки, в частности [63, 91, 227]. Так, значения модуля упругости отдельно взятой молекулы коллагена были представлены в литературе уже в 1996 году, и в целом не сильно отличаются от данных более современных исследований [26, 44, 198]. В отличие от представленных в литературе значений модуля упругости барабанной перепонки, которые существенно варьируют [64, 125, 167, 168, 189, 212].

Выполнение измерений *in situ* осложняется необходимостью доступа к барабанной перепонке через наружный слуховой проход, а также расположением под непрямым углом к вводимому датчику.

1.3. Эволюция хирургических способов закрытия стойких перфораций барабанной перепонки

В 1640 году первую попытку закрытия перфорации барабанной перепонки осуществил Banzer, использовавший трубку, дистальный конец которой был покрыт фрагментом стенки свиного мочевого пузыря и вставлялся в наружный слуховой проход [212]. Современный термин мирингопластика, как и приближенная к современной операции процедура были описаны Berthold в 1878 году. Для закрытия перфорации он использовал свободный кожный лоскут с предплечья [144]. В 1952 году Wullstein предложил термин тимпаноластика и подробно описал в своей работе различные ее типы в зависимости от уровня повреждения звукопроводящей цепи, при этом в качестве графта автор также использовал свободный кожный лоскут [240]. Другой немецкий отоларинголог Zoellner в 1955 году описал тимпаноластику с использованием перемещенного кожного лоскута слухового прохода на питающей сосудистой ножке [243]. Большинство неудачных исходов тимпаноластики, по данным Zoellner, были связаны со втяжением лоскута к медиальной стенке. Для предотвращения таких осложнений автором была предложена оригинальная техника тампонирования мезо- и гипотимпанума барабанной полости шелковой нитью, дистальный конец которой выводился с помощью тонкого катетера через слуховую трубу, носо- и ротоглотку и фиксировался на щеке, а спустя 2 недели тампонада вытягивалась.

Первоначально для замещения дефекта барабанной перепонки использовались кожные лоскуты, как свободные, так и перемещенные.

Сравнительный анализ эффективности использования различных кожных аутографтов провели House и соавт. в 1961 году [124]. Пациенты, включенные в исследование, были распределены на три группы в зависимости от используемых графтов. В первой группе применяли цельный кожный трансплантат из заушной области, во второй группе – истонченный кожный трансплантат с предплечья, а в третьей – кожа наружного слухового прохода. Согласно результатам проведенного

исследования, использование меатального кожного лоскута приводило к наилучшему заживлению и более эффективному закрытию перфорации [124].

Кожные трансплантаты обладают очевидными недостатками, такими как наличие волосяных фолликулов и сальных желёз, чрезмерная толщина, плохая приживляемость [71]. Тем не менее, в большинстве случаев вплоть до 60-х годов XX века в отохирургии использовались именно аутоотрансплантаты из кожи. Неудовлетворительные отдаленные результаты их использования обозначили необходимость поиска других соединительнотканых графтов.

Одним из первых был описан жировой аутоотрансплантат. Преимуществами этого графта являются легкость взятия материала, в том числе большого объема ткани, однако описан существенный недостаток - быстрая резорбируемость жира с неконтролируемым замещением его рубцовой тканью. Помимо прочего использование жирового трансплантата существенно лимитирует размеры перфорации, которые могут быть эффективно закрыты [225]. На сегодняшний день жировая ткань в качестве аутоотрансплантата используется в основном для миринопластики при острых центральных перфорациях небольшого размера [62, 156].

Впервые в качестве хрящевого трансплантата для тимпаноластики в 1964 году был использован фрагмент четырехугольного хряща перегородки носа [192]. Основная идея использования хрящевой ткани заключалась в создании прочного каркаса при закрытии дефектов большого размера. Однако, использование четырехугольного хряща требовало дополнительной, не всегда обоснованной, резекции перегородки носа, также ввиду недостаточной податливости и гибкости гиалинового хряща было не совсем удобным в микрохирургической практике и приводило к неудовлетворительным функциональным результатам. Эластичный хрящ с козелка ушной раковины начали использовать в качестве трансплантата для закрытия перфораций барабанной перепонки с 1964 года [117]. При этом взятие материала осуществляли по методике, ранее описанной отохирургом Goodhill (1961), который сохранял перихондрий на одной поверхности хряща и использовал такой аутографт для пластики овального окна в стапедиальной хирургии [117].

В литературе также встречаются единичные сообщения об использовании других соединительнотканых аутотрансплантатов, в том числе широкой фасции бедра, венозной стенки, периоста, которое не нашло широкого применения в тимпанопластике [202, 243].

Другой распространенный в современной отохирургии соединительнотканый графт – фасциальный, впервые был описан в 1959 году, согласно предложенной Ortegren методике, забор поверхностной фасции височной мышцы производили в вентральной части, где апоневротические волокна были наиболее выражены [108].

Наиболее часто используемые на современном этапе аутотрансплантаты в отохирургии – фасция височной мышцы, хрящ и надхрящница.

Уже в 1968 году в Швеции было проведено первое крупное сравнительное многоцентровое клиническое исследование эффективности мирингопластики при использовании различных аутотрансплантатов [203]. Всего авторы изучили результаты 232 операций, из них 79 с использованием кожного аутотрансплантата, 74 – фасции височной мышцы, 79 – хондроперихондрия. По заключению авторов, функциональные результаты, в том числе сокращение костно-воздушного интервала, во всех трех группах были сопоставимы. Самый высокий показатель эффективности закрытия перфорации наблюдался в группе тимпанопластики хондроперихондрием (61%) [203]. По данным других авторов, средние значения эффективности закрытия стойких перфораций барабанной перепонки фасцией височной мышцы составляют по данным литературы 93-97 % [203].

В 2016 году опубликован мета-анализ сравнительных исследований эффективности тимпанопластики с использованием хряща и фасции височной мышцы [130]. Авторы проанализировали 11 проспективных и 26 ретроспективных исследований, которые включали в сумме 3606 пациентов. Статистически значимых различий в эффективности закрытия перфораций в группах отмечено не было, так же, как и в количестве случаев послеоперационного сохранения костно-воздушного интервала до 10 dB. Однако, средние значения послеоперационных аудиологических показателей в группе фасции височной мышцы были лучше. Показатели успешного приживления лоскута в группе хрящевой и фасциальной

тимпанопластики составили 92% и 82% соответственно. При этом в группе тимпанопластики с использованием хряща наилучшее приживление трансплантата наблюдалось при использовании палисадной техники [130].

Данные о возможности укрепления атрофичной барабанной перепонки фасцией височной мышцы или перихондрием не нашли подтверждения в проведенных клинических исследованиях [76]. Ни один из этих трансплантатов не является достаточно надёжным для использования в случае дисфункции слуховой трубы. Несмотря на лучшие функциональные результаты, эффективное применение этих графтов возможно только в случае хорошей вентиляции среднего уха, которая чаще всего страдает у пациентов с хроническим средним отитом [92].

Хрящевые ауто трансплантаты отличает высокая прочность и возможность закрытия больших дефектов, к ограничениям можно отнести недостаточную податливость и гибкость [80, 176, 239]. В свою очередь, перихондрий и фасция височной мышцы по своим механическим параметрам более близки к ткани барабанной перепонки, что несомненно важно для достижения адекватного функционального результата [218]. Однако, их чрезмерная податливость повышает риск развития ретракционных карманов и реперфораций [92].

В отечественной и зарубежной литературе представлено множество техник мирингопластики и тимпанопластики с использованием различных графтов.

Несмотря на широкое внедрение микроскопов и совершенствование инструментария оториноларингологических стационаров на современном этапе, тимпанопластика остаётся хирургическим вмешательством, доступным далеко не во всех учреждениях.

Любой дефект барабанной перепонки должен быть закрыт для восстановления нормальной функции звукопроводения и для профилактики развития среднего отита и холестеатомы. На сегодняшний день, пул описанных хирургических методик тимпанопластики с использованием аутографтов достаточно велик. Согласно классификации, опубликованной Tos в 2008 году, можно выделить 6 основных групп, в которые распределены 23 известные методики тимпанопластики с использованием хряща [216]. Несмотря на достаточно высокий уровень

эффективности закрытия перфораций, тимпаноластика, как высокотехнологичное хирургическое вмешательство, является дорогостоящей процедурой, требующей длительного пребывания пациента в стационаре для уменьшения риска развития возможных осложнений, среди которых - повреждение лицевого нерва, формирование ретракционного кармана, реперфорация. Более того, во многих развивающихся странах, в которых недоступно выполнение высокотехнологичных операций, в том числе тимпаноластики, отмечается более высокий уровень распространенности хронического среднего отита [126]. Таким образом, на современном этапе становится актуальным поиск новых способов закрытия перфораций барабанной перепонки, альтернативных доступным хирургическим методам [47].

1.4. Тканеинженерный подход к закрытию стойких перфораций барабанной перепонки

Среди предлагаемых альтернативных методов лечения пациентов со стойкими перфорациями барабанной перепонки в последнее время активно изучаются методы тканевой инженерии [120, 163, 169, 215, 226]. Согласно основному принципу тканевой инженерии, для регенерации тканей необходимо взаимодействие трех базовых компонентов: мультипотентных клеток, скаффолда и регуляторных факторов. В литературном обзоре, опубликованном в 2013 году, авторы сообщают о том, что число опубликованных работ, посвященных закрытию стойких перфораций барабанных перепонки с использованием тканеинженерных подходов за последние 5 лет превышает 70 [215]. Среди них преобладают работы с использованием скаффолдов и регуляторных факторов, лишь около 15 экспериментальных работ посвящены клеточным технологиям [226].

Скаффолд представляет собой соединительнотканый матрикс, обеспечивающий механический каркас для клеток и участвующих в регуляции

дифференцировки клеток [177]. Сcafолды в свою очередь подразделяются на биodeградируемые и биостаbильные. Важным фактором для регенерации является соответствие биомеханических параметров используемого скафолда параметрам межклеточного матрикса восстанавливаемой ткани. Так, например, для восстановления менее упругих тканей могут использоваться гелеобразные формы скафолда [204]. Чаще всего для закрытия перфораций барабанной перепонки применяются скафолды на основе коллагена [215].

Коллаген составляет около 30% от общей массы белка в организме. К основным достоинствам коллагена как биоматериала для репарации тканей относят его низкую токсичность и антигенность, высокую механическую прочность и устойчивость к тканевым протеазам, а также трофическую функцию [31].

Основное разнообразие описанных в литературе тканеинженерных методик сводится к использованию различных регуляторных и ростовых факторов. В некоторых работах, такие вещества используются изолированно в форме специальных капель, в других являются лишь частью тканеинженерного конструкта.

Выделяют три основные проблемы, препятствующие регенерации барабанной перепонки: отсутствие структурной опоры, недостаточный ангиогенез, дефицит межклеточного матрикса, который ведёт к недостаточной клеточной адгезии [226].

Тканевая инженерия - подход к созданию имплантируемых тканей и органов, использующий фундаментальные структурно-функциональные взаимодействия в нормальных и патологически измененных тканях при создании биологических заместителей для восстановления или улучшения функционирования тканей. Тканеинженерные конструкции представляют собой биомедицинский клеточный продукт, в классическом варианте состоящий из клеток (клеточных линий), биосовместимого материала (сcafолдда) и вспомогательных веществ (регуляторных факторов), и означают любой биомедицинский клеточный продукт, который состоит из клеточной линии (клеточных линий) и биосовместимого материала[163].

В целом тканевая инженерия оперирует двумя возможными подходами: «*in vitro*», предполагающий создание готового конструкта в специальных тканевых культурах и биореакторах, и «*in vivo*» [163]. Согласно основным канонам регенеративной медицины, восстановление барабанной перепонки может быть достигнуто тремя способами: 1) создание на основе скаффолда, факторов роста и стволовых клеток конструкта для последующего закрытия дефекта; 2) введение в дефект скаффолда с последующим нанесением факторов роста в форме капель; 3) введение в дефект скаффолда, предварительно пропитанного раствором факторов роста [129].

В зарубежной литературе был проведен ряд исследований, доказывающих эндогенный регенеративный потенциал барабанной перепонки. Так, согласно данным Knutsson и соавт., в области фиброзного кольца барабанной перепонки и рукоятки молоточка обнаружены фибробласты [129]. По данным другого исследования отмечается повышенное содержание мезенхимальных стволовых клеток и маркеров пролиферации (цитокератин 19 (СК19), интегрин b1 (ING b1) и Ki-67) вокруг острой перфорации барабанной перепонки [148]. Этот факт позволяет воспользоваться методикой тканевой инженерии *in situ*, то есть использовать лишь два компонента – скаффолд и регуляторный фактор для эффективного закрытия стойкой перфорации барабанной перепонки [215].

Несмотря на внутренний потенциал, процессы регенерации в барабанной перепонке несколько отличаются от таковых в других тканях, что обусловлено отсутствием опоры для миграции эпителиальных клеток [164]. Именно по этой причине, цель хирургических вмешательств, направленных на закрытие перфораций барабанной перепонки, заключается в воссоздании опоры посредством использования различных доступных аутоканей пациента (фасции, хряща, перихондрия) [52]. Тканеинженерный подход сфокусирован на поиске новых материалов, близких по механическим свойствам к барабанной перепонке, и их использования в качестве скаффолдов, для достижения лучшей регенерации [163]. Среди известных скаффолдов можно выделить децеллюляризованные ткани, биоматериалы и полимеры.

Децеллюляризованные ткани получают посредством удаления клеток из алло- и ксенографтов. Децеллюляризация позволяет сохранить большинство биологических и механических свойств межклеточного матрикса используемой ткани. Среди описанных скаффолдов такого типа: децеллюляризованный коллаген (трупный или из свиной брюшины), препарат децеллюляризованной дермы (человеческий), препарата децеллюляризованного подслизистого слоя стенки тонкого кишечника (свиной) и другие [200, 226]. В большинстве описанных работ эффективность применения децеллюляризованных матриксов изучалась в эксперименте, в России в клинической практике применялись препараты Аллодерм и Аллоплант [25, 72]. Необходимо отметить, что использование в клинической практике децеллюляризованных алло- и ксенотрансплантатов весьма ограничено соображениями безопасности и этическими аспектами.

Очевидно, синтетические биополимеры обладают существенными преимуществами, размер, форма и структура полимерных скаффолдов переменны и могут быть изменены в зависимости от необходимых механических параметров. Более того, в настоящее время разработаны биосовместимые и биodeградируемые скаффолды, использование которых видится наиболее безопасным. Но тем не менее, полимеры самостоятельно не способны полностью воспроизводить структуру нативной барабанной перепонки [169, 226]. На сегодняшний день количество работ, посвященных исследованию эффективности использования различных полимерных скаффолдов наиболее велико среди работ в области тканевой инженерии барабанной перепонки. На сегодняшний день предложено множество различных вариантов коллагенсодержащих скаффолдов, отличающихся некоторыми физико-химическими свойствами [79, 177]. А.Б. Шехтер и соавт. изучили морфологию различных коллагеновых матриксов, в том числе проанализировав сроки биodeградации различных материалов в тканях [204]. Согласно полученным результатам, авторы делают вывод об отсутствии реакции отторжения у всех коллагеновых материалов. По данным авторов, сроки биорезорбции варьировали от 10 суток у коллагеновых губок до 2 месяцев у

викриловой сетки и децеллюляризованного сосуда [204]. При этом, динамика биодegradации при использовании коллагеновой губки толщиной 1,5 мм и 8 мм практически не отличалась, а тканевая реакция выражалась в пролиферации фибробластов, которые вместе с новообразованными сосудами прорастали в периферические области губок [204].

Коллагеновая губка широко используется в медицине и способствует эффективному заживлению поврежденных тканей согласно многочисленным зарубежным исследованиям [79, 81, 84, 143, 184].

В отечественной литературе также встречаются работы, посвященные применению коллагена для закрытия дефектов барабанной перепонки. Впервые Н.А. Преображенский и соавт. еще в 1973 г. успешно применил в качестве опорной пластинки при закрытии небольших перфораций барабанной перепонки пленку из коллагена, содержащую в своем составе антибиотик [45]. Позднее, тем же коллективом авторов было продемонстрировано повышение эффективности тимпаноластики при использовании коллагеновой губки, пропитанной антибиотиком, для тампонады наружного слухового прохода после тимпаноластики [45].

В дальнейшем, И.И. Гольдманом совместно с Л.А. Кулаковой и соавт. был проведен ряд работ, посвященных изучению эффективности использования комплексного препарата облекол, созданного на основе коллагена при пластике обширных дефектов барабанной перепонки в качестве каркаса для неотимпанального лоскута, а также при реконструкции обширных полостей после saniрующих операций. Этот препарат представляет собой коллагеновую пленку, содержащую в своем составе 1–1,2 % облепихового масла [17, 30, 32].

Несколько зарубежных клинических работ посвящено эффективному использованию желатиновой губки в сочетании с факторами роста в оториноларингологии [105, 123, 128]. По результатам проведенных исследований получены данные о биосовместимости данного материала, а также более быстром закрытии дефектов барабанной перепонки. Желатин является продуктом гидролиза коллагена. Во время гидролиза связи между отдельными коллагеновыми

фибриллами разрушаются, но химический состав остается идентичным коллагену. Однако в отличие от последнего, в большей степени из-за способа получения, желатин имеет вариативные физические свойства и обладает химической гетерогенностью [96]. В связи с этим, применение коллагеновой губки, представляется равноценным использованию желатиновых аналогов.

Другой полимер (полилизин, полимеризованный с латексом) использовался в качестве материала для тампонады наружного слухового прохода после традиционной тимпаноластики с использованием фасции височной мышцы, в ходе данной работы был отмечен выраженный ангиогенез и быстрая васкуляризация неомембраны [174]. Несколько экспериментальных работ посвящено сокращению времени закрытия перфорации барабанной перепонки, а также восстановлению трёхслойной структуры барабанной перепонки при использовании фиброина шёлка для закрытия перфораций барабанной перепонки [221].

Также австралийскими авторами была запатентована искусственная барабанная перепонка, созданная из фиброина шёлка, которую авторы рекомендуют для постоянного использования у пациентов, отказывающихся от хирургического вмешательства [223].

Еще одним полимерным материалом, активно изучающимся и в других областях тканевой инженерии, является хитозан [147]. Хитозан представляет собой мукополисахарид, обладающий антибактериальными свойствами. Водорастворимые и водостойкие формы хитозана доказано усиливают регенерацию кожи, костной ткани и печени [145, 146]. В области тканевой инженерии барабанной перепонки в литературе на данный момент представлены в основном экспериментальные сравнительные исследования, в ходе которых выявлено более быстрое закрытие острых и подострых перфораций барабанной перепонки, более плотная укладка коллагена в восстановленной ткани при использовании хитозана [145, 146, 147, 201].

Использование полимера гиалуроновой кислоты, несмотря на высокую эффективность по данным экспериментальных работ, не привело к более быстрому заживлению перфорации в клинических исследованиях [193].

Другой полимер, альгинат – полученный из морских водорослей, который использовался в экспериментальных работах, требует дальнейшего изучения безопасности [234].

Немаловажным компонентом тканеинженерного подхода являются факторы роста, стимулирующие миграцию и пролиферацию клеток. Выделяют четыре основных фактора роста: эпидермальный фактор роста (EGF), фактор роста фибробластов (FGF), тромбоцитарный фактор роста (PDGF), трансформирующий фактор роста β (TGF- β) [118]. Касательно тканевой инженерии барабанной перепонки большинство исследований посвящено использованию эпидермального и фактора роста фибробластов. Эти биомолекулы, как упоминалось выше, могут использоваться в форме капель или устанавливаться вместе со скаффолдом. Тромбоцитарный фактор роста - основное активное вещество, содержащееся в обогащенной тромбоцитами плазме крови. В последнее время отмечается рост интереса к возможностям применения обогащенной тромбоцитами плазмы крови (ОТПК) во многих областях медицины, в частности в оториноларингологии [210]. Так, миринопластика с помощью жирового графта дополненная добавлением обогащенной плазмы, по данным авторов, продемонстрировала сопоставимые с традиционной пластикой небольших перфораций жировым аутографтом [101]. В отечественной литературе имеются данные об эффективности использования обогащенной тромбоцитами плазмы крови у пациентов с острыми посттравматическими перфорациями барабанной перепонки [18].

Эпидермальный фактор роста стимулирует синтез ДНК, РНК, белков и гиалуроновой кислоты. Рецепторами к эпидермальному фактору роста обладают эндотелиоциты, фибробласты, а также эпителиоциты [121]. Более того, существует высокая аффинность рецепторов к EGF в эпителиальных и стромальных клетках барабанной перепонки. Несмотря на то, что количество рецепторов к EGF не увеличивается при возникновении дефекта, именно ингибирование этих

рецепторов приводит к формированию стойкой перфорации барабанной перепонки [196].

Тем не менее, Wang X. и соавт. в своей работе сообщают о риске формирования холестеатомы при использовании эпидермального фактора роста для закрытия перфораций барабанной перепонки [241].

Стоит отметить, что впервые способность стимулировать рост и миграцию клеток была обнаружена и описана именно у факторов роста фибробластов [77]. На сегодняшний день наиболее исследованным с позиций безопасности и эффективности среди этого семейства факторов роста, является основной фактор роста фибробластов (FGF-b или FGF-2), который представляет собой гепарин-связывающий белок, весом 18 кДа [70, 78]. Согласно, экспериментальным работам, при воссоздании *in vitro* физиологических pH и температуры, период полувыведения активного фактора роста фибробластов составляет 12 часов [170]. Физиологически, данный фактор роста вырабатывается после травмирования барабанной перепонки и усиливает регенерацию посредством активации различных механизмов. Основной фактор роста фибробластов работает преимущественно в наружном слое, где отмечается наибольшая концентрация специфических рецепторов к нему, однако эти рецепторы также расположены и в клетках внутреннего слоя барабанной перепонки [136].

В настоящее время эффективность использования фактора роста фибробластов при закрытии острых и стойких перфораций барабанной перепонки, в том числе и в комбинации с различными скаффолдами, доказана во многих экспериментальных работах [105, 131, 141, 166, 188].

В ходе экспериментальной работы Накуба были получены данные о восстановлении трехслойной структуры барабанной перепонки при использовании желатинового скаффолда и фактора роста фибробластов на лабораторных морских свинках. При этом положительный результат был достигнут у 100% животных основной группы, в то время как в контрольной группе, где использовался только желатиновый гель полноценное закрытие дефекта наблюдалось у 61% [116].

Позднее теми же авторами было проведено клиническое исследование эффективности закрытия острых перфораций барабанной перепонки с использованием двухслойной мембраны из ацетокollaгена и силикона, пропитанной фактором роста фибробластов. Закрытие перфорации наблюдалось у всех пациентов в основной группе (N=10) и только у 2 из 5 в контрольной, где применяли только двухслойную мембрану [115].

Наибольший интерес, естественно, представляют результаты клинических исследований. Так, в одной из опубликованных работ, при прямой аппликации фактора роста фибробластов на края подострой перфорации барабанной перепонки авторы отмечали полное закрытие дефекта у 11 из 12 пациентов, и лишь у 9 из 17 - в группе контроля [165]. Стоит отметить, что термин подострая перфорация не характерен для русскоязычной терминологии и требует уточнения. В иностранной литературе данный термин используется, как правило, именно в работах, посвященных тканеинженерному закрытию перфораций. Подострой перфорацией барабанной перепонки обозначают посттравматический дефект, не затянувшийся самостоятельно в течение 2 недель [131, 166, 188].

В рандомизированном клиническом исследовании Kanemaru и соавт. оценивал эффективность закрытия больших стойких дефектов барабанной перепонки с применением фактора роста фибробластов и коллагеновой губки. В основной группе после деэпидермизации краев перфорации, дефект укрывался истонченным фрагментом желатиновой губки, пропитанной раствором фактора роста фибробластов, и фиксировался фибриновым клеем, в контрольной группе закрытие дефекта не проводилось. Полное закрытие дефекта наблюдалось у 52 из 53 пациентов основной группы и лишь у 1 из 10 пациентов контрольной группы [138].

В 2018 году Z. Lou и соавт. опубликовали систематический обзор публикаций, посвященных клиническим испытаниям эффективности фактора роста фибробластов при закрытии перфораций барабанной перепонки. По результатам анализа, во всех 11 публикациях, посвященных закрытию травматических перфораций, авторы описывали положительный результат у 89,3-100% пациентов, среднее время закрытия перфорации составляло 2 недели. В обзор также вошли 8

клинических исследований эффективности закрытия стойких перфораций барабанной перепонки с применением различных методик с использованием фактора роста фибробластов. В том числе три работы были посвящены исследованию комбинации коллагеновой губки и фактора роста фибробластов. При использовании данной методики авторы всех работ отмечают значимо более высокую эффективность (83,1 – 90 %) по сравнению с показателями в контрольных группах [164].

Таким образом, данные зарубежных преклинических исследований демонстрируют регенеративный потенциал фактора роста фибробластов и открывают перспективы его использования в отиатрии. В мире на данный момент на завершающей стадии находится одно клиническое исследование, посвящённое эффективности топического использования препарата рекомбинантного человеческого фактора роста фибробластов для закрытия стойких перфорациях барабанной перепонки [139].

В России направления регенеративной медицины только начинают развиваться и находят применение в различных отраслях здравоохранения.

В отечественной литературе по применению регенеративной медицины в отиатрии можно найти единственное исследование, посвященное применению обогащенной тромбоцитами плазмы крови при мирингопластике [18].

Использование клеточных технологий на сегодняшний день весьма ограничено и сводится лишь к экспериментальным исследованиям даже зарубежом. В тканевой инженерии барабанной перепонки это обусловлено, с одной стороны, наличием ряда возможных труднопрогнозируемых побочных явлений, дороговизны испытаний и этическими аспектами, а с другой стороны эндогенным регенеративным потенциалом барабанной перепонки и отсутствием острой необходимости использования стволовых клеток.

Таким образом, на современном этапе применение тканеинженерного подхода к закрытию стойких перфораций барабанной перепонки представляется весьма актуальным. Потенциальными преимуществами тканеинженерного подхода по сравнению с классическим является сохранение аутоклеток пациента, уменьшение

времени пребывания пациента в стационаре, экономическая выгода [138]. Особенно перспективным является дальнейшее исследование эффективности и безопасности применения комбинации скаффолдов и факторов роста.

1.5. Поиск адекватной модели стойкой перфорации барабанной перепонки

Общеизвестно, что точечные перфорации барабанной перепонки могут закрываться самостоятельно с формированием соединительно-тканного рубца. Однако, в некоторых случаях дефекты сохраняются с формированием хронического среднего отита [29].

Механизм, лежащий в основе персистирования перфорации барабанной перепонки все еще мало изучен. Как правило, выделяют несколько факторов, приводящих к неэффективной репарации [231]. Gladstone и соавт. называют процесс заживления барабанной перепонки уникальным, подчеркивая главную особенность – в отличие от заживления ран другой локализации восстановление эпителия в данном случае происходит перед регенерацией фиброзного слоя [113].

В отечественной литературе также немало работ, посвященных изучению процессов репарации барабанной перепонки, в том числе на экспериментальных моделях [7, 21, 57]. Шевлюк Н.Н. и соавт. с помощью ряда гистологических и морфометрических исследований изучили особенности репаративных процессов в тканях барабанной перепонки на экспериментальной модели хронического среднего отита у собак [57]. По данным авторов, наибольший митотический индекс в эпителиальных клетках отмечался в конце первой недели, в то же время максимальная синтетическая активность фибробластов сохранялась в течение первых двух недель. При этом, для создания модели хронического гнойного отита у собак авторы трижды вводили в барабанную полость культуру *S. aureus* [57]. Стоит отметить, что такая модель нередко встречается как в отечественной, так и в

зарубежной литературе, однако не подходит для изучения эффективности различных способов закрытия перфорации.

Итак, по данным литературы, можно выделить несколько основных гипотез формирования стойкого дефекта барабанной перепонки: структурную, гистологическую, инфекционную и ассоциированную с факторами роста [231]. Согласно структурной теории, при больших размерах дефекта именно отсутствие опоры для регенерирующего эпителия приводит к формированию стойкого дефекта [226]. Тем не менее, многие авторы выступают против этой теории, аргументируя тем, что в некоторых случаях наблюдается спонтанное закрытие даже больших острых перфораций, в то время как среди стойких дефектов часто встречаются очень маленького размера перфорации [69, 179]. При субтотальных дефектах возможно повреждение центров роста эпителия в сохранной части перепонки, что может привести к недостаточной репарации [179]. Сторонники гистологической теории, основываясь на том факте, что в отличие от нормальной репарации эпителий не образует мостик через дефект, а подворачивается и стремится к внутреннему слою барабанной перепонки [162]. Именно такой паттерн эпителизации приверженцы гистологической гипотезы называют причиной формирования стойкой перфорации [68, 113]. Инфекционный фактор, а именно наличие среднего отита, тесно взаимосвязан с наличием стойкой перфорации и часто ее сопровождает. Однако, четких данных о том, каким именно образом инфекционный процесс тормозит репарацию нет. В целом, различные теории можно объединить в две основные. По одной из них инфекционный агент ингибирует пролиферацию и миграцию эпителия вследствие нарушения кровоснабжения и доставки факторов роста, а по другой – активирует чрезмерную пролиферацию и способствует эпидермизации края дефекта [208, 211].

Wang и соавт. в 2014 году провели обзор литературы, посвященной техникам создания моделей стойкой и «подострой» перфорации барабанной перепонки у лабораторных животных [231]. Публикации не на английском языке, так же как и относящиеся к острым перфорациям не были включены в обзор. Так, по данным авторов наиболее часто в качестве лабораторного животного использовались

шиншиллы. В данном обзоре авторы выделяют некоторые ограничения, так во многих работах отсутствуют сведения об общем количестве животных, либо отсутствуют гистологические или отоскопические доказательства наличия стойкого дефекта. В заключении авторы приходят к выводу о необходимости поиска эффективной модели стойкой перфорации барабанной перепонки и дальнейших исследований в данной области, при этом многие описанные техники выглядят обещающими, однако требуют стандартизации протокола эксперимента [231].

В литературе на сегодняшний день описано множество различных способов создания стойкой перфорации барабанной перепонки на лабораторных животных. Wang и соавт. в своем литературном обзоре систематизировали описанные методики и выделили всего пять групп в зависимости от характера воздействия – механическое, химическое, иммунологическое, генетическое, а также физическое изменение эпителия барабанной перепонки [231].

Последняя группа включает технику подворачивания краев перфорации, когда по периметру созданной перфорации выполняется четыре лучевых разреза на 12, 3, 6 и 9 часах, и сформированные таким образом четыре микролоскута подворачиваются за край дефекта в барабанную полость.

Генетические методы на сегодняшний день описаны лишь на лабораторных мышах и включают использование линий с генетическим дефектом системы активатора плазминогена, которой принадлежит ключевая роль в заживлении ран у мышей [231].

Однако, с использованием данной методики авторам удавалось добиться лишь отсроченного закрытия перфорации барабанной перепонки по сравнению с контрольной группой на сроке до 8 недель наблюдения [158, 205].

Идеальная модель стойкой перфорации барабанной перепонки должна соответствовать нескольким критериям – длительность перфорации более 8 недель, отсутствие инфекционного процесса, наличие оmozолелых краев перфорации [158].

Различные методы создания стойкой перфорации включают технику подворачивания краев перфорации, термическое воздействие, повторную

миринготомию, временную установку тимпаностомической трубки, частичную резекцию рукоятки молоточка, аппликацию различных топических препаратов. В качестве местных химических агентов наиболее часто используются цитостатики, такие как метотрексат и 5-фторурацил, однако, их применение приводит лишь к замедлению закрытия перфорации [89, 102, 135, 186].

Лишь в одном исследовании авторы описывают получение стойкой перфорации в 87% после использования сочетанной аппликации преднизолона и гидрокортизона [90].

Наиболее распространены миринготомия с подворачиванием краев перфорации, а также различные варианты термического воздействия. Amoils и соавт. сообщают об эффективности применения холодной миринготомии в сочетании с подворачиванием краев перфорации при создании модели стойкой перфорации на шиншиллах в 84% случаев [99]. По данным Emami и соавт., использование термической миринготомии (электрокоагуляция) в сочетании с техникой подворачивания краев не эффективно, перфорации у шиншилл закрывались самостоятельно спустя 4-6 недель [97].

Kaftan и соавт. сообщают о высоких показателях эффективности при использовании сложной сочетанной методики на крысах. Так, авторы дополняют субтотальную миринготомию с подворачиванием краев перфорации частичной резекцией рукоятки молоточка и дальнейшей аппликацией преднизолона либо митомицина [134]. Воспроизводимость столь сложной техники кажется весьма сомнительной, в особенности на крысах, так как размер наружного слухового прохода существенно ограничивает манипуляции на перепонке у данного вида животных. Более того, при использовании на этапе создания стойкой перфорации химических веществ, тормозящих миграцию и пролиферацию клеток, сложно исключить их влияние на процессы репарации при попытках закрытия этих перфораций в последующем [194].

В то же время, результаты трех независимых исследований на шиншиллах демонстрируют формирование стойкой перфорации у всех животных при использовании холодной миринготомии с подворачиванием краев [182, 209, 234].

Механизмы, лежащие в основе формирования стойкой перфорации барабанной перепонки, при применении тимпаностомических трубок описаны в работе австралийских исследователей. Wang и соавт. провели гистологическое и иммуногистохимическое исследование срезов барабанных перепонки крыс на разных этапах формирования стойкого дефекта после установки вентиляционной трубки, и сравнили полученные результаты с острой перфорацией и с барабанной перепонкой в норме. Согласно, полученным данным, авторы выделили три стадии заживления перепонки - острое заживление (3-17 дней), переходная стадия (3-4 недели) и хроническая стадия (6-10 недель). Согласно гистологическому исследованию лишь на третьей стадии было отмечено утолщение и подворачивание эпителия вокруг края перфорации, существенное повышение содержания кератина и коллагена, а также снижение клеточной пролиферации и макрофагальная инфильтрация. Таким образом, авторы делают вывод о том, что барабанная перепонка приобретает характерные для стойкого дефекта гистологические признаки спустя 6- 10 недель [232].

Таким образом, в настоящее время нет единого представления об оптимальной модели создания перфорации барабанной перепонки. Однако наработан определенный опыт в данном направлении, но основе которого мы провели собственное экспериментальное исследование.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Обоснование выбора шиншиллы в качестве объекта экспериментального исследования

По данным проведенного обзора литературы, наибольшее число сообщений об успешном создании модели стойкой перфорации относятся к экспериментальным работам на шиншиллах, затем – на крысах и морских свинках [68, 97, 182, 188, 209, 231, 234].

Для проведения подобных экспериментальных исследований некоторые авторы использовали других животных, однако этот выбор сопровождался существенными недостатками и ограничениями [231]. Так, крысы и морские свинки обладают менее широким наружным слуховым проходом, что значительно затрудняет или исключает одновременное введение эндоскопа и инструмента, или работу под микроскопом с использованием двух инструментов [87, 95, 132, 181, 187, 198]. Наружный слуховой проход кроликов шире, чем у крыс, морских свинок и даже шиншилл, однако он намного более извитый, что ограничивает доступ к барабанной перепонке, а в некоторых работах авторы прибегали к иссечению наружного уха вместе с наружной третью наружного слухового прохода для улучшения обзора. Также, в литературе описаны единичные работы с использованием собак, мышей [205, 219]. Помимо экономической и этической нерентабельности использования собак для создания модели стойкой перфорации, анатомическое строение их слухового прохода также может стать серьезным препятствием. Наружный слуховой проход у собак шире, чем у кроликов и шиншилл, однако, он отличается значительной извитостью.

Наружный слуховой проход у взрослых самцов шиншилл позволяет манипулировать на барабанной перепонке, даже при использовании жесткого

эндоскопа 4 мм, что улучшает обзор по сравнению с использованием микроскопа. Кроме того, строение барабанной перепонки, а также цепи слуховых косточек аналогично таковым у человека. Диаметр барабанной перепонки шиншиллы 7-10 мм [194].

Таким образом, в соответствии с проведенным обзором литературы, в качестве экспериментальной модели нами были выбраны взрослые самцы шиншиллы в возрасте 6 месяцев и весом 500 - 700 грамм. Пол животных был выбран в связи с меньшей гормональной вариабельностью самцов по данным литературы [194].

2.2. Условия содержания животных

Все серии экспериментов проводились в условиях Виварного комплекса Сеченовского Университета. Все манипуляции с животными в ходе данного этапа проводились врачом-оториноларингологом (диссертантом) под руководством научного руководителя по согласованию с врачом-ветеринаром вивария. Экспериментальная часть работы одобрена Локальным Этическим Комитетом ФГАОУ ВО Первого МГМУ имени Сеченова (Протокол № 10-20 заседания Локального Этического Комитета от 13.05.2020).

Условия содержания экспериментальных животных соответствовали требованиям следующих нормативных документов: ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур, дата введения 2016-07-01» и ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами, дата введения 2016-07-01». Каждая шиншилла находилась в отдельной клетке. Основу рациона шиншиллы составил сухой концентрированный корм. Суточная норма сухого корма 30—50 г. В корм также вошли ветки березы, дуба, ивы, кора осины, сушеные овощи и ягоды (морковь, яблоки, малина). Также в

клетке всегда присутствовало сено (25 г в сутки), так как оно способствует усвоению других питательных веществ, а его отсутствие в рационе может привести к гибели животного. Чистая вода и корм находились в клетке постоянно, во избежание стресса животного, при этом использовались пластмассовые кормушки достаточного веса во избежание перевертывания их животными и удобные для чистки (мойки). Также, для предотвращения проблем с зубным аппаратом шиншиллы, в клетке всегда будет находиться специальный точильный камень для грызунов (вспененный известняк или пемза). Все манипуляции и осмотры проводились в условиях общей анестезии для исключения стресса для животного.

2.3. Дизайн и структура экспериментальной работы

Работа основана на результатах серии проведённых экспериментов, в которой можно принципиально выделить два последовательных этапа.

2.3.1. Общая характеристика первого этапа эксперимента

Первая часть исследования заключалась в поиске эффективной модели стойкой перфорации барабанной перепонки (Схема 1). Тщательное изучение литературы, посвященной моделям стойкой перфорации барабанной перепонки на лабораторных животных, выявило достаточно противоречивые данные в различных источниках и отсутствие единой эталонной методики. Данные выводы обозначили необходимость первого этапа работы – поиска эффективной воспроизводимой модели стойкой перфорации барабанной перепонки.

В рамках первого этапа работы 18 взрослых самцов лабораторных шиншилл были разделены на три равные группы, в зависимости от использованной техники создания перфорации. Основываясь на данных обзора литературы, мы выбрали две

наиболее перспективные методики, а также комбинацию двух описанных в литературе техник формирования перфорации. Так, в первой группе была выполнена холодная миригнотомия с подворачиванием краев, во второй – лазерная миригнотомия, в третьей – комбинация холодной миригнотомии с подворачиванием краев и установки миригнотомической трубки. Подробное описание исследуемых техник формирования дефектов представлено в подглавах 3.1.1, 3.1.2, 3.1.3. Перфорации были сформированы с двух сторон, соответственно с помощью каждой из техник было сформировано по 12 перфораций диаметром 6 мм (Рисунок 2.1). Далее, спустя каждые 2 недели проводилась оценка состоятельности перфорации. В случае уменьшения размера перфорации (менее 3 мм), дефект повторно расширялся с помощью соответствующей техники. По истечении общего периода наблюдения (8 недель) оценивалась эффективность использованной техники. Помимо оценки сроков персистирования дефектов, также проводилась оценка морфологической структуры краев дефектов по наличию гистологических признаков формирования стойкой перфорации.



Рисунок 2.1 – Дизайн-схема первого этапа экспериментальной работы

2.3.2. Общая характеристика второго этапа эксперимента

Вторая, основная, часть исследования заключалась в оценке эффективности тканеинженерного способа закрытия стойкой перфорации, предварительно сформированной по воспроизводимой эффективной методике, которая была определена на первом этапе работы. Для чистоты эксперимента во второй этап были включены 24 новых самца шиншиллы. Перед началом второго этапа работы было сформировано 36 стойких перфораций (24 правосторонних и 12 левосторонних), которые были распределены в три группы. Соответственно, в группу контроля вошли 12 левосторонних перфораций, 24 правосторонние перфорации были поровну распределены в первую и вторую группы лечения. В первой группе для закрытия перфорации применяли тканеинженерную методику с использованием коллагенового скаффолда и основного фактора роста фибробластов (FGF), а во второй - закрытие перфорации коллагеновым скаффолдом с физиологическим раствором (Рисунок 2.2). Подробное описание проводимых вмешательств дано в главе 4. Каждые 2 недели проводилась отовидеоэндоскопическая оценка леченных барабанных перепонки из первой и второй групп, а также нелеченных перфорированных перепонки из третьей группы (группы контроля). При состоятельности дефекта в перепонках из групп лечения процедура закрытия повторялась, при необходимости неоднократно - до 4 раз за весь период наблюдения.

По окончании периода наблюдения (12 недель) мы оценивали эффективность проведенного лечения. Помимо отовидеоэндоскопической фиксации факта закрытия перфорации, мы оценивали морфологические свойства регенерировавшего участка, а также локальные механические параметры. С этой целью, полностью восстановленные барабанные перепонки из обеих групп лечения извлекались и подготавливались либо для гистологического исследования (четные порядковые номера), либо для атомно-силовой микроскопии (нечетные порядковые номера). Подробное описание методов исследования приведено в

подглавах 2.4.2, 2.4.3. Необходимо отметить, что подготовка образцов либо к гистологическому исследованию, либо к атомно-силовой микроскопии, исключала возможность проведения в последующем второго исследования на этом же образце. Так, перед проведением атомно-силовой микроскопии выполнялась процедура децеллюляризации, которая исключала возможность достоверного гистологического исследования данного образца на предмет восстановления всех слоев барабанной перепонки. В свою очередь, хранение в формалине, фиксация и окрашивание образцов для гистологического исследования, делали их неприменимыми для проведения атомно-силовой микроскопии.

Таким образом, каждый исследуемый образец может быть изучен либо гистологически, либо с помощью атомно-силовой микроскопии. Для исключения субъективного фактора для каждого образца, распределение методов исследования было обозначено заранее, на этапе формирования групп: по окончании эксперимента обе барабанные перепонки животных с нечетными порядковыми номерами подлежали гистологическому исследованию, а с четными номерами - атомно-силовой микроскопии, при условии полного закрытия дефекта.



Рисунок 2.2 – Дизайн-схема второго этапа экспериментальной работы

2.4. Общая характеристика методов исследования, использованных в эксперименте

В первой части эксперимента для оценки эффективности изучаемых способов создания модели стойкой перфорации барабанной перепонки применялись отовидеоэндоскопия, гистологическое исследование краев сформированных стойких дефектов. Вторая часть работы предполагала оценку эффективности проводимых операций по закрытию стойких перфораций, для которой использовались отовидеоэндоскопия, гистологическое исследование, а также атомно-силовая микроскопия с наноиндентированием.

2.4.1. Отовидеоэндоскопия

Данный метод визуализации использовался для динамических осмотров, оценки размеров дефектов и фиксации изображений. Использование эндоскопа Karl Storz, 2.7 мм, под углом 30 градусов (Karl Storz, Germany), подключенного к контроллеру консоли видеокамеры (Karl Storz), оказалось наиболее информативным и менее травматичным для применения на взрослых самцах лабораторных шиншилл (Рисунок 2.3). Отовидеоэндоскопия применялась у всех животных как на первом, так и на втором этапе работы. Перед проведением отовидеоэндоскопии для обеспечения неподвижности и обезболивания животного проводился вводный наркоз, далее при необходимости ремиринготомии или повторного закрытия остаточного дефекта выполнялось дополнительное введение препаратов для достижения адекватного общего обезболивания и обездвиживания.



Рисунок 2.3 – Техника проведения отовидеоскопии, положение животного при осмотре левого и правого уха

Для фиксации размеров перфорации использовался сайзер с миллиметровой разметкой («Устройство для измерения размера перфорации барабанной перепонки», патент № 2753139, 11.08.2021) (Рисунок 2.4).

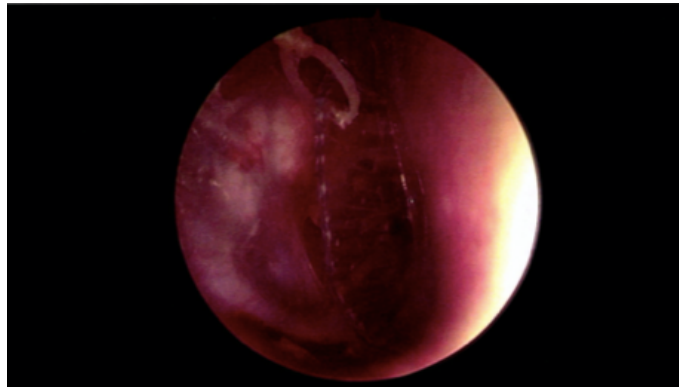


Рисунок 2.4 – Сликоновый сайзер с миллиметровой разметкой, введенный в наружный слуховой проход

2.4.2. Морфологическое исследование

Морфологическое исследование проводилось под руководством д.м.н. профессора Шехтер А.Б. в Институте регенеративной медицины Научно-технологического парка биомедицины Сеченовского Университета.

Задачи морфологического исследования на первом и втором этапах работы отличались. В первой части экспериментальной работы барабанные перепонки извлекались для морфологического изучения только в случае формирования стойких перфораций, спустя 10 недель наблюдения. Именно такой срок соответствует времени окончания стадии хронизации дефекта на модели стойкой перфорации по данным литературы [232]. Во второй части работы гистологическое исследование барабанных перепонки проводилось спустя 12 недель после закрытия перфорации, для оценки зрелого рубца после окончания заживления.

Извлечение барабанной перепонки всегда проводилось под контролем микроскопа с использованием хирургического микроинструментария непосредственно после эвтаназии животного.

В качестве метода эвтаназии нами была выбрана передозировка анестетиками, которая в соответствии с Европейской Директивой 2010/63 входит в перечень применимых способов эвтаназии для грызунов. Использование инъекционных препаратов - самый быстрый, надёжный и оптимальный метод эвтаназии, так как не вызывает болезненности или страха у животного [206]. Взятие материала осуществлялось только после подтверждения смерти животного (отсутствие пульса, дыхания, отсутствие роговичного рефлекса, невозможность услышать дыхание и сердцебиение с помощью фонендоскопа).

Для прецизионного доступа к барабанной перепонке, после удаления наружного уха и перепончатой части наружного слухового прохода, выполнялась отсепаровка кожи от свода черепа, далее с помощью микроножниц от окружающих структур отделялась единым блоком слуховая булла (Рисунок 2.5), расположенная

книзу и кпереди от наружного слухового прохода. Такое извлечение позволяло максимально сохранить барабанную перепонку для дальнейшего ее гистологического исследования или проведения атомно-силовой микроскопии, предотвращая образование трещин костного кольца и разрывов тончайшей перепонки.

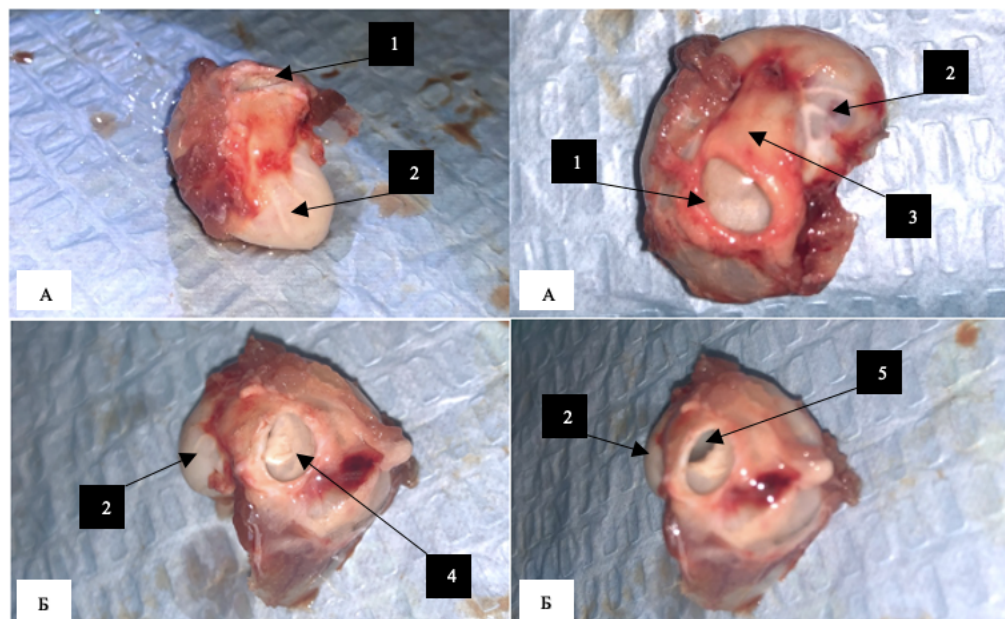


Рисунок 2.5 – Макропрепарат. Извлеченная слуховая булла шиншиллы (А- правая, Б- левая). 1 - вход в костную часть наружного слухового прохода; 2 - слуховая булла; 3 - костная часть наружного слухового прохода; 4 - кожа наружного слухового прохода; 5 - барабанная перепонка

Следует отметить, что извитой ход костной части наружного слухового прохода делает весьма затруднительным трансканальный доступ к барабанной перепонке. Поэтому для дальнейшего извлечения барабанной перепонки производилось вскрытие костных стенок слуховой буллы (Рисунок 2.6) и, соответственно, доступ к перепонке осуществлялся из полости буллы, аналога барабанной полости. Помимо прочего, такой доступ позволял более прецизионно манипулировать на барабанной перепонке, тесно связанной с молоточком и сухожилием мышцы, напрягающей барабанную перепонку.

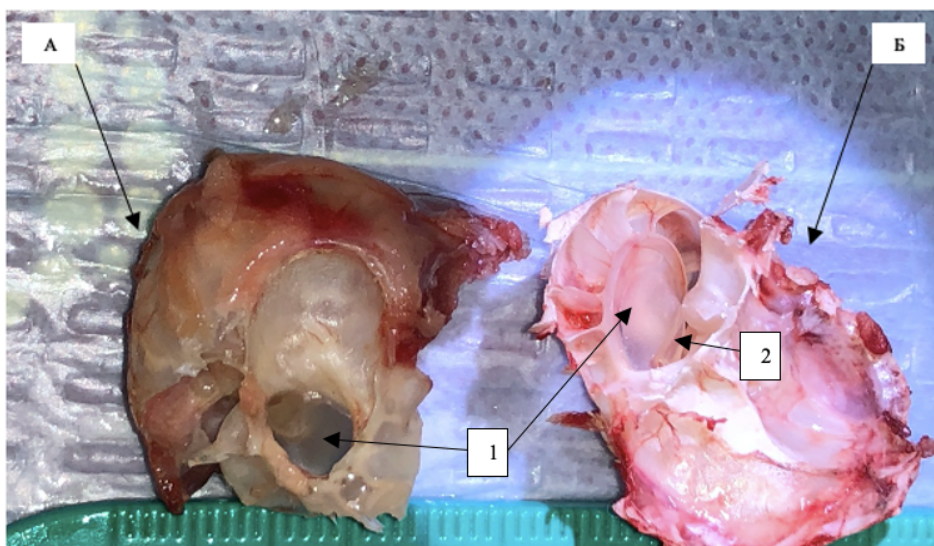


Рисунок 2.6 – Слуховая булла шиншиллы после вскрытия костной капсулы (А – правая, вид со стороны наружного слухового прохода; Б – левая, вид со стороны полости слуховой буллы). 1- барабанная перепонка в костном кольце, 2 - рукоятка молоточка

Дальнейшее извлечение производилось под контролем микроскопа (Рисунок 2.7). Барабанная перепонка извлекалась с молоточком после рассечения молоточко-наковальневого сочленения и сухожилия мышцы, напрягающей барабанную перепонку, затем из выделенной перепонки с помощью микроножниц иссекалась рукоятка молоточка.

Полученные ткани барабанных перепонки фиксировались в нейтральном забуференном 10% формалине в течение 24 часов. На микротоме были получены поперечные срезы парафиновых блоков толщиной 3-3,5 микрометра.

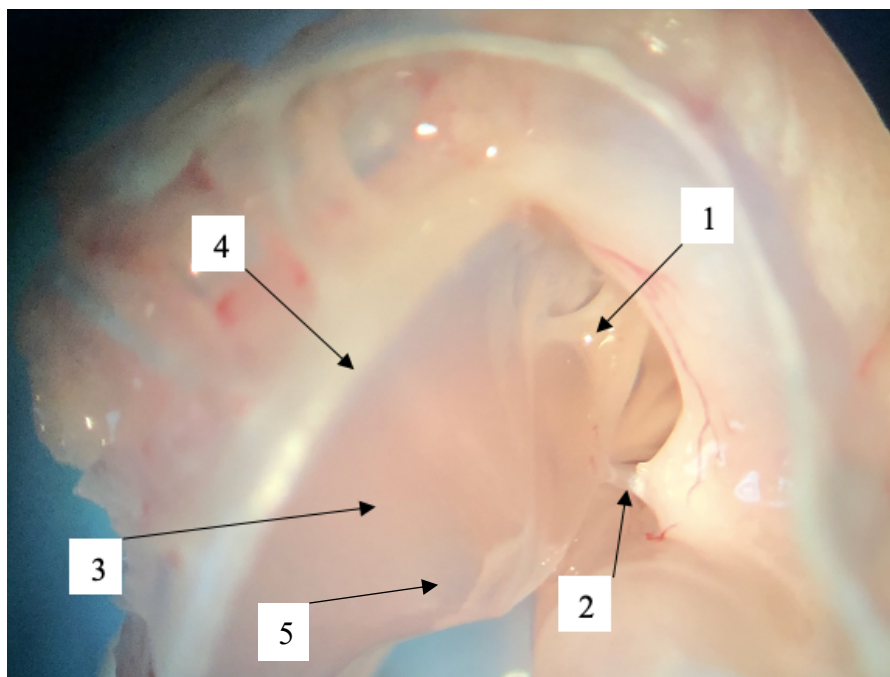


Рисунок 2.7 – Микроскопия, слуховая булла шиншиллы. Увеличение 2,5X. 1- молоточек, 2 -натянутая часть барабанной перепонки, 3- сухожилие мышцы, натягивающей барабанную перепонку, 4- фиброзное кольцо, 5- регенерировавший фрагмент

Использование поперечных срезов позволяло детально изучить состояние края сформированной перфорации в первой части работы, а также количество и структуру слоев барабанной перепонки после проведенного лечения во второй части работы.

Для изучения готовых препаратов использовался универсальный микроскоп Leica DM4000 B LED, оборудованный камерой Leica DFC7000 T и программным обеспечением LAS V4.8 (Leica Microsystems, Швейцария). Морфологическое исследование проводилось двумя патологоанатомами. Гистологические препараты окрашивались гематоксилином и эозином. На первом этапе работы выполнялась только классическая световая микроскопия, которая является достаточной для эффективного анализа признаков формирования стойкой перфорации по данным литературы.

Вторая часть работы предполагала более прецизионное изучение строения восстановленной барабанной перепонки. В рамках второго этапа работы для

оценки восстановленной ткани помимо световой микроскопии применялись поляризационная и фазово-контрастная микроскопия.

Поляризационная микроскопия — один из высокоэффективных методов морфологического исследования, обладающий широкими возможностями идентификации биологических структур, что в сочетании с доступностью и относительной простотой обуславливает его высокую ценность. Для создания эффекта поляризации в поляризационном микроскопе имеются два поляризационных фильтра, один из которых, помещаемый между источником освещения и гистологическим объектом, называется поляризатором, а другой, находящийся между гистологическим объектом и глазом исследователя, — анализатором.

Фазово-контрастная микроскопия — метод получения изображений в оптических микроскопах, при котором сдвиг фаз электромагнитной волны трансформируется в контраст интенсивности. Фазово-контрастная микроскопия используется для изучения прозрачных объектов. Этот метод основан на том, что микроскоп фиксирует изменение фазы световой волны при ее прохождении через наблюдаемый образец. Ценность фазово-контрастной микроскопии заключается в том, что она позволяет подробно изучать живые организмы, невидимые или нечетко различимые при классических наблюдениях.

Вместе с классическим гистологическим анализом во второй части работы была проведена морфометрия в виде балльной оценки морфологических признаков восстановленной ткани. Для этого морфологические изменения барабанной перепонки по сравнению с нормальной структурой были разбиты на 5 морфологических признаков: количество слоев барабанной перепонки, количество слоев в клетках в эпителиальном слое перепонки, количество кератина на поверхности эпителиального слоя, количество слоев волокон в фиброзном слое, упаковка волокон в фиброзном слое барабанной перепонки (см. Таблица 2.1).

Таблица 2.1 – Шкала оценки гистологических признаков восстановленных (леченных) барабанных перепонки шиншиллы

Гистологический признак	Характеристика	Баллы
Количество слоев барабанной перепонки	3 слоя	0
	2 слоя	1
	1 слой	2
	Не выражены слои	3
Количество слоев в клетках в эпителиальном слое перепонки	5-6	0
	3-4	1
	1-2	2
	Отсутствует эпителиальный слой	3
Количество кератина на поверхности эпителиального слоя	Тонкий слой	0
	Толстый слой кератина локально	1
	Толстый слой кератина на БОльшем протяжении	2
	Толстый слой на всем протяжении	3
Количество слоев волокон в фиброзном слое	2	0
	1 (плотная упаковка одинаково направленных волокон)	1
	0 (рыхлая упаковка волокон)	2
	Отсутствует фиброзный слой	3
Упаковка волокон в фиброзном слое барабанной перепонки	Плотная на всем протяжении	0
	Плотная на БОльшем протяжении	1
	Рыхлая на БОльшем протяжении	2
	Рыхлая на всем протяжении	3

Каждый морфологический признак оценивался по 3-х балльной системе: 0 – отсутствие морфологических изменений по сравнению с нормой; 1 – слабые изменения признаков; 2 – умеренные изменения признаков; 3- выраженные изменения признаков; 4 – максимальные изменения признаков для данного исследования.

2.4.3. Атомно-силовая микроскопия

Атомно-силовая микроскопия проводилась под руководством профессора, д.х.н. Тимашёва П.С., на базе Института Регенеративной Медицины Парка Биомедицины ФГАОУ ВО Первого МГМУ имени И.М.Сеченова МЗ РФ (Сеченовский Университет).

Для оценки локальных механических свойств неизменной и восстановленной барабанной перепонки применяли атомно-силовую микроскопию с наноиндентированием фиброзного слоя. Известно, что среди эластических параметров барабанной перепонки наиболее существенным является модуль Юнга, определяющий упругость ткани. Значения этого параметра барабанной перепонки были описаны в нескольких работах. В большинстве работ для измерения модуля Юнга использовали предварительно вырезанные из барабанной перепонки полоски, закрепленные между двумя металлическими фиксаторами. Самым прямым способом является тест на растяжение/разрыв. Наиболее прецизионным методом для измерения модуля Юнга является атомно-силовая микроскопия, метод позволяющий помимо визуализации поверхности коллагеновых пучков и их структуры, получать численные значения эластических параметров, в том числе модуля Юнга.

В основе метода лежит поверхностное наноиндентирование изучаемой ткани, а механические параметры барабанной перепонки определяются ее фиброзным слоем. Поэтому предварительно мы проводили децеллюляризацию с последующей атомно-силовой микроскопией фрагментов нативной барабанной перепонки шиншиллы.

Децеллюляризация подразумевает удаление клеток из обрабатываемой ткани. Суть метода заключается в последовательной обработке (Рисунок 2.8) барабанной перепонки растворами специальных химических агентов:

- 1) обработка образцов комбинацией растворов детергентов 0,5% додецилсульфат натрия (SDS) и 0,5% дезоксихолат натрия (SDC) со сменой

раствора каждые 12 часов в течение суток при комнатной температуре в условиях постоянного помешивания (на шейкере);

2) цикл промывок в дистиллированной воде со сменой раствора каждые 12 часов в течение суток при комнатной температуре в условиях постоянного помешивания (на шейкере);

3) цикл промывок в фосфатно-солевом буфере (PBS) в 12 шагов со сменой раствора каждые 12 часов в течение 6 дней при комнатной температуре в условиях постоянного помешивания (на шейкере).

Соответственно, по окончании децеллюляризации мы получаем образец барабанной перепонки, лишенный клеток, который представляет собой изолированный фиброзный слой.



Рисунок 2.8 – Этап первой обработки образца комбинацией растворов детергентов 0,5% додецилсульфат натрия (SDS) и 0,5% дезоксихолат натрия (SDC)

Для изучения топографии (поверхностной структуры) и измерения модуля упругости (E) с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ) использовался микроскоп Bruker Bioscope Resolve (Рисунок 2.9) в режиме снятия силовых кривых Force Volume (FV) и PeakForce QNM (Quantitative NanoMechanics).

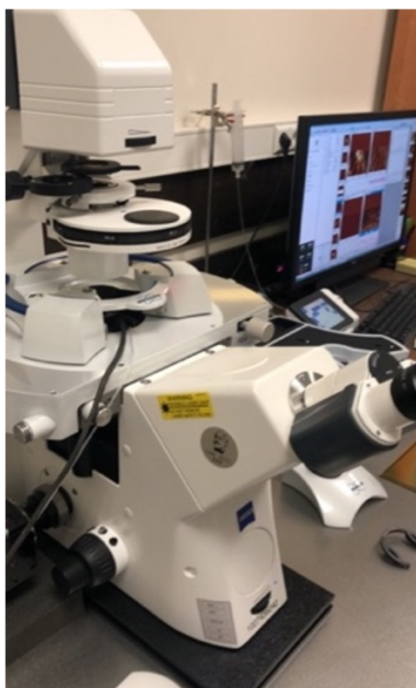


Рисунок 2.9 – Микроскоп Bruker Bioscope Resolve, используемый для атомно-силовой микроскопии

2.5. Методы статистической обработки полученных результатов

Формирование компьютерной базы данных, статистический анализ материалов и представление результатов исследования выполнены на языке программирования R версии 3.4.3 с использованием среды R studio версии 3.6.1; 3.2.3, GraphPad Prism версии 7.00 для Windows (GraphPad Software, Inc.), Statsoft Statistica 64.

Перед началом статистической обработки проводилась предварительная оценка корреляции и выбросов в группах. Для проверки нормальности распределения данных использовались графические (Q-Q plots) и формальные (Шапиро-Уилка) тесты.

Для отражения исследуемых закономерностей использовались методы описательной статистики. Для всех количественных данных рассчитаны меры центральной тенденции - среднее значение и стандартное отклонение ($M \pm m$). Непараметрическая описательная статистика включала расчет и оценку медианы,

25% и 75-перцентилей, интерквартильного размаха. Все показатели рассчитывались и анализировались в целом и по группам. Описательная статистика для качественных данных представлена в виде абсолютной частоты встречаемости, а также процентов.

Для проверки сопоставимости групп и проверки статистических гипотез о различии в количественных признаках использованы параметрический t- критерий Стьюдента и непараметрический критерий Манна-Уитни.

Для статистического анализа количественных данных, полученных в ходе наноиндентирования использовался критерий Манна-Уитни, который является непараметрической вариацией критерия Уилкоксона (Wilcoxon rank test).

Следует отметить, что результаты параметрических и непараметрических тестов не противоречат друг другу.

Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез был выбран на уровне 0,05 ($p < 0,05$).

Глава 3. ПЕРВЫЙ ЭТАП ЭКСПЕРИМЕНТА: ПОИСК ЭФФЕКТИВНОЙ МОДЕЛИ СТОЙКОЙ ПЕРФОРАЦИИ БАРАБАННОЙ ПЕРЕПОНКИ

3.1 Общая характеристика техник формирования моделей стойких перфораций барабанной перепонки, исследованных в эксперименте

Для поиска адекватной модели стойкой перфорации нами было проведено сравнительное исследование трех различных способов ее создания, демонстрирующих высокие показатели эффективности по данным литературы [231].

3.1.1. Холодная миринготомия с подворачиванием краев

Данная методика очень распространена, относится к группе способов физического воздействия по классификации Wang [231]. Однако, по данным литературы, выводы различных авторов об эффективности данной методики могут различаться. Тем не менее, имеется несколько работ, показавших эффективность техники подворачивания краев в увеличении сроков персистенции дефектов перепонки [134, 219]. В задне-нижнем квадранте формируется миринготомическое отверстие с помощью микроиглы из стандартного отиатрического микрохирургического набора. После чего, тем же инструментом по окружности перфорации выполняются четыре радиальных надреза на 12, 3, 6 и 9 часах, и образованные лоскуты треугольной формы подворачиваются внутрь, к медиальной поверхности барабанной перепонки (Рисунок 3.1).

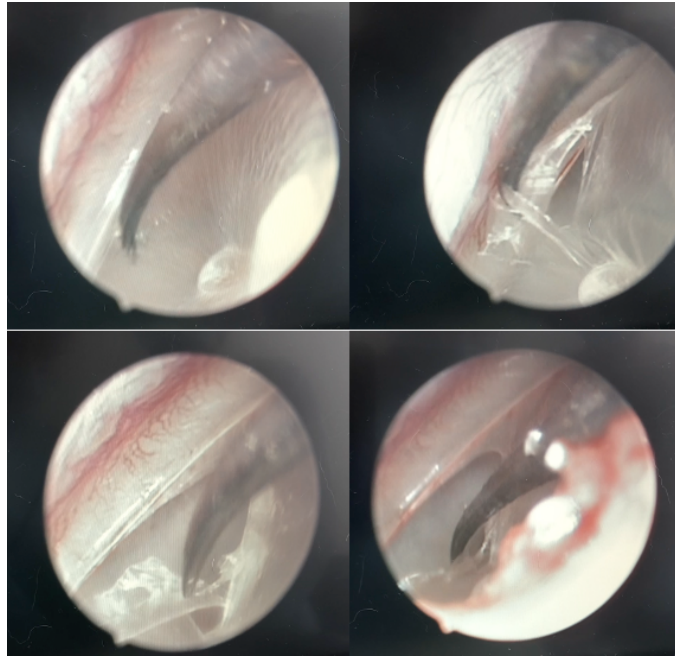


Рисунок 3.1 – Миринготомия техникой подворачивания краев перфорации (“infolding technique”)

3.1.2. Лазерная миринготомия

Среди различных методов термического воздействия наиболее перспективными для формирования стойких перфораций по данным литературы являются электрокаутеризация и миринготомия с помощью лазерного излучения [194, 231]. При этом, использование электрокаутера, как правило, в большей степени ограничено узкими размерами наружного слухового прохода малых лабораторных животных. В настоящей работе мы использовали волоконный лазер длиной волны 1,56 мкм (аппарат ИРЭ-Полнос) мощностью 15 Вт, в импульсном режиме. Миринготомическое отверстие формировалось также в задне-нижнем квадранте барабанной перепонки.

3.1.3. Холодная миринготомия с подворачиванием краев перфорации, дополненная установкой тимпаностомической трубки

Данная методика является комбинацией двух физических методов воздействия. По данным литературы, комбинированная техника является наиболее перспективной в разработке эффективной воспроизводимой модели стойкой перфорации барабанной перепонки [194].

Формирование перфорации выполнялось аналогично методу из первой группы (см. подглаву 3.1.1). Далее, после подворачивания краев перфорации, в дефект устанавливалась тимпаностомическая трубка на срок 4 недели. При планировании данного эксперимента, мы начинали использовать широкие вентиляционные трубки Sheehy (внутренний диаметр 1,27 мм). Однако, при их использовании, уже спустя 2 недели наблюдения мы обнаруживали спонтанную экструзию трубок, что не удовлетворяло концепции исследования. В дальнейшем, мы стали использовать удлиненные силиконовые трубки Armstrong (Medtronic) со скошенным проксимальным концом (внутренний диаметр 1,14 мм) (Рисунок 3.2). При использовании данных трубок, мы не сталкивались более со спонтанным их выпадением, поэтому именно такие трубки были использованы в группе 3 в первой части эксперимента.

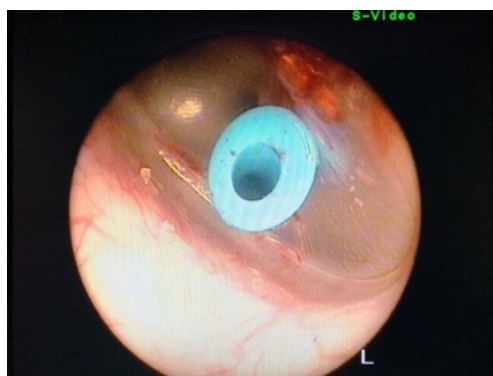


Рисунок 3.2 – Отоэндоскопическая картина после установки тимпаностомической трубки в сформированное методом подворачивания краев миринготомическое отверстие. Отовидеоэндоскопия, правое ухо

3.2. Оценка эффективности моделей стойкой перфорации барабанной перепонки

В первый этап экспериментальной работы было включено 18 взрослых самцов шиншиллы (весом 500 - 800 грамм), средний возраст которых составил $20,8 \pm 3,6$ месяцев.

Все животные были разделены на три равные группы в зависимости от выбранной техники формирования дефекта. В первой группе проводилась холодная мириготомия с подворачиванием краев, во второй - термическая (лазерная) мириготомия, в третьей – холодная мириготомия с подворачиванием краев, дополненная временной установкой тимпаностомической трубки. Во всех трёх группах дефект барабанной перепонки создавался с обеих сторон, под контролем микроскопа в нижних квадрантах барабанной перепонки, диаметр отверстия составлял 4-5 мм.

Различия по весу и возрасту в группах оказались статистически не значимыми. Распределение животных по полу и возрасту в различных группах было равномерным и представлено в Таблице 3.1.

В первой и второй группах, период наблюдения, составляющий 8 недель, начинался сразу после формирования перфорации, в третьей группе - лишь после удаления тимпаностомической трубки, то есть через 4 недели после формирования дефекта.

Для оценки состоятельности сформированных перфораций мы проводили отовидеоэндоскопию с фиксацией размера дефекта на сроке 2, 4, 6, 8 недель наблюдения. Размеры дефектов оценивались с помощью силиконового прозрачного сайзера с миллиметровой разметкой («Устройство для измерения размера перфорации барабанной перепонки», патент № 2753139, 11.08.2021). Под контролем эндоскопа с помощью микрощипцов сайзер укладывался поверх перфорации, размер дефекта определялся по наибольшему диаметру дефекта.

Таблица 3.1 – Распределение животных по полу и возрасту в группах исследования первого этапа работы

Группа	№ животного	Пол	Возраст, мес.	Вес, г
I. Холодная миринготомия с подворачиванием краев дефекта	1	мужской	24	800
	2	мужской	18	650
	3	мужской	18	550
	4	мужской	18	750
	5	мужской	24	500
	6	мужской	24	600
	Средние значения возраста и веса в группе (M±m)			21,0±1,5
II. Термическая (лазерная) миринготомия	7	мужской	24	780
	8	мужской	24	690
	9	мужской	18	650
	10	мужской	24	700
	11	мужской	18	550
	12	мужской	20	650
	Средние значения возраста и веса в группе (M±m)			21,3±1,4
III. Холодная миринготомия с подворачиванием краев дефекта и установкой тимпаностомической трубки	13	мужской	18	580
	14	мужской	24	750
	15	мужской	12	500
	16	мужской	24	600
	17	мужской	24	700
	18	мужской	18	650
	Средние значения возраста и веса в группе (M±m)			20,0±2,2

О состоятельности дефекта свидетельствовали следующие отоскопические признаки: диаметр перфорации не менее 4-5 мм, наличие оmozолелых краев и отсутствие отделяемого. При несостоятельности дефекта животное выбывало из эксперимента.

3.3. Результаты первого этапа эксперимента

Результаты проведенной серии экспериментов приведены в Таблице 3.2. За весь период динамического наблюдения не было выявлено осложнений, в том числе нагноения, формирования холестеатомы.

В группе холодной мириготомии с подворачиванием краев перфорации максимальная длительность перфорации составила 4 недели и наблюдалась в 17 % случаев. Следует отметить, что в первой группе, 75% перфораций закрылись через 2 недели динамического наблюдения.

Во второй группе, перфорации, сформированные с использованием лазерного излучения, оставались состоятельными несколько дольше. Однако, с помощью термической мириготомии также не удалось добиться формирования стойкого дефекта, так как срок персистирования перфорации в данной группе в 50% случаев составил 4 недели, в остальных 50% - 6 недель.

Несмотря на статистически значимую большую среднюю продолжительность персистирования перфораций в группе лазерной мириготомии (группа 2) по сравнению с группой мириготомии с подворачиванием краев (группа 1) (5 и 2,5 недели, соответственно), в обеих группах сформированные перфорации не удовлетворяли основному критерию эффективной модели стойкого дефекта перепонки – длительность более 8 недель.

В третьей группе, после временной установки тимпаностомической трубки, удалось добиться формирования стойкого дефекта (Рисунок 3.3) длительностью более 8 недель у всех животных (12 из 12 перфораций).

Таблица 3.2 – Результаты первого этапа экспериментальной работы

№ животного	Ухо AD/AS	Состоятельность и размер дефекта по данным отовидеоэндоскопии			
		2 недели	4 недели	6 недель	8 недель
I		Мириготомия холодным методом с подворачиванием краев перфорации			
1	AD	Закрыт			
	AS	Закрыт			
2	AD	Закрыт			
	AS	5 мм	Закрыт		
3	AD	Закрыт			
	AS	Закрыт			
4	AD	5 мм	Закрыт		
	AS	Закрыт			
5	AD	Закрыт			
	AS	Закрыт			
6	AD	4 мм	Закрыт		
	AS	Закрыт			
II		Лазерная мириготомия			
7	AD	6 мм	Закрыт		
	AS	5 мм	Закрыт		
8	AD	5 мм	Закрыт		
	AS	5 мм	Закрыт		
9	AD	5 мм	2 мм	Закрыт	
	AS	5 мм	3 мм	Закрыт	
10	AD	5 мм	4 мм	Закрыт	
	AS	6 мм	3 мм	Закрыт	
11	AD	6 мм	4 мм	Закрыт	
	AS	5 мм	4 мм	Закрыт	
12	AD	4 мм	Закрыт		
	AS	5 мм	Закрыт		
III		Мириготомия холодным методом с подворачиванием краев перфорации и установкой тимпаностомической трубки			
13	AD	6 мм	6 мм	6 мм	6 мм
	AS	6 мм	5 мм	5 мм	5 мм
14	AD	6 мм	6 мм	5 мм	5 мм
	AS	6 мм	6 мм	6 мм	6 мм
15	AD	6 мм	6 мм	6 мм	6 мм
	AS	6 мм	6 мм	6 мм	6 мм
16	AD	6 мм	6 мм	6 мм	6 мм
	AS	6 мм	5 мм	5 мм	5 мм
17	AD	6 мм	6 мм	6 мм	6 мм
	AS	6 мм	6 мм	6 мм	6 мм
18	AD	6 мм	6 мм	6 мм	6 мм
	AS	6 мм	6 мм	6 мм	6 мм

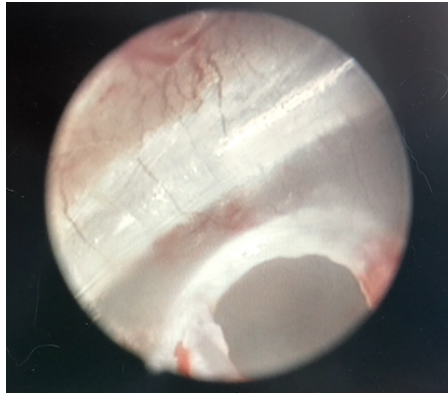


Рисунок 3.3 – Эндоотофотография оmozолелого края стойкого дефекта барабанной перепонки шиншиллы из группы III

Полученные результаты хорошо коррелируют с данными Emami и соавт., которые на основании серии экспериментов сделали вывод о способности лишь несколько отсрочить закрытие дефектов при использовании лазерной мириготомии, даже в сочетании с техникой подворачивания краев перфорации [99, 173]. Здесь следует прокомментировать недавние сообщения о прорегенераторном эффекте лазерного излучения и возможности его использования для закрытия перфораций в клинической практике. По данным современного обзора иностранной литературы по применению лазера в отохирургии, за период с 1975 по 2020 гг. доступно лишь одно сообщение об эффективности миригопластики с помощью облучения дезэпидермизированного края перфорации лазером [111]. Следует отметить, что в данном случае речь идет только о воздействии лазерного излучения низкой мощности [111]. Как в отечественной, так и в зарубежной литературе имеются работы по лазер-ассистированной тимпанопластике, когда энергия лазерного излучения используется либо для лучшего припаивания графта, либо для дезэпидермизации краев перфорации [41, 51, 107, 175]. В данных работах также использовалось лазерное облучение низкой мощности.

Для более детального изучения полученных дефектов, соответствующих критериям стойкой перфорации, было проведено морфологическое исследование. Морфологическому исследованию подлежали барабанные перепонки, перфорации в которых соответствовали отоскопическим критериям формирования стойкого

дефекта, в том числе длительность перфорации более 8 недель, наличие оmozолелых краев, отсутствие отделяемого из среднего уха. Данным критериям соответствовали все 12 образцов из третьей группы, что свидетельствовало о хорошей воспроизводимости модели.

Описание некоторых параметров гистологического исследования изученных образцов перепонки приведено в Таблице 3.3.

Для получения материала животные были выведены из эксперимента на 10 неделе наблюдения (в третьей группе после удаления тимпаностомической трубки), произведен забор височной буллы. Подробное описание процедуры забора материала изложено в подглаве 2.4.2. Под контролем микроскопа прецизионно с использованием отохирургического микроинструментария (микроножниц и микрощипцов) иссекался фрагмент барабанной перепонки, содержащий край перфорации. Затем, после парафинизации выполнялась подготовка гистологического образца для исследования, при этом срезы толщиной 3-3,5 мкм выполнялись в поперечном направлении. Именно такой срез позволяет оценивать свободный край перфорации. Основным интересующим параметром при гистологическом исследовании на данном этапе было подворачивание эпителиального слоя за край перфорации. Соответственно, для адекватного анализа было достаточно использование стандартной окраски гематоксилином-эозином. Для изучения готовых препаратов использовался универсальный микроскоп Leica DM4000 B LED, оборудованный камерой Leica DFC7000 T и программным обеспечением LAS V4.8 (Leica Microsystems, Швейцария).

Таблица 3.3 – Гистологическое исследование барабанных перепонки из третьей группы со сформированными стойкими перфорациями

N AD/AS	Гиперкератоз эпителия	Подворачивание эпителия за край барабанной перепонки	Отсутствие зон пролиферации в крае барабанной перепонки	Диapedез эритроцитов	Скопления фибрина
13AD	+	+	+	-	-
13AS	+	+	+	+	+
14AD	+	+	+	-	-
14AS	+	+	+	-	-
15AD	+	+	+	+	+
15AS	+	+	+	+	+
16AD	+	+	+	-	-
16AS	+	+	+	-	-
17AD	+	+	+	-	-
17AS	+	+	+	-	-
18AD	+	+	+	-	-
18AS	+	+	+	+	+

При гистологическом исследовании края стойкой перфорации обнаружено подворачивание многослойного плоского эпителия за край дефекта, с участками гиперкератоза (Рисунок 3.4).

В некоторых препаратах обнаруживались кровоизлияния между наружным эпителиальным слоем и средним фиброзным слоем. В ходе гистологического исследования перепонки из третьей группы во всех образцах было обнаружено и подворачивание эпителия за край дефекта (Рисунок 3.4 А), а также гиперкератоз (Рисунок 3.4 Б). В некоторых образцах в прикраевой зоне были обнаружены субэпителиальные геморрагические очаги с диapedезом эритроцитов и скоплением фибрина (Рисунок 3.5 В, Г).

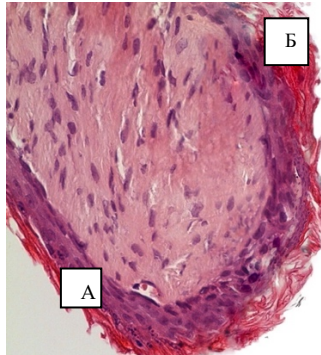


Рисунок 3.4 – Микропрепарат поперечного среза края перфорации барабанной перепонки. А- подворачивающийся эпидермис барабанной перепонки, Б - гиперкератоз. Световая микроскопия, окраска гематоксилин-эозином, увеличение х400

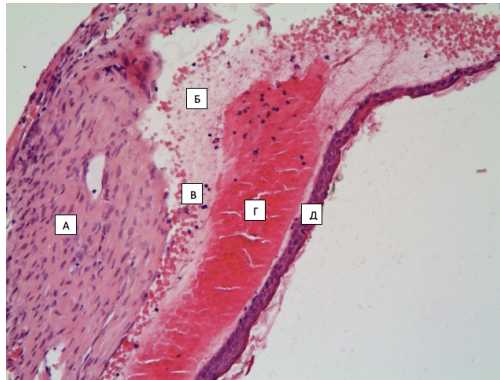


Рисунок 3.5 – Микропрепарат поперечного среза барабанной перепонки, содержащей край перфорации. А – волокнистая соединительная ткань, Б – нити фибрина, В – эритроциты, Г - кровоизлияние, Д - многослойный плоский ороговевающий эпителий. Световая микроскопия, окраска гематоксилин-эозином, увеличение х400

В соответствии с полученными результатами, техника подворачивания краев перфорации может быть отнесена к перспективным методам, относительно простым и легко воспроизводимым, которые по крайней мере могут быть использованы для создания подострых перфораций. Данная методика была впервые описана в 1992 году, Amoils и соавт. сообщали об эффективном формировании стойкого дефекта при ее использовании на лабораторных шиншиллах [68]. Позднее, схожие выводы были сформулированы авторами трех независимых исследований (Parekh et al. 2009; Spiegel et al. 2005; Weber et al. 2006), однако существенным недостатком этих работ было отсутствие данных о гистологическом исследовании сформированных перфораций [182, 209, 234].

Мы обнаружили, что перфорации сформированные комбинированным методом, сочетающим технику подворачивания краев и временную установку тимпаностомической трубки, соответствуют основным критериям эффективной модели стойкой перфорации барабанной перепонки.

Механизмы, лежащие в основе формирования стойкой перфорации барабанной перепонки после установки тимпаностомической трубки были тщательно изучены и описаны Австралийскими учеными в 2016 году [232]. Так, Wang и соавт. провели серию гистологических и иммуногистохимических исследований барабанных перепонки крыс на разных этапах формирования стойких перфораций после установки тимпаностомической трубки [232]. Авторы сравнили полученные данные с результатами исследования краев острой перфорации и нормальной барабанной перепонки. В результате было обнаружено, что в процессе формирования стойкого дефекта перепонки можно выделить три стадии – острое заживление (3-17 дней), переходная (промежуточная) стадия (3-4 недели) и стадия хронизации (6-10 недель). Только на третьей стадии в ходе гистологического исследования обнаруживались утолщение и подворачивание эпителиального слоя за край дефекта, значительное повышение кератина и коллагена, а также макрофагальная инфильтрация и признаки угнетения клеточной пролиферации [232]. Полученные нами результаты морфологического исследования краев перфораций из третьей группы коррелируют с данными австралийских авторов, подтверждая соответствие данных перфораций критериям эффективной модели стойкого дефекта барабанной перепонки.

Глава 4. ВТОРОЙ ЭТАП ЭКСПЕРИМЕНТА: ЗАКРЫТИЕ СТОЙКОЙ ПЕРФОРАЦИИ БАРАБАННОЙ ПЕРЕПОНКИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОГО КОНСТРУКТА

Цель второго этапа работы заключалась в оценке эффективности тканеинженерного способа закрытия стойких перфораций барабанной перепонки на разработанной экспериментальной модели.

Всего во вторую часть эксперимента было включено 24 животных, клетка каждого животного была пронумерована соответствующей арабской цифрой (No. 1-24). Распределение животных по возрасту и весу представлено в Таблице 4.1. Возраст животных в группе I варьировал от 18 до 24 месяцев (средний возраст $21,00 \pm 0,83$), в группе II - от 18 до 36 (средний возраст $21,67 \pm 1,54$). Различия по возрасту и весу между группами I и II были статистически не значимы ($p < 0,05$).

Стойкие перфорации были сформированы во всех барабанных перепонках справа (No. 1-24) и в 12 перепонках слева (No. 7-12 и No. 19-24). Остальные 12 левых барабанных перепонки были оставлены интактными и составили референсную группу для изучения свойств нативной барабанной перепонки исследуемых шиншил (No. 1-6, 13-18).

Все правосторонние барабанные перепонки были разделены на две равные группы лечения. В обеих группах лечения проводилось закрытие перфораций с помощью коллагеновой губки, которая непосредственно перед установкой животному пропитывалась либо раствором основного фактора роста фибробластов (в группе I (No. 1-12)), либо физиологическим раствором (группа II (No. 13-24)).

Все левосторонние перфорации (No. 7-12 и No. 19-24) составили группу контроля (III), интактные левосторонние барабанные перепонки (No. 7-12 и No. 19-24) составили референсную группу для исследования нормальной барабанной перепонки шиншиллы (No. 13-24).

Таблица 4.1 – Распределение животных по возрасту и весу по группам в рамках второго этапа экспериментальной работы

Группа	Порядковый номер животного	ВОЗРАСТ, мес	ВЕС, г
I (bFGF)	1	24	550
	2	18	650
	3	20	650
	4	18	600
	5	20	500
	6	24	700
	7	18	600
	8	18	600
	9	24	700
	10	20	650
	11	24	550
	12	24	600
		Средние значения веса и возраста в группе, M±m	21,00±0,83
II (NaCl, 0,09%)	13	20	600
	14	24	650
	15	24	650
	16	18	550
	17	18	500
	18	18	500
	19	36	700
	20	18	600
	21	20	550
	22	20	600
	23	20	550
	24	24	650
	Средние значения веса и возраста в группе, M±m	21,67±1,54	591,67±19,11

Соответственно, все правосторонние перфорации (N24) были поровну распределены в две группы лечения, а все левосторонние перфорации (N12) - включены в группу контроля. Такое распределение позволило нам увеличить сроки динамического наблюдения за созданной стойкой перфорацией у каждого конкретного животного из обеих групп, которому с противоположной стороны в это время проводилось закрытие дефекта. Планируемое распределение животных по методам исследования в группах представлено в Таблице 4.2.

Применение того или иного метода исследования для каждой перепонки из групп лечения было определено заранее – до начала лечения. Такое предварительное назначение методов исследования в группах было выбрано для возможности случайного распределения методов исследования (морфологических и механических свойств) в случае успешного закрытия перфорации в ходе лечения.

В рамках второго этапа экспериментальной работы все выполняемые манипуляции, включая осмотры (отовидеоэндоскопия), также проводились под общей анестезией для минимизации стресса у животных. При этом, дозировка анестетических препаратов подбиралась в каждом конкретном случае строго индивидуально в соответствии с весом животного и объемом планируемых манипуляций. Так, например, учитывая необходимость частых осмотров, непосредственно перед началом работы, животному вводились дозы, обеспечивающие вводный наркоз, который используется в ветеринарии для осмотров. Если во время осмотра выявлялась необходимость дальнейших более длительных манипуляций (замена губки), то наркоз пролонгировался.

До введения в наркоз животное выдерживало 12-ти часовую голодную диету. Общая анестезия достигалась внутримышечным введением раствора Золетила (в дозе 10 мг/кг) и Ксилазина (в дозе 0,15 мл/кг), что соответствует минимальным дозировкам, используемым для проведения клинических осмотров и кратковременных болезненных процедур. За 15 мин до введения препаратов в качестве премедикации подкожно вводился раствор Атропина сульфата (в дозе 0,05 мг/кг массы животного).

Все манипуляции выполняли с использованием микроскопа Zeiss (Германия), изображения были получены с помощью жёсткого эндоскопа под углом 30 градусов (Karl Storz, Germany), подключенного к контроллеру консоли видеокамеры (Karl Storz).

Таблица 4.2 – Распределение животных по методам исследования в группах в рамках второго этапа экспериментальной работы

Группа	Порядковый номер животного	Правое ухо (Лечение)	Левое ухо (Контроль)	Метод исследования правой барабанной перепонки
I (FGF)	1	Стойкая перфорация, 5 мм	Стойкая перфорация, 5 мм	Гистологическое исследование справа
	2	Стойкая перфорация, 5 мм	Стойкая перфорация, 5 мм	АСМ справа
	3	Стойкая перфорация, 5 мм	Стойкая перфорация, 5 мм	Гистологическое исследование справа
	4	Стойкая перфорация, 5 мм	Стойкая перфорация, 5 мм	АСМ справа
	5	Стойкая перфорация, 5 мм	Стойкая перфорация, 5 мм	Гистологическое исследование справа
	6	Стойкая перфорация, 5 мм	Стойкая перфорация, 5 мм	АСМ справа
	7	Стойкая перфорация, 5 мм	Нативная барабанная перепонка	Гистологическое исследование
	8	Стойкая перфорация, 5 мм	Нативная барабанная перепонка	АСМ
	9	Стойкая перфорация, 5 мм	Нативная барабанная перепонка	Гистологическое исследование
	10	Стойкая перфорация, 5 мм	Нативная барабанная перепонка	АСМ
	11	Стойкая перфорация, 5 мм	Нативная барабанная перепонка	Гистологическое исследование
	12	Стойкая перфорация, 5 мм	Нативная барабанная перепонка	АСМ
II (NaCl, 0,09%)	13	Стойкая перфорация, 5 мм	Стойкая перфорация, 5 мм	Гистологическое исследование справа
	14	Стойкая перфорация, 5 мм	Стойкая перфорация, 5 мм	АСМ справа
	15	Стойкая перфорация, 5 мм	Стойкая перфорация, 5 мм	Гистологическое исследование справа
	16	Стойкая перфорация, 5 мм	Стойкая перфорация, 5 мм	АСМ справа
	17	Стойкая перфорация, 5 мм	Стойкая перфорация, 5 мм	Гистологическое исследование справа
	18	Стойкая перфорация, 5 мм	Стойкая перфорация, 5 мм	АСМ справа
	19	Стойкая перфорация, 5 мм	Нативная барабанная перепонка	Гистологическое исследование
	20	Стойкая перфорация, 5 мм	Нативная барабанная перепонка	АСМ
	21	Стойкая перфорация, 5 мм	Нативная барабанная перепонка	Гистологическое исследование
	22	Стойкая перфорация, 5 мм	Нативная барабанная перепонка	АСМ
	23	Стойкая перфорация, 5 мм	Нативная барабанная перепонка	Гистологическое исследование
	24	Стойкая перфорация, 5 мм	Нативная барабанная перепонка	АСМ

FGF – фактор роста фибробластов, АСМ – атомно-силовая микроскопия

В группе I (N 12) закрытие дефекта производилось тканеинженерным методом “in situ”, в качестве основного терапевтического агента использовался основной фактор роста фибробластов (FGF-b). Раствор, содержащий рекомбинантный человеческий фактор роста фибробластов (100 мкг/мл) наносили на предварительно вырезанную по размерам дефекта коллагеновую губку, которую устанавливали над перфорацией после дезэпидермизации ее краев, таким образом, чтобы она перекрывала ее на 1 -2 мм (Рисунок 4.1).

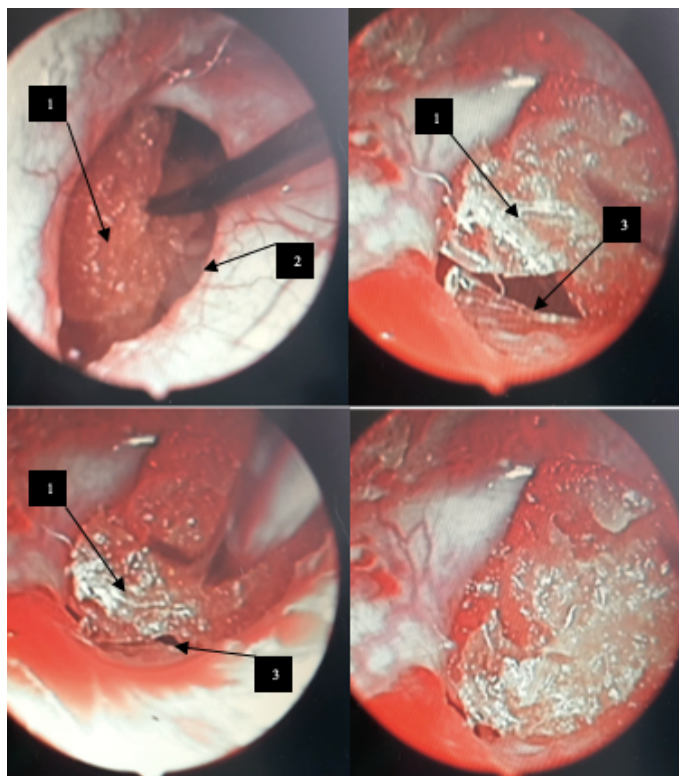


Рисунок 4.1 – Укладывание коллагеновой губки поверх дефекта. Отоэндоскопия, левое ухо. 1- коллагеновая губка, 2- наружный слуховой проход, 3- дезэпителизированный край перфорации

Для определения размера скаффолда из коллагеновой губки использовался прозрачный силиконовый сайзер с миллиметровой разметкой (Рисунок 2.4).

В группе II (N 12) ростовые факторы для закрытия дефекта барабанной перепонки не использовались, дефект закрывался коллагеновой губкой, предварительно пропитанной физиологическим раствором (NaCl, 0,09 %). Этапы закрытия были аналогичны этапам тканеинженерного закрытия, описанного выше.

В обеих группах поверх коллагеновой губки для исключения ее преждевременного выпадения наносился фибриновый клей, что является предпочтительным по данным литературы [138]. Все манипуляции проводились под контролем микроскопа.

У всех животных, которым проводилось закрытие дефекта, для оценки состояния барабанной перепонки спустя 2 недели после проведенной операции удаляли коллагеновую губку и проводили отовидеоэндоскопию. В обеих группах лечения в случае неполного закрытия дефекта, соответствующие лечебные процедуры повторялись по описанной выше методике до 4 раз. При отсутствии эффекта после четырех процедур закрытия, продолжалось динамическое наблюдение за перфорацией без лечения в течение 12 недель, каждые 2 недели. Частота наблюдения подобрана с учетом данных *in vivo* исследований, подтверждающих высвобождение фактора роста фибробластов из коллагенового полимера и его активность в тканях в течение 2 недель [116, 127, 170].

Период наблюдения за животными составлял 12 недель, что соответствует сроку формирования зрелого рубца по данным литературы [14, 48, 54, 148].

По истечении периода наблюдения при условии полного закрытия перфорации, животное выводилось из эксперимента. В качестве метода эвтаназии нами была выбрана передозировка анестетиками. В обеих группах лечения, при условии полного закрытия дефекта, было запланировано гистологическое исследование 6 барабанных перепонок с нечетными порядковыми номерами. Также, было запланировано проведение атомно-силовой микроскопии 6 барабанных перепонок после лечения у животных с четными порядковыми номерами (правое ухо, группа I - № 2, 4, 6, 8, 10, 12 и группа II - № 14, 16, 18, 20, 22, 24).

Глава 5. РЕЗУЛЬТАТЫ ПРИМЕНЕНИЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОГО МЕТОДА ЗАКРЫТИЯ СТОЙКОЙ ПЕРФОРАЦИИ БАРАБАННОЙ ПЕРЕПОНКИ

5.1. Оценка сроков закрытия стойкой перфорации барабанной перепонки

Для определения динамики закрытия дефектов после проведенного лечения проводилась отовидеоэндоскопия. Оценке подлежал размер остаточного дефекта при неполном закрытии, а также состояние слизистой оболочки барабанной полости, состояние краев перфорации, наличие отделяемого в наружном слуховом проходе и барабанной полости. Результаты оценки сроков закрытия дефектов в различных группах представлены в Таблице 5.1.

В группе основного лечения, через 2 недели, то есть после однократной процедуры закрытия перфорации с помощью коллагеновой губки, пропитанной раствором основного фактора роста фибробластов, полного восстановления барабанной перепонки удалось достичь в 9 случаях из 12. Однократное повторение процедуры было эффективно у 2 животных, еще у одного животного дефект полностью закрылся после двукратного повторения процедуры, спустя 6 недель.

В группе лечения с использованием губки без фактора роста спустя 2 недели наблюдения во время осмотра после однократной процедуры закрытия перфорация была обнаружена у всех животных. За весь срок наблюдения в данной группе закрытие перфорации было отмечено в 4 из 12 случаев, при этом процедура лечения повторялась неоднократно: в двух случаях - пять раз, в двух других – два и три раза.

В группе контрольного наблюдения за созданными перфорациями мы не наблюдали спонтанного закрытия сформированных перфораций. Соответственно, в 100 % случаев (12 из 12 перфораций) спустя 12 недель мы наблюдали сохраняющийся дефект левой барабанной перепонки.

Таблица 5.1 – Сроки закрытия стойких перфораций в различных группах в рамках второго этапа экспериментального исследования

Группа	N	Ухо, AD/AS	Осмотр 1 (2 недели)	Осмотр 2 (4 недели)	Осмотр 3 (6 недель)	Осмотр 4 (8 недель)	Осмотр 5 (10 недель)	Осмотр 6 (12 недель)	Метод исслед-я
FGF-b	1	AD	3 мм	Закрытие					Гист.
	2	AD	2 мм	Закрытие					АСМ
	3	AD	Закрытие						Гист.
	4	AD	Закрытие						АСМ
	5	AD	Закрытие						Гист.
	6	AD	Закрытие						АСМ
	7	AD	Закрытие						Гист.
	8	AD	3 мм	2 мм	Закрытие				АСМ
	9	AD	Закрытие						Гист.
	10	AD	Закрытие						АСМ
	11	AD	Закрытие						Гист.
	12	AD	Закрытие						АСМ
NaCl, 0,09%	13	AD	5 мм	3 мм	1 мм	Закрытие			Гист.
	14	AD	5 мм	5 мм	3 мм	3 мм	3 мм	3 мм	н/п
	15	AD	5 мм	5 мм	5 мм	3 мм	3 мм	3 мм	н/п
	16	AD	5 мм	5 мм	5 мм	3 мм	1 мм	Закрытие	АСМ
	17	AD	5 мм	5 мм	5 мм	5 мм	5 мм	5 мм	н/п
	18	AD	5 мм	5 мм	3 мм	3 мм	3 мм	3 мм	н/п
	19	AD	5 мм	5 мм	5 мм	5 мм	5 мм	5 мм	н/п
	20	AD	5 мм	5 мм	3 мм	3 мм	Закрытие		АСМ
	21	AD	5 мм	5 мм	3 мм	3 мм	3 мм	3 мм	н/п
	22	AD	5 мм	5 мм	3 мм	3 мм	3 мм	3 мм	н/п
	23	AD	5 мм	5 мм	5 мм	3 мм	3 мм	Закрытие	Гист.
	24	AD	5 мм	5 мм	5 мм	5 мм	5 мм	5 мм	н/п
Контроль (перфорация)	1	AS	5 мм	5 мм	5 мм	5 мм	5 мм	5 мм	н/п
	2	AS	5 мм	5 мм	5 мм	5 мм	5 мм	5 мм	н/п
	3	AS	5 мм	5 мм	5 мм	5 мм	5 мм	5 мм	н/п
	4	AS	5 мм	5 мм	5 мм	5 мм	5 мм	5 мм	н/п
	5	AS	5 мм	5 мм	5 мм	5 мм	5 мм	5 мм	н/п
	6	AS	5 мм	5 мм	5 мм	5 мм	5 мм	5 мм	н/п
	13	AS	5 мм	5 мм	5 мм	5 мм	5 мм	5 мм	н/п
	14	AS	5 мм	5 мм	5 мм	5 мм	5 мм	5 мм	н/п
	15	AS	5 мм	5 мм	5 мм	5 мм	5 мм	5 мм	н/п
	16	AS	5 мм	5 мм	5 мм	5 мм	5 мм	5 мм	н/п
	17	AS	5 мм	5 мм	5 мм	5 мм	5 мм	5 мм	н/п
	18	AS	5 мм	5 мм	5 мм	5 мм	5 мм	5 мм	н/п

Примечание к Таблице 5. Окрашенные серым цветом ячейки отражают отсутствие динамики при очередном осмотре по сравнению с предыдущим наблюдением после фиксации полного закрытия дефекта. Гист. – гистологическое исследование. АСМ - атомно-силовая микроскопия; н/п – не применимо (в случае неполного закрытия перфорации гистологическое исследование пролеченной барабанной перепонки не проводилось, так же как и атомно-силовая микроскопия).

Помимо очевидных различий по количеству животных с полностью закрытыми перфорациями (Группа I – 12, Группа II - 4), также в группах отличались сроки, необходимые для достижения полного эффекта. Так, средний срок закрытия перфораций в группе I составил $2,67 \pm 0,39$, а в группе II - $10,50 \pm 1,11$. Разница между значениями оказалась статистически достоверной ($p < 0,05$).

5.2. Оценка морфологических свойств регенератов барабанной перепонки

Для получения подробных данных о структуре нативной барабанной перепонки шиншиллы была обследована референсная группа, которую составили 12 интактных левых барабанных перепонок. Во второй части эксперимента с целью гистологического изучения нормальной структуры барабанной перепонки шиншиллы была проведена световая, поляризационная и фазово-контрастная микроскопия 6 образцов перепонок (AS № 7, 9, 11, 19, 21, 23), которые не подвергались никакому воздействию (Таблица 5.2).

Таблица 5.2 – Образцы нативных и восстановленных барабанных перепонок, подлежащих гистологическому исследованию в рамках второго этапа экспериментального исследования

Гистологическое исследование				
Группа I (FGF+коллагеновый скаффолд)		Группа II (NaCl, 0.9%+коллагеновый скаффолд)		Нативная барабанная перепонка
<i>N</i>	<i>Срок закрытия</i>	<i>N</i>	<i>Срок закрытия</i>	<i>N</i>
1 AD	4 недели	13 AD	8 недель	7 AS
3 AD	2 недели	23 AD	12 недель	9 AS
5 AD	2 недели			11 AS
7 AD	2 недели			19 AS
9 AD	2 недели			21 AS
11 AD	2 недели			23 AS
6 образцов		2 образца		6 образцов

Соответственно, было выполнено гистологическое исследование поперечных срезов 6 нативных барабанных перепонки, окрашенных гематоксилином-эозином. Результаты данной серии морфологических исследований приведены в Таблице 5.3.

Таблица 5.3 – Морфологическое исследование образцов нативной барабанной перепонки

N	Количество слоев тканей	Количество слоев клеток в эпителии	Выраженность слоя кератина	Количество слоев фиброзных волокон	Количество слоев клеток во внутреннем эпителиальном слое
7	3	6-7	Тонкий слой	2	1
9	3	5-6	Отсутствует	2	1
11	3	6-7	Тонкий	2	1-2
19	3	6-7	Тонкий	2	1-2
21	3	6-7	Отсутствует	2	1-2
23	3	6-7	Тонкий	2	1

Наружная сторона нативной барабанной перепонки выстлана многослойным плоским эпидермальным эпителием, содержащим 6-7 слоев клеток, при этом характерные для кожи слои не выражены. На поверхности эпителия определяется тонкий слой кератина (Рисунок 5.1).

Внутренняя поверхность нативной барабанной перепонки выстлана одно-двуслойным эпителием. Между эпителиальными слоями располагается фиброзный слой, состоящий из фибробластов и коллагеновых волокон. Веретеновидные фибробласты в наружном слое под эпидермисом срезаны в основном поперёк, что говорит об их продольной ориентации, так же ориентированы и коллагеновые волокна, а во внутреннем слое - продольно, что соответствует их циркулярному расположению (Рисунок 5.1). Такое строение фиброзного слоя соответствует структуре нативной барабанной перепонки.

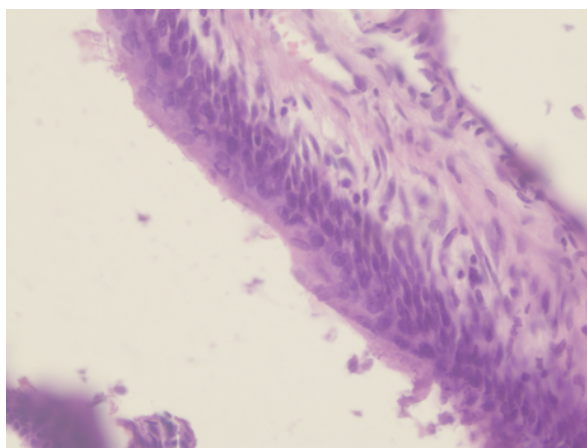


Рисунок 5.1 – Поперечный срез нативной барабанной перепонки. Световая микроскопия, Г-Э, увеличение 400х

Морфологическое исследование восстановленных перепонки (регенератов) из обеих групп лечения проводилось спустя 12 недель после закрытия перфораций. В соответствии с фактическими результатами закрытия дефектов в рамках второго этапа эксперимента было проведено гистологическое исследование 6 барабанных перепонки из первой группы (FGF+коллагеновый скаффолд) и 2 перепонки из второй группы (NaCl, 0,9%+коллагеновый скаффолд) (Таблица 5.3).

Следует отметить, что несмотря на восстановление всех трех слоев в регенератах из группы I (FGF+коллагеновый скаффолд), полноценная регенерация эпителиальных выстилок обнаруживалась не во всех образцах. Так, у 2 из 12 животных первой группы (N1, N5) несмотря на восстановление обоих эпителиальных слоев, с наружной стороны регенерата местами отмечался рост менее зрелого, чем в нормальной ткани многослойного эпителия.

При фазово-контрастной микроскопии восстановленных участков барабанной перепонки из группы I (FGF+коллагеновый скаффолд) отчетливо прослеживалась волокнистая структура пучков (Рисунок 5.2).

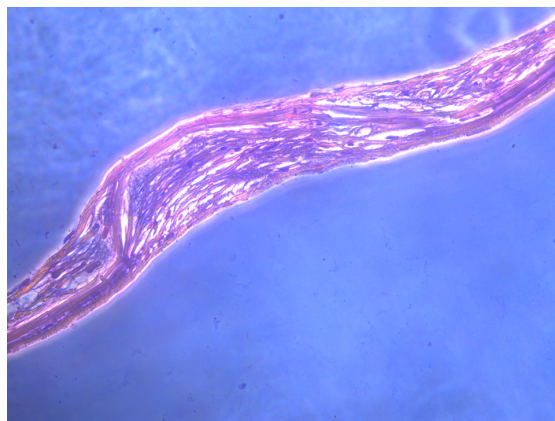


Рисунок 5.2. Поперечный срез барабанной перепонки, восстановленной тканеинженерным методом (Группа I), фазово-контрастная микроскопия, окрашивание Г-Э, увеличение 400х

При исследовании одного образца (N1, AD) из первой группы в соединительнотканном слое местами прослеживались участки разрыхления (Рисунок 5.3). Возможно, такой вариант был обусловлен более поздним закрытием дефекта данной перепонки. В плотных участках всех образцов видны коллагеновые пучки, которые состоят из плотно прилегающих друг к другу коллагеновых волокон.

Клеточные элементы в этих плотных пучках представлены в основном фибробластами, как правило, срезанными поперёк, то есть имеющими продольное расположение.

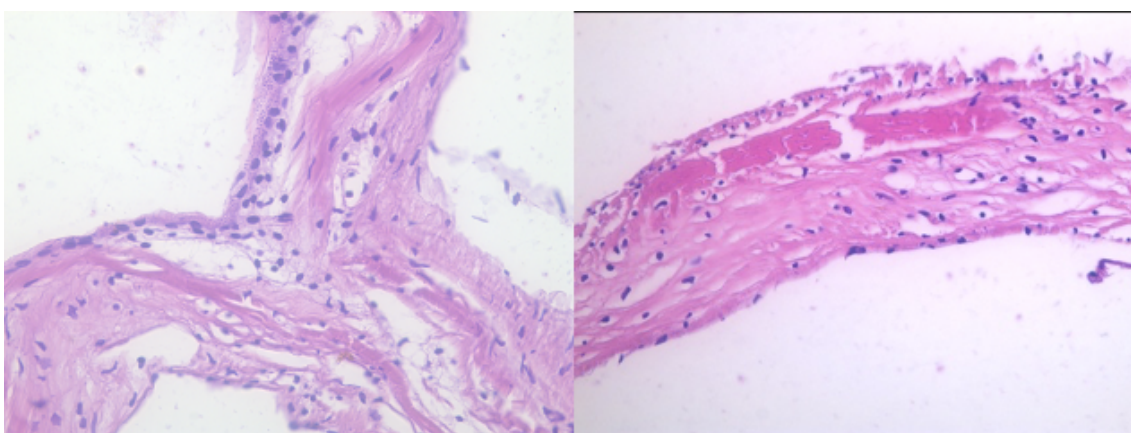


Рисунок 5.3 – Поперечный срез барабанной перепонки (N1, AD), восстановленной тканеинженерным методом (Группа I), световая микроскопия, Г-Э, увеличение 400х

При поляризационной микроскопии коллагеновые волокна дают анизотропию, более выраженную в плотных пучках (Рисунок 5.4). Такая гистологическая картина обнаруживалась практически во всех исследуемых образцах, за исключением одного образца (N1, AD).

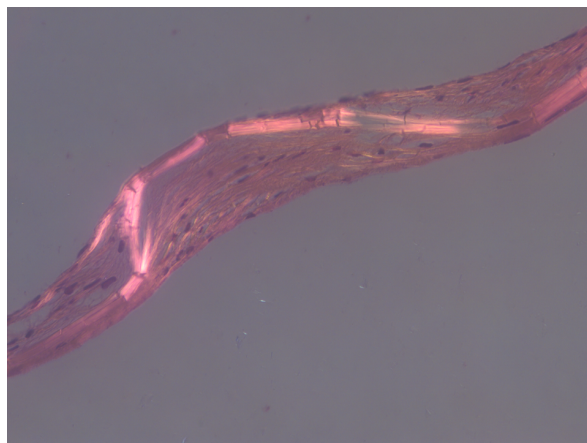


Рисунок 5.4 – Поперечный срез регенерата барабанной перепонки из группы I. Поляризационная микроскопия, Г-Э, увеличение 400х

В фиброзной мембране последнего есть участки разрыхления коллагеновых структур. В этих участках коллагеновые волокна в пучках разрыхлены, хотя, отдельные пучки остаются плотными. При поляризационной микроскопии чёткую анизотропию дают только плотные пучки, а в рыхлой соединительной ткани анизотропия слабая или отсутствует (Рисунок 5.5(А)). Фазово-контрастная микроскопия позволяет выявить волокнистость в рыхлой зоне (Рисунок 5.5(Б)).

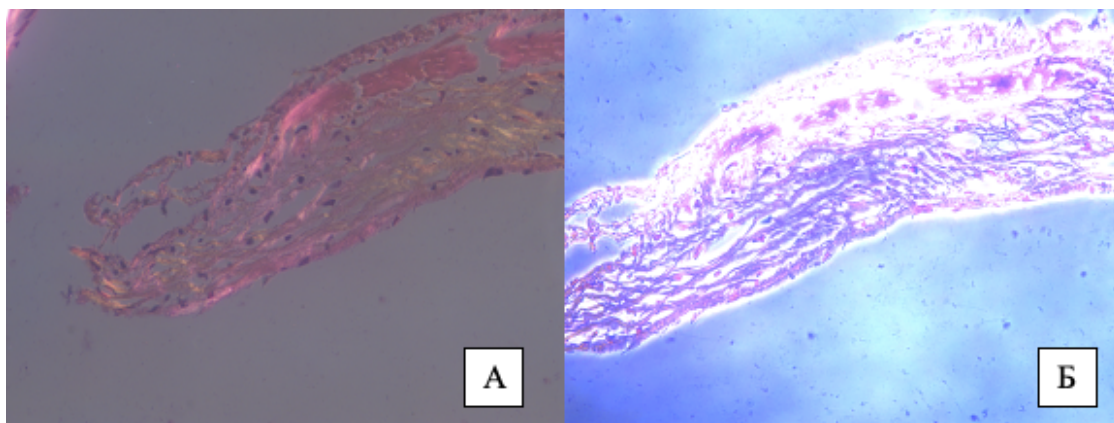


Рисунок 5.5 – Поперечный срез барабанной перепонки регенерата из группы I (N1, AD). А - поляризационная микроскопия, Б - фазово-контрастная микроскопия, Г-Э, увеличение 400х

В соответствии с планом исследования и фактическими случаями закрытия в группе II было выполнено гистологическое исследование двух восстановленных барабанных перепонки (Таблица 5.3). При морфологическом изучении данных регенератов в обоих случаях на месте дефекта обнаружена мембрана, представленная двумя слоями – тонким фиброзным и эпителиальным (Рисунок 5.6).

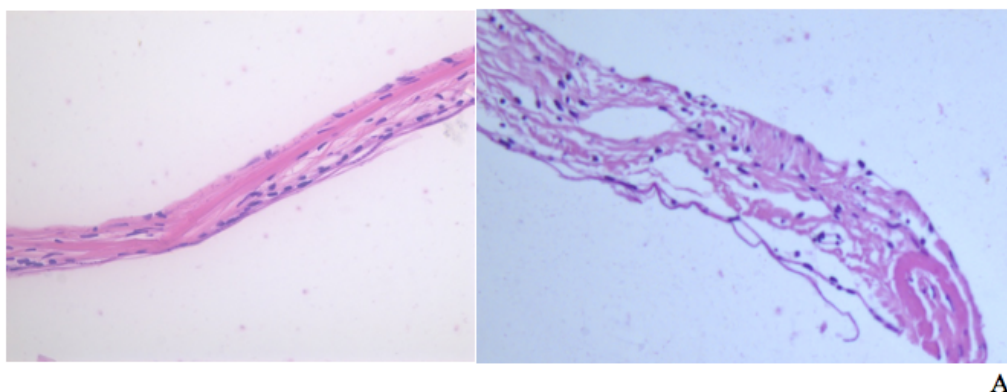


Рисунок 5.6 – Поперечный срез регенерата барабанной перепонки из группы II. А – участок разрыхления коллагеновых волокон с очаговой лимфо-макрофагальной инфильтрацией. Световая микроскопия, окраска Г-Э, 400х

В фиброзной мембране коллагеновые волокна в пучках разрыхлены. Важно отметить, что в участках выраженного разрыхления фиброзного слоя отмечается умеренный отек и очаговая лимфо-макрофагальная инфильтрация. (Рисунок 5.6 (А)).

Помимо классического гистологического исследования, проводилась балльная оценка морфологических свойств регенератов из группы I и II. В соответствии с результатами исследования нормальной барабанной перепонки, было выделено 7 гистологических признаков: количество слоев тканей, количество слоев клеток в эпителии, количество кератина на поверхности эпителиального слоя, упаковка волокон в фиброзном слое, инфильтрация (Рисунок 5.4). По каждому из 7 признаков проводилось сравнение регенератов с нативной барабанной перепонкой по 3-балльной системе: 0 – полное соответствие норме, 1 – незначительные отклонения от нормы, 2 – умеренные отклонения от нормы, 3 – выраженные отклонения от нормы.

После статистической обработки полученных данных морфометрии, достоверно значимые различия ($p < 0,05$) между медианными значениями баллов в группах I и II были выявлены по следующим признакам: число слоев в перепонке, число слоев фиброзных волокон, упаковка волокон, число слоев клеток в эпителии (Рисунок 5.7).



Рисунок 5.7 – Морфометрическая оценка регенератов барабанных перепонки из групп лечения

Итак, во всех гистологических препаратах нативной барабанной перепонки мы фиксировали плотную упаковку коллагеновых волокон в фиброзном слое. В группе лечения тканеинженерным способом плотная упаковка коллагеновых волокон во

всех полях зрения была отмечена у 9 из 12 животных, в остальных случаях при осмотре обнаруживались участки рыхлой упаковки волокон, однако суммарно плотная упаковка преобладала в каждом образце перепонки животных из данной группы.

Особенно стоит выделить количество слоев в восстановленных участках барабанных перепонки. В группе с использованием основного фактора роста фибробластов мы наблюдали восстановление всех трех слоев барабанной перепонки, соответственно структуре нативной барабанной перепонки, в 100% случаев.

В контрольной группе, после закрытия с использованием коллагеновой губки, пропитанной физиологическим раствором, восстановленный фрагмент содержал лишь два слоя. При этом у 100 % исследованных животных данной группы внутренний эпителиальный слой отсутствовал, а фиброзный слой был представлен рыхлой волокнистой тканью.

По данным гистологического исследования, строение регенератов из I группы соответствовало макро- и микроструктуре нативной барабанной перепонки. При этом, восстановление трёхслойной структуры наблюдалось только в барабанных перепонках, восстановленных тканеинженерным методом [49, 50].

5.3. Оценка локальных механических свойств регенератов барабанной перепонки

Для оценки механических свойств неизменной и восстановленной барабанной перепонки применяли атомно-силовую микроскопию. Основываясь на данных литературы, была проведена децеллюляризация образцов регенератов барабанных перепонки с последующей атомно-силовой микроскопией из различных групп.

Атомно-силовая микроскопия проводилась на стеклянной чашке Петри: в жидкой среде. Все снимки сделаны на одном кантилевере ScanAsyst-FLUID (радиус закругления $\text{tip radius}=20\text{nm}$), разрешение 512 точек, коэффициент жесткости $k=0,7\text{ Н/м}$, скорость сканирования 0,9-1 Гц, длина балки $L=70\text{мкм}$, резонансная частота $f_0=150\text{кГц}$, размер снимков $50\times 50\text{ мкм}$. Предварительно с помощью оптического микроскопа определялась зона сканирования ($10\times 10\text{ мкм}$). В зоне сканирования выполнялось 1024 измерения модуля упругости (Рисунок 5.8).

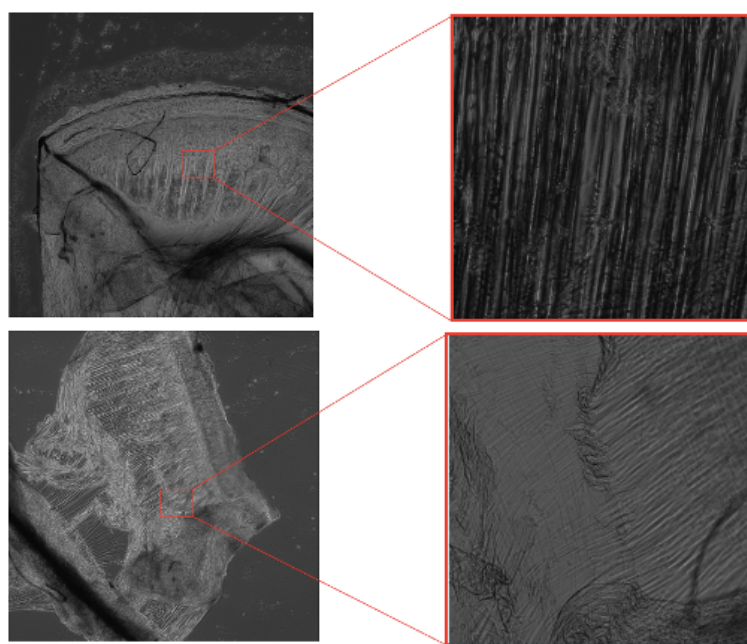


Рисунок 5.8 – Этапы определения зоны сканирования с помощью световой микроскопии перед началом проведения наноиндентирования

При наноиндентировании получены карты распределения значений модуля упругости (модуля Юнга) по поверхности нормальной барабанной перепонки. Исходя из полученных данных, были вычислены средние значения модуля для нормальной барабанной перепонки. Медианы модуля Юнга для наружной и внутренней сторон нормальной барабанной перепонки не имели статистически значимых различий и составляли 5,80 и 5,83 МПа ($p<0,05$) соответственно. При статистической обработке было вычислено среднее значение модуля Юнга нормальной барабанной перепонки – $5,82\pm 2,5\text{ МПа}$, ($M\pm m$, $p<0,05$).

При сканировании поверхности нормальной барабанной перепонки шиншиллы получены следующие данные: имеются два вида направления волокон: радиальное и тангенциальное (по окружности). Волокна плотно лежат в радиальном направлении, и редко переплетаются одинокими фибриллами в тангенциальном направлении что подтверждает структуру барабанной перепонки по данным литературы (Рисунок 5.9).

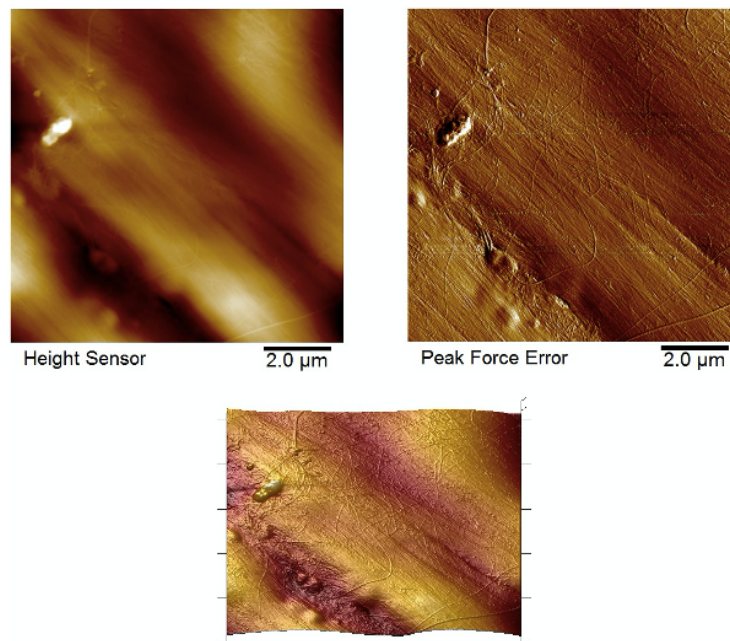


Рисунок 5.9 – Поверхностная топография фиброзного слоя нативной барабанной перепонки. Плотная упаковка коллагеновых фибрилл. Указатель масштаба = 2мкм. Атомно-силовая микроскопия, в жидкой среде. Канал Peak Force Error показан для наглядности структуры фибрилл

Важным параметром при оценке полноценной регенерации ткани барабанной перепонки является восстановление ее функции, которая определяется упругостью перепонки. Для оценки биомеханических свойств барабанной перепонки применялась атомно-силовая микроскопия. Исследование предварительно децеллюляризированных препаратов проводилось на стеклянной чашке Петри, в жидкой среде (буферный раствор). Соответственно, для изучения механических параметров из группы тканеинженерного лечения был произведен забор восстановленных перепонки у всех животных с четными номерами (N 2, 4, 6, 8, 10, 12), а и из группы контроля – у тех животных, у которых мы наблюдали полное

закрытие дефекта (N 16 и 20). Разница в количестве исследуемых образцов в группах обусловлена меньшим числом успешных закрытий дефектов в группе контроля. Также было произведено 6 исследований нативных барабанных перепонки для получения данных о механических параметрах барабанной перепонки в норме.

Для изучения топографии (поверхностной структуры) и измерения модуля упругости (E) использовался атомно-силовой микроскоп Bruker Bioscope Resolve (фото). Все снимки сделаны на одном кантилере ScanAsyst-FLUID (радиус закругления 12nm), разрешение 512 точек, коэффициент жесткости $k=0,79$ Н/м, скорость сканирования 0,9-1 Гц, длина балки $L=70$ мкм, резонансная частота $f_0=150$ кГц, размер снимков 10x10 мкм.

Изучение топографии фиброзного слоя позволяло изучить упаковку и ультраструктуру коллагеновых фибрилл. На поверхности восстановленной с помощью рекомбинантного основного фактора роста фибробластов в сочетании с коллагеновой губкой, применяемой в качестве скаффолда барабанной перепонки обнаружены переплетённые упорядоченные коллагеновые волокна, при этом отмечается плотная упаковка фибрилл коллагена (Рисунок 6.1). В фиброзном слое регенератов из группы II топография местами соответствует плотной упаковке фибрилл, однако на БОльшем протяжении представлены более рыхлые отдельно лежащие волокна (Рисунок 6.1).

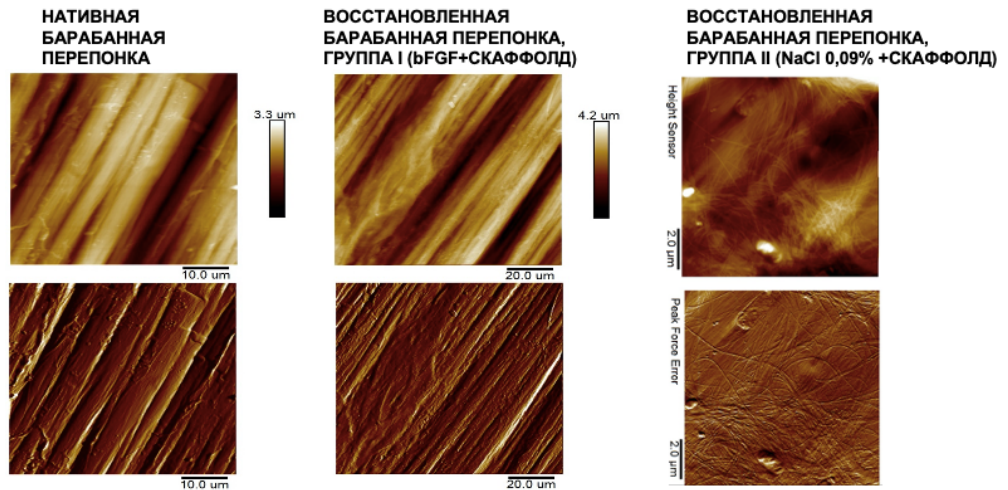


Рисунок 6.1 – Сравнительная таблица топографии фиброзных слоёв нативной барабанной перепонки и регенератов из группы I и II

Помимо изучения топографии для количественной оценки локальных механических свойств были использованы значения модуля упругости (модуль Юнга), полученные при наноиндентировании фиброзного слоя. Согласно проведенному предварительному статистическому анализу данных прямой корреляции в них не выявлено. Распределение значений модуля упругости по группам представлено ниже (Рисунки 6.2-6.4).

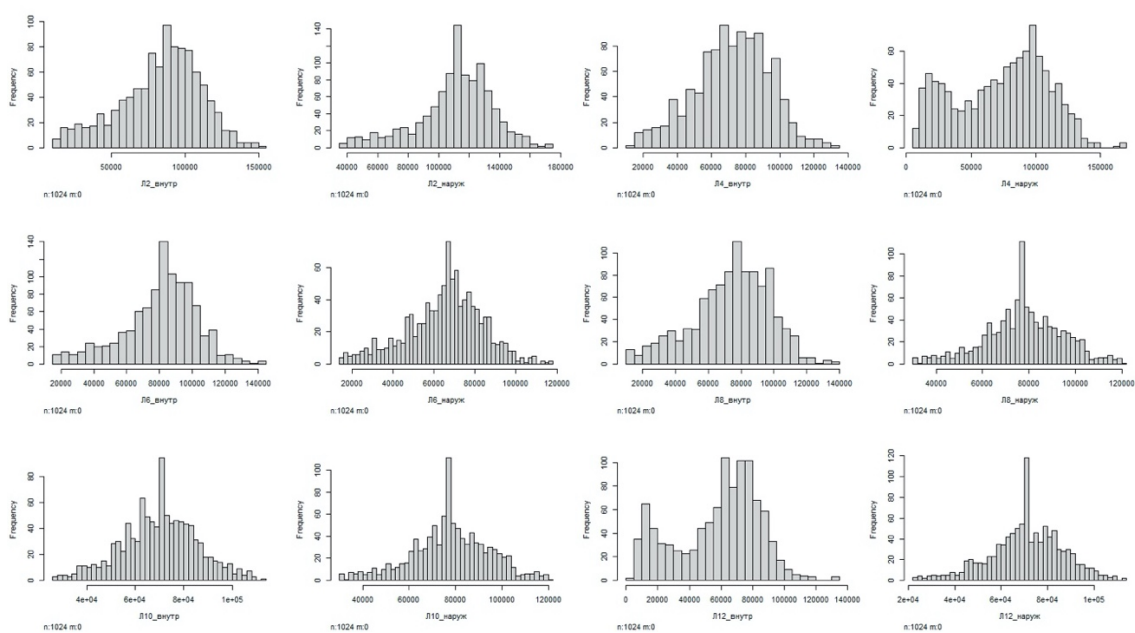


Рисунок 6.2 – Распределение значений модуля упругости фиброзного слоя барабанной перепонки, восстановленной тканеинженерным методом (Группа I)

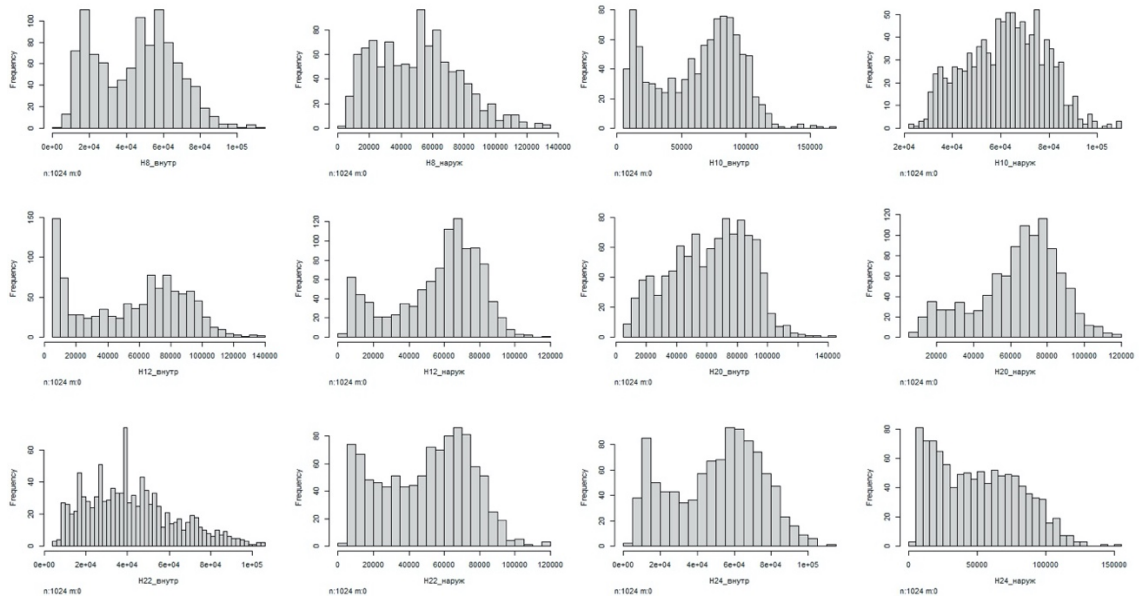


Рисунок 6.3 – Распределение значений модуля упругости фиброзного слоя нормальной барабанной перепонки шиншиллы (Группа III)

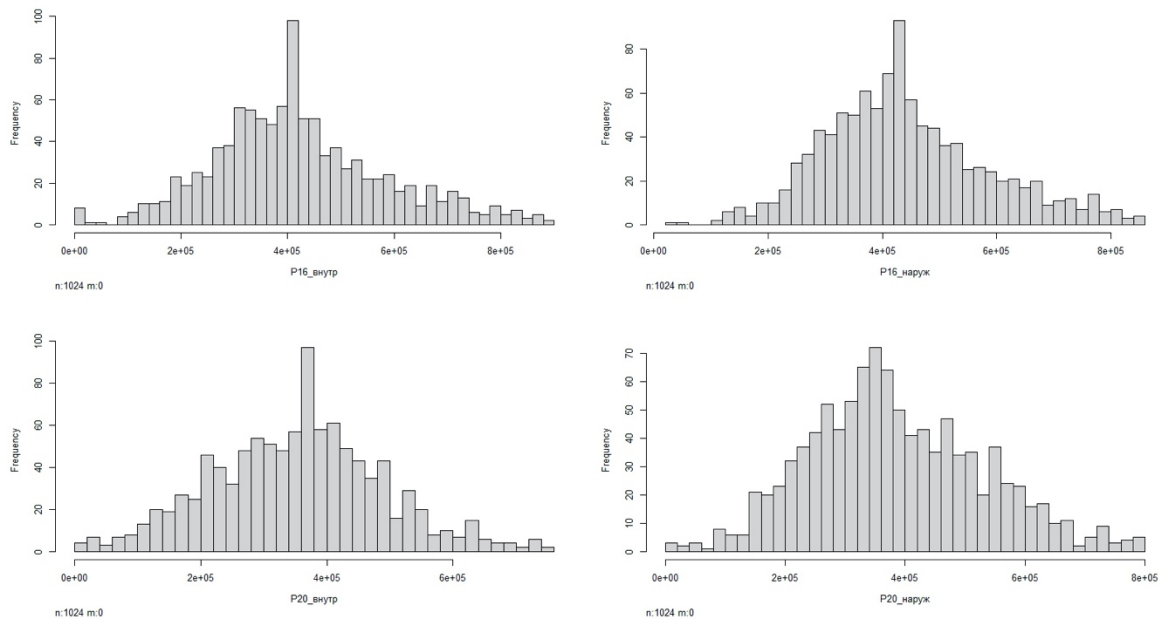


Рисунок 6.4 – Распределение значений модуля упругости фиброзного слоя барабанной перепонки, восстановленной с использованием коллагенового скаффолда, пропитанного физ. раствором (Группа III)

После усреднения полученных данных в единую таблицу внесены все значения мер центральной тенденции по группам (Таблица 5.4). Средние значения модуля Юнга с внешней и внутренней сторон регенератов из Группы I составили $7,8 \pm 2,2$ МПа и $7,3 \pm 2,3$ МПа, соответственно. Средние значения модуля Юнга в

группе II оказались намного выше и составили $41,2 \pm 14,5$ МПа для внешней стороны и $38,7 \pm 14,9$ МПа – для внутренней стороны.

Таблица 5.4 – Распределение мер центральной тенденции, минимальных и максимальных значений модуля упругости в группах исследования (КРа)

	Группа I		Группа II		Группа III (норма)	
	внешн	внутр	внешн	внутр	внешн	внутр
min	5540	4100	988	1730	1580	3740
max	175000	155000	860000	891000	151000	167000
Медиана	74075	74900	400625	387625	58062,5	58300
Ср. знач.	77862,31	73041,04	412499,07	387156,59	55378,57	52903,75
Ст. откл.	22424,32	23031,84	145212,93	149325,49	24272,60	26310,35

Min- минимальное значение модуля упругости в группе, max – максимальное значение модуля упругости в группе, ср. знач. – среднее арифметическое, ст. откл. – стандартное отклонение.

Меры центральной тенденции (средние значения) и разброса (стандартное отклонение) между группами оказались весомо различными ($p < 0,05$). Для проведения дальнейших статистических тестов сравнения выборок была проведена проверка на нормальность распределения.

Было построено распределение полученных в ходе исследования данных и выполнено сравнение с нормальным (Рисунок 6.5).

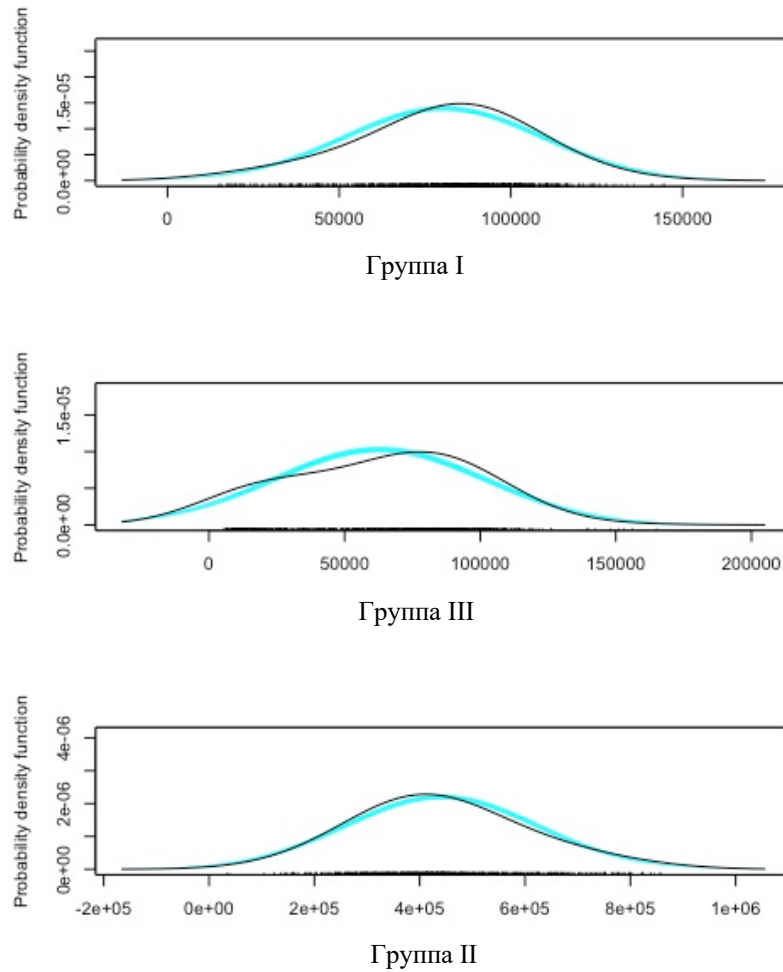


Рисунок 6.5. Визуальный графический анализ распределения в разных группах. Чёрная линия – реальное (эмпирическое) распределение величин; голубая линия – теоретическое стандартное нормальное распределение

Вывод, который можно сделать на основе визуального графического анализа – полученные в ходе исследования данные незначительно, но отличаются от нормального распределения.

Для более точной проверки на нормальность был выбран другой очень часто используемый графический способ проверки характера распределения данных - построение так называемых графиков квантилей (Q-Q plots, Quantile-Quantile plots). Данный графический анализ также подтверждает ненормальность распределения данных. (Рисунок 6.6).

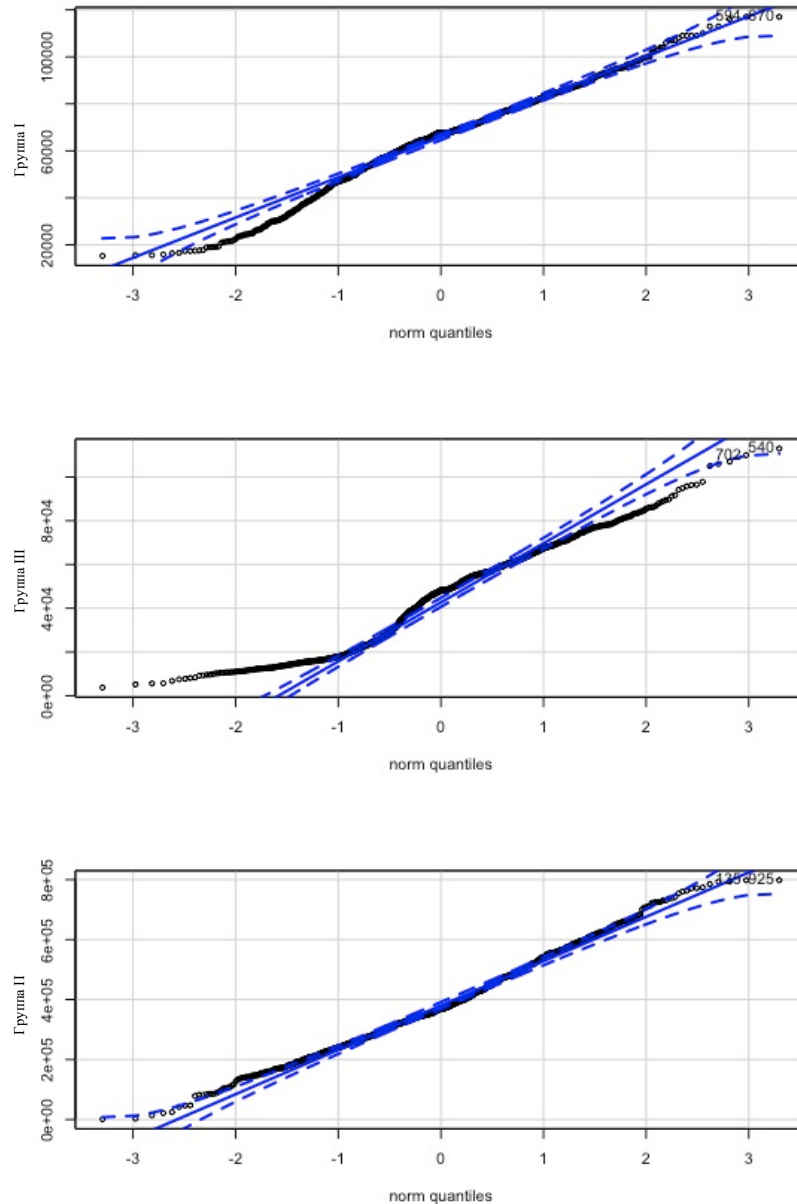


Рисунок 6.6 – Графики Q-Q plots для оценки нормальности распределения данных в группах. Пунктирные линии - доверительный 5% интервал для утверждения о нормальности распределения

Полученные при помощи распространенного теста Шапиро-Уилка вероятности ошибки p оказались много меньше установленного уровня значимости (0,05), следовательно нулевая гипотеза о нормальности отклоняется (Таблица 5.5).

Таблица 5.5 – Проверка на нормальность распределения с помощью теста Шапиро-Уилка

	Леченные	Норма	Рубец
Количество наблюдений в выборке	1024	1024	1024
W значение	0.94998	0.95787	0.98197
p-value	$\ll 0,05 (2.2e^{-16})$	$\ll 0,05 (2.2e^{-16})$	$\ll 0,05 (6.025e^{-10})$

W – значение статистики теста; p-value – уровень значимости для решения о принятии или отвержении нулевой гипотезы о нормальности распределения.

Далее, мы сравнивали значения модулей упругости между группами I и III, и между II и III. То есть модули упругости регенератов с полученными нормальными значениями.

Учитывая поверхностный характер индентаций, в каждой группе мы проводили измерения модуля упругости для наружной и внутренней сторон фиброзного слоя, поэтому статистические тесты проводились для показателей по каждой из сторон отдельно. Выборки считаются независимыми. Соответственно, проведено 4 теста:

1. Группа I (FGF + коллагеновый скаффолд) внутренняя ~ Группа III (норма) внутренняя
2. Группа I (FGF + коллагеновый скаффолд) внешняя ~ Группа III (норма) внешняя
3. Группа II (физ. раствор + коллагеновый скаффолд) внутренняя ~ Группа III (норма) внутренняя
4. Группа II (физ. раствор + коллагеновый скаффолд) внешняя ~ Группа III (норма) внешняя

Для статистического анализа использовался критерий Манна-Уитни, который является непараметрической вариацией критерия Уилкоксона (Wilcoxon rank test) [229-231].

По данным проведённого анализа различия в значениях модуля упругости между Группой I (FGF + коллагеновый скаффолд) и Группой III (норма) не являются статистически значимыми и носят случайный характер. Причем, данное

утверждение справедливо как для сравнения значений, полученных с внутренней стороны ($p\text{-value} = 0.07143$), так и с внешней стороны ($p\text{-value} = 0.07122$).

Значения модуля упругости в Группе II (физ. раствор + коллагеновый скаффолд) статистически значимо отличались от значений в Группе III (норма). Для значений модуля, полученных с внутренней стороны в этих группах $p\text{-value} = 0.004329$, для значений внешней стороны $p\text{-value} = 0.002165$.

Как видно, рассчитанные $p\text{-value}$ оказались много меньше установленного порогового значения равного 0,05, что позволяет отвергнуть нулевую гипотезу и сделать заключение о наличии статистически значимых различий между выборками (Группа II и Группа III).

Рассмотрим измерения, полученные внутри каждой из групп: Группа I (FGF + коллагеновый скаффолд), Группа II (физ. раствор + коллагеновый скаффолд) и Группа III (норма) для того, чтобы выявить статистически достоверные различия между значениями модуля Юнга внутренней и наружной сторон внутри каждой группы.

Как и в ранее проведенных тестах, использовался критерий Манна-Уитни, но с поправкой в расчетах на зависимость выборок (параметр $\text{paired} = \text{TRUE}$). По данным анализа, рассчитанные $p\text{-value}$ оказались больше принятого уровня значимости (0,05) и составили в Группе III (норма) - 0,4375, в Группе I (FGF + коллагеновый скаффолд) – 0,2188, в группе II (физ. раствор + коллагеновый скаффолд) – 0,5, соответственно. Такие результаты позволяют сделать заключение об отсутствии существенной разницы между средними значениями выборок (внутренние и наружные) во всех трёх группах.

Значения модулей упругости фиброзного слоя нормальной барабанной перепонки (Группа III) и фиброзного слоя регенерата из Группы I (bFGF+ скаффолд) сопоставимы. Значения модулей упругости фиброзного слоя нормальной барабанной перепонки и перепонки, восстановленной без использования фактора роста (Группа II) значимо отличались.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Хронический средний отит – распространенная патология, которая сопровождается снижением слуха вследствие нарушения звукопроводения, стойкой перфорацией барабанной перепонки, периодическими выделениями из уха, а также может осложняться вторичной нейросенсорной тугоухостью и вестибулярной дисфункцией [243].

Наличие стойкого дефекта барабанной перепонки требует хирургического лечения. По данным литературы большинство острых перфораций, в особенности посттравматических, закрываются самостоятельно. Нарушение регенерации барабанной перепонки обусловлено, как правило, сочетанием нескольких факторов, среди которых – хронизация воспалительного процесса, эпителизация краев перфорации, недостаточная микроциркуляция и дефицит регуляторных факторов роста [99, 208, 219].

На современном этапе, доступным для пациентов способом пластического закрытия перфорации барабанной перепонки является операция мирингопластика с использованием в качестве аутографта фасции височной мышцы, хряща или надхрящницы. В настоящее время, в литературе описано много различных техник выполнения данного хирургического метода, которые могут применяться в зависимости от особенностей локализации дефекта, его размеров, анатомических особенностей [71,117,130, 240].

Несмотря на то, что эффективность мирингопластики, по данным большинства авторов, достигает 80%, к неудовлетворительному исходу операции могут привести смещение или неприживание трансплантата в раннем или позднем послеоперационном периоде [8]. Согласно данным литературы, реперфорация барабанной перепонки возникает в 7 - 57% случаев [52].

В настоящее время возрастает интерес к исследованиям новых альтернативных способов закрытия стойких перфораций барабанной перепонки, в

частности к доступным тканеинженерным подходам и методам регенеративной медицины [59].

Регенеративная (восстановительная) медицина объединяет различные терапевтические и хирургические технологии, направленные на частичную или полную компенсацию функций поврежденных или утраченных органов (тканей). Тканевая инженерия представляет собой подход к созданию имплантируемых тканей и органов, использующий при создании биологических заместителей фундаментальные структурно-функциональные взаимодействия в нормальных и патологически измененных тканях для восстановления или улучшения функционирования тканей. В основе тканеинженерного подхода лежит взаимодействие трёх основных факторов – клеток, скаффолда и регуляторных факторов. Скаффолд представляет собой опору с определенными физико-химическими характеристиками, чаще всего соответствующими матриксу восстанавливаемой ткани. Регуляторные факторы включают различные факторы роста, задача которых стимулировать пролиферацию и миграцию соответствующих клеток. Лишь взаимодействие этих компонентов способно обеспечить полноценную регенерацию ткани.

Процесс заживления барабанной перепонки называют уникальным, подчеркивая главную особенность - восстановление эпителия в данном случае происходит перед регенерацией фиброзного слоя [31, 113, 228].

Сторонники структурной теории считают наиболее важным фактором отсутствие опоры для регенерации эпителиального слоя. Соответственно, вероятность закрытия дефекта в таком случае должна быть обратно пропорциональна размерам дефекта, что не всегда соответствует действительности. Авторы данной теории дополняют теорию тем, что при больших дефектах также возможно повреждение центров роста эпителия в сохранной части перепонки, что может привести к недостаточной регенерации [179].

Согласно гистологической теории, в склонных к персистированию перфорациях изначально существует патологический паттерн эпителизации, проявляющийся в стремлении эпидермиса подворачиваться к внутреннему слою

барабанной перепонки вместо формирования своеобразного мостика через дефект [68, 113, 162].

Теории инфекционного генеза стойкой перфорации можно разделить на две основные группы. Согласно одной из них, инфицирование ведет к нарушению микроциркуляции и доставки факторов роста, что тормозит пролиферацию, согласно другой – инфекционный агент, наоборот, чрезмерно активизирует пролиферацию, что ведёт к эпидермизации краёв перфорации и невозможности спонтанного закрытия дефекта [208, 211].

Основная идея регенеративной медицины в отиатрии - вместо замещения дефекта аутооттрансплантатами - то есть иными по структуре соединительнотканными элементами, попытаться восстановить нативную структуру барабанной перепонки за счет стимуляции собственного регенеративного потенциала. Возможность применения так называемого “in situ” подхода в отиатрии обусловлена наличием зон эндогенного регенеративного потенциала барабанной перепонки [129, 148, 159].

Применение тканеинженерного подхода для закрытия стойких перфораций барабанной перепонки является достаточно перспективным методом. Данный подход решает несколько проблем, препятствующих заживлению ткани. Коллагеновый скаффолд служит опорой для регенерирующего эпителия, а факторы роста в составе конструктора стимулируют собственный регенеративный потенциал барабанной перепонки, через активацию пролиферации и миграции клеток [163, 226].

В оториноларингологии наиболее изучено применение эпидермального фактора роста, фактора роста фибробластов, а также обогащенной тромбоцитами плазмы. Несмотря на ряд преимуществ эпидермального фактора роста фибробластов, в литературе описано формирование холестеатомы при его использовании в качестве регуляторного фактора в составе конструктора [241]. На сегодняшний день наиболее исследованным с позиций безопасности и эффективности среди семейства факторов роста фибробластов является основной фактор роста фибробластов (FGF-b). В настоящее время эффективность и

безопасность использования фактора роста фибробластов при закрытии острых и стойких перфораций барабанной перепонки в комбинации с различными коллагеновыми скаффолдами, доказана во многих экспериментальных работах [105, 116, 131, 141, 166, 188].

Тем не менее, для проведения экспериментальных исследований требуется адекватная модель стойкой перфорации. Сложность моделирования стойкого дефекта барабанной перепонки обусловлена более быстрыми сроками регенерации у малых лабораторных животных. По данным литературы, наибольшее число сообщений об успешном формировании модели стойкой перфорации описано на лабораторных шиншиллах, морских свинках и крысах [68, 90]. Наружный слуховой проход самца взрослой шиншиллы позволяет свободно манипулировать на барабанной перепонке с помощью микроинструментария, даже под контролем ригидного эндоскопа диаметром 4 мм. Более того, строение барабанной перепонки и цепи слуховых косточек аналогично таковым у человека [99, 194].

Множество описанных техник формирования модели стойкой перфорации барабанной перепонки могут быть разделены на пять групп согласно Wang et al. – травматические, физические, химические, иммунологические и генетические [231]. Генетические методы ограничены работами на лабораторных мышах с генетически обусловленным дефицитом плазминогена [231]. По данным авторов, путем генетических модификаций им удавалось достичь лишь отсроченного закрытия дефекта по сравнению с контрольной группой [213]. Согласно данным литературы, оптимальная модель стойкой перфорации должна соответствовать следующим критериям – длительность дефекта более 8 недель, отсутствие воспаления, эпителизация края перфорации [99]. Существует множество различных техник создания перфорации – подворачивание краев, термическое воздействие, ремиринготомия, установка тимпаностомической трубки, частичная резекция рукоятки молоточка. В качестве химических агентов, способствующих формированию стойкого дефекта наиболее часто используют цитостатики митомицин С и 5-фторурацил. Недостатком их использования является потенциальное влияние на скорость закрытия дефекта в дальнейшем, например при

изучении новых методов лечения [99]. Наиболее часто по данным литературы используются техника подворачивания краев перфорации, а также термическое воздействие. Amoils и соавт. удалось добиться формирования стойкого дефекта методом миринготомии с подворачиванием краев у шиншиллы лишь в 84% случаев [68].

Особый интерес представляют клинические исследования эффективности тканеинженерного метода закрытия стойких перфораций барабанной перепонки. Несмотря на то, что в зарубежной литературе уже представлен целый ряд клинических работ, в основном они представляют собой пилотные исследования с небольшим количеством пациентов.

Подробный анализ опубликованных клинических исследований тканеинженерного подхода в закрытии перфораций провели Lou Z. и соавторы в 2018 году. В обзор вошли 11 работ посвященных закрытию острых и подострых перфораций - авторы описывают положительный результат у 89,3-100% пациентов основной группы, среднее время закрытия перфорации составляло 2 недели [164].

В обзор также вошли 8 работ, посвященных закрытию стойких дефектов. Наиболее высокие показатели эффективности по сравнению с контрольными группами были при использовании коллагеновой губки с фактором роста фибробластов. Три работы были посвящены исследованию комбинации коллагеновой губки и фактора роста фибробластов. При использовании данной методики авторы всех работ отмечают значимо более высокую эффективность (83,1 – 90 %) по сравнению с показателями в контрольных группах.

Исходя из вышеуказанных данных, нами было решено провести исследование по экспериментальному обоснованию применения тканеинженерного подхода для закрытия стойких дефектов барабанной перепонки. В своей работе мы оценивали не только безопасность и эффективность использования тканеинженерного конструкта в закрытии стойкой перфорации барабанной перепонки, но также изучали структуру фиброзного слоя регенератов барабанной перепонки с помощью атомно-силовой микроскопии.

В доступной литературе нами не найдено работ, посвященных изучению механических свойств фиброзного слоя барабанной перепонки, поэтому наше исследование также включило в себя изучение топографии коллагеновых волокон фиброзного слоя и измерение модуля упругости барабанной перепонки.

Экспериментальная работа выполнена на базе Института регенеративной медицины Научно-технического парка биомедицины и на базе Центрального вивария Сеченовского Университета.

Учитывая отсутствие общепринятой модели стойкой перфорации в литературе, требовалось провести сравнение наиболее распространенных методик. Первым этапом мы провели экспериментальное исследование на 12 лабораторных шиншиллах для поиска эффективной воспроизводимой модели стойкой перфорации барабанной перепонки. Все животные были разделены на три равные группы в зависимости от применяемой техники. В первой группе перфорация была сформирована холодным способом методом подворачивания краев. После введения животного в наркоз (внутримышечное введение раствора Золетила (в дозе 10 мг/кг) и Ксилазина (в дозе 0,15 мл/кг) с помощью мириригнотомической иглы в задне-нижнем квадранте барабанной перепонки создавали отверстие, затем с помощью двух перпендикулярных разрезов, проходящих через центр дефекта, мы формировали четыре лоскута и подворачивали их к внутренней поверхности барабанной перепонки. Аналогичное вмешательство проводилось на барабанной перепонке с противоположной стороны. Во второй группе 4 лабораторным шиншиллам выполнялась двусторонняя лазерная мириригнотомия. В третьей группе отверстие формировалось тем же способом, что и в первой группе, однако после подворачивания лоскутов в дефект устанавливалась тимпаностомическая трубка на 2 недели. Период наблюдения, составляющий 12 недель, в третьей группе начинался после удаления трубки, в остальных группах непосредственно после формирования дефекта.

В первой группе максимальная длительность персистенции дефекта составила 4 недели и наблюдалась лишь в 17 % случаев (2 из 12). При этом, большая часть дефектов (9 из 12) закрылись уже спустя 2 недели наблюдения.

Во 2 группе, где перфорация формировалась с помощью лазерной мириготомии, она сохранялись несколько дольше. Однако, с помощью данной методики также не удалось добиться формирования стойкого дефекта, так как срок персистирования перфорации в данной группе в 50% случаев составил 4 недели, в остальных 50% - 6 недель. Наши результаты хорошо коррелируют с данными Emani и соавт. (2014), которые на основании серии экспериментов сделали вывод о неэффективности лазерной мириготомии даже в сочетании с техникой подворачивания краев перфорации [99, 173]. Неэффективность данной методики, возможно, обусловлена потенциальным прорегенераторным эффектом лазерного излучения, описываемым несколькими авторами в литературе.

Несмотря на большую длительность персистирования перфораций в группе лазерной мириготомии по сравнению с группой мириготомии с подворачиванием краев (в среднем 5 и 2,5 недели, соответственно), в обеих группах сформированные дефекты не удовлетворяли основному критерию эффективности модели стойкой перфорации барабанной перепонки – длительность более 8 недель.

Формирования стойкой перфорации барабанной перепонки удалось добиться лишь при комбинации мириготомии техникой подворачивания краев и временной установкой тимпаностомической трубки, причем у всех животных. Персистирование дефекта более 8 недель отмечалось у всех 12 животных.

Наиболее достоверным критерием формирования стойкой перфорации является подворачивание эпителия за край дефекта. Для подтверждения эффективности модели, по окончании 10 недель наблюдения все барабанные перепонки из третьей группы были извлечены для гистологического исследования. Такой срок соответствует времени окончания стадии хронизации дефекта на модели стойкой перфорации по данным литературы [99].

Для гистологического исследования поперечные срезы парафинизированных перепонок, содержащие край перфорации, были окрашены гематоксилином-эозином. Для изучения готовых препаратов использовался микроскоп Leica DM4000 B LED, оборудованный камерой Leica DFC7000 T и программным обеспечением LAS V4.8 (Leica Microsystems, Швейцария).

При гистологическом исследовании края стойкой перфорации у всех животных третьей группы обнаружено подворачивание многослойного плоского эпителия за край дефекта, с участками гиперкератоза. В некоторых препаратах обнаруживались кровоизлияния между наружным эпителиальным слоем и средним фиброзным слоем.

Согласно полученным результатам, методика, сочетающая подворачивание краев перфорации и временную установку тимпаностомической трубки позволяет создать эффективную и воспроизводимую модель стойкого дефекта барабанной перепонки.

С применением данной методики мы сформировали 36 стойких перфораций (24 правосторонних и 12 левосторонних) у 12 взрослых самцов лабораторных шиншилл. После удаления тимпаностомических трубок, согласно описанной методике, начинался период наблюдения, который составлял 8 недель. По окончании периода наблюдения при сохранении более $\frac{1}{2}$ от изначального размера дефекта по данным отовидеоэндоскопии дефект считался стойким. Более того, все 12 левосторонних перфораций вошли в группу контрольного наблюдения, что позволило увеличить общий срок динамического наблюдения за ними, который составил 12 недель.

Во второй части экспериментальной работы нами было проведено исследование эффективности тканеинженерного подхода к закрытию стойких перфораций барабанной перепонки на лабораторных шиншиллах. В группу контрольного наблюдения (Группа III) вошли 12 левосторонних перфораций, 24 правосторонние перфорации были поровну распределены в первую и вторую группы лечения (Группа I и Группа II). Группа I предполагала закрытие сформированного дефекта тканеинженерной методикой «in situ» с использованием коллагенового скаффолда и основного фактора роста фибробластов (FGF-b). В группе II закрытие перфорации проводилось коллагеновым скаффолдом, пропитанным физиологическим раствором, подобно простой заплатке. Все манипуляции проводились в условиях общей анестезии животных (внутримышечное введение раствора Золетила (в дозе 10 мг/кг) и Ксилазина (в дозе 0,15 мл/кг)).

Под контролем микроскопа с помощью миринготомической иглы мы проводили дезэпидермизацию краев сформированного дефекта, затем с помощью силиконового сайзера мы отмеряли фрагмент коллагеновой губки, который перекрывал бы перфорацию на 1-2 мм. Далее, вырезанный по размеру фрагмент коллагеновой губки пропитывался либо раствором основного фактора роста фибробластов (100 мкг/мл) для закрытия дефекта в первой группе, либо физиологическим раствором – во второй группе.

С целью детального изучения строения и механических свойств нативной барабанной перепонки шиншиллы была сформирована референсная группа, в которую вошли 12 левосторонних неперфорированных барабанных перепон.

После закрытия правосторонних перфораций начинался период наблюдения, общей продолжительностью 12 недель, что соответствует срокам формирования зрелого рубца по данным литературы. В течение всего периода наблюдения каждые 2 недели проводилась отовидеоэндоскопия для оценки состояния дефекта и, в случае его персистирования, выполнялось повторное закрытие либо тканеинженерным конструктом, либо губкой, пропитанной физиологическим раствором. Такая частота наблюдения выбрана в соответствии с данными литературы о высвобождении фактора роста фибробластов из коллагенового полимера и его активности в тканях в течение 2 недель [127].

Спустя 12 недель наблюдения, при визуальном подтверждении полного закрытия перфорации, животное выводилось из эксперимента, затем мы выделяли височную буллу вместе с барабанной перепонкой. Далее под контролем микроскопа с помощью микроинструментария нами выполнялось вскрытие костной буллы и прецизионно резецировался восстановленный фрагмент барабанной перепонки – регенерат.

В группе I (FGF+коллагеновый скаффолд) большинство перфораций закрылись полностью уже после однократной процедуры лечения (9 из 12). У двух животных из данной группы потребовалось однократное повторение процедуры, у одного животного дефект полностью закрылся после двукратного повторения процедуры, спустя 6 недель.

В группе II (физиологический раствор + коллагеновый скаффолд) у 4 животных мы наблюдали полное закрытие дефекта. При этом, во всех случаях требовалось неоднократное повторение процедуры: в двух случаях лечение повторяли пять раз, в двух других – два и три раза.

В группе III (контрольное наблюдение за перфорациями) за 12 недель мы не наблюдали случаев спонтанного закрытия сформированных дефектов.

Помимо визуальной оценки сроков закрытия перфораций, нами проводилась гистологическая оценка структуры восстановленных участков перепонки с помощью световой, поляризационной и фазово-контрастной микроскопии образцов, окрашенных гематоксилином-эозином.

Весьма значимым, несомненно, является количество слоев в восстановленной барабанной перепонке, однако также важна полноценность каждого отдельного слоя, а также отсутствие признаков выраженного воспаления. Для стандартизации гистологического анализа регенератов и нормальной перепонки нами была составлена балльная шкала оценки гистологических признаков, основанная на данных гистологического исследования нативных барабанных перепонки. Согласно данной шкале, нормальному строению перепонки соответствует 0 баллов. Таким образом, чем больше баллов, тем сильнее отличия от нормы от гистологической структуры нативной перепонки.

Во всех регенератах из группы I (FGF+коллагеновый скаффолд) мы наблюдали трехслойную структуру. Однако, у 2 животных (N1, N5) было выявлено неполноценное восстановление эпителиальных выстилок - менее зрелый многослойный эпителий в наружном слое барабанной перепонки. Структура фиброзного слоя регенератов из группы I полностью соответствовала строению нативной перепонки. Так, волокнистая структура с плотной упаковкой коллагеновых пучков четко прослеживалась при фазово-контрастной микроскопии в 11 из 12 образцов. При исследовании соединительнотканного слоя одного образца (N1, AD) были обнаружены редкие участки разрыхления. Выраженную анизотропию при поляризационной микроскопии фиброзного слоя мы наблюдали во всех образцах, за исключением участков разрыхления в одной барабанной

перепонке (N1, AD). Возможно, данный вариант был обусловлен более поздним закрытием дефекта у этого животного.

При световой микроскопии регенератов из группы II (физиологический раствор + коллагеновый скаффолд) в обоих образцах, подлежащих гистологическому исследованию, на месте дефекта обнаружена мембрана, представленная двумя слоями – тонким фиброзным и эпителиальным.

При поляризационной микроскопии соединительнотканый слой в данных образцах даёт слабую анизотропию, коллагеновые волокна в пучках разрыхлены. При детальном изучении участков выраженного разрыхления обнаруживается умеренный отёк и очаговая лимфо-макрофагальная инфильтрация.

Балльная оценка проводилась по следующим гистологическим признакам: количество слоев перепонки, количество слоев клеток в наружном эпителиальном слое, структура волокон в соединительнотканном слое, наличие признаков воспаления, наличие участков разрыхления в фиброзном слое. По результатам оценки, средний балл регенератов из группы I оказался статистически более близким к нормальному, по сравнению с регенератами из группы II.

Таким образом, по данным гистологического исследования, структура регенератов из I группы в целом соответствовала макро- и микроструктуре нативной барабанной перепонки. Восстановление трёхслойной структуры барабанной перепонки мы наблюдали только в барабанных перепонках, восстановленных при помощи сочетания рекомбинантного основного фактора роста фибробластов и коллагеновой губки в качестве скаффолда.

Для изучения механических свойств барабанной перепонки мы использовали метод наноиндентирования с вычислением модуля упругости. Модуль упругости представляет собой наиболее обобщённый показатель, характеризующий вязко-упругие свойства барабанной перепонки. Учитывая относительно поверхностный характер измерений при наноиндентировании, перед выполнением исследования регенерат подвергали децеллюляризации. Данная процедура подразумевает удаление клеток из ткани и представляет собой последовательную обработку в специальных растворах детергентов. Такая подготовка делала возможным

прецизионное изучение фиброзного слоя, который и определяет колебательные свойства барабанной перепонки. Процесс наноиндентирования лежит в основе атомно-силовой микроскопии, которую мы и использовали в данном исследовании. Помимо вычисления модуля упругости, атомно-силовая микроскопия позволила детально изучить топографию волокон в фиброзном слое барабанной перепонки.

Все снимки топографии изучаемых образцов получены на одном кантилере ScanAsyst-FLUID - радиус закругления наконечника 34 нм, коэффициент жесткости $k=1,1164$ Н/м, длина балки $L=70$ мкм, резонансная частота $f_0=150$ кГц. Размер карты распределения модуля Юнга составил 50×50 мкм, с разрешением 32×32 точки, скорость снятия силовых кривых 420 мкм/с. Учитывая длительность исследования каждого образца, сканирование проводилось при комнатной температуре, в стерильном растворе NaCl, во избежание высыхания образца и изменения его механических свойств.

При сканировании получены карты распределения модуля Юнга по поверхности барабанной перепонки. При этом, для внутренней и наружной стороны каждого образца было получено по 1024 значения модуля упругости.

Учитывая большой объем данных, перед началом статистического анализа получены средние значения для каждой перепонки из разных групп.

Мы сравнили измерения внешних и внутренних сторон фиброзного слоя внутри каждой группы с использованием параметрического критерия Стьюдента. Статистически достоверные различия между значениями модулей упругости с разных сторон фиброзного слоя внутри каждой группы отсутствовали.

Далее, было выполнено сравнение полученных для каждой группы средних значений модуля упругости. Исходя из ненормальности распределения данных, для статистического анализа был выбран критерий Манна-Уитни. Статистический анализ не выявил статистически значимых отличий между показателями в группах нормальной перепонки и групп значения модулей упругости фиброзного слоя нативной перепонки и регенерата из группы II (физиологический раствор + коллагеновый скаффолд), напротив, значимо отличались.

Следовательно, после тканеинженерного закрытия перфораций с использованием коллагенового скаффолда, пропитанного раствором основного фактора роста фибробластов, отмечалось полноценное восстановление механических свойств фиброзного слоя барабанной перепонки.

Таким образом, применение рекомбинантного основного фактора роста фибробластов в сочетании с коллагеновым скаффолдом для закрытия стойких перфораций барабанной перепонки в экспериментальных условиях оказалось эффективным и безопасным, что позволит в будущем внедрить данный метод в клиническую практику как более быстрый и инвазивный, сокращающий сроки реабилитации пациентов, в отличие от стандартных хирургических методик, применяемых в лечении хронических отитов в настоящее время.

Перспективы внедрения в клиническую практику

Регенеративная медицина изучает возможности восстановления, поддержания, улучшения или замещения тканей и органов посредством комбинации скаффолдов, клеток и/или биологически активных молекул. В регенеративной медицине условно выделяют два основных направления – клеточная терапия и тканевая инженерия [160]. Как правило, тканеинженерный подход начинается с использования скаффолда, в качестве которого могут выступать различные биodeградируемые и биостабильные материалы [129]. Отдельные тканеинженерные методики могут потребовать применения клеток и регуляторных факторов.

На современном этапе происходит активное внедрение предлагаемых регенеративной медициной решений и подходов в различные сферы клинической медицины. Согласно ежегодному отчету Альянса Регенеративной Медицины, к концу 2020 года в мире было зарегистрировано 1220 клинических исследований [66]. При этом, за последний год опубликовано около 100 новых работ,

посвящённых изучению эффективности клеточных, генных и тканеинженерных методов лечения. Возрастающая актуальность регенеративной медицины подтверждается значительным годовым приростом объема финансирования проектов, посвященных тканевой инженерии и клеточной терапии. Так, в упомянутом докладе Альянса было отмечено увеличение финансирования сектора более чем в два раза за последний год [66].

В Российской Федерации также предпринимаются меры по совершенствованию правового регулирования инновационных методов лечения. При этом, правовые акты в сфере здравоохранения редко используют термин «инновационные» [46]. Однако, Постановление Правительства РФ от 15 апреля 2014 г. N 294, утвердившее государственную программу Российской Федерации «Развитие здравоохранения» содержит подпрограмму «Развитие и внедрение инновационных методов диагностики, профилактики и лечения, а также основ персонализированной медицины» [46]. Анализируя цели и задачи данного документа, можно найти в ней указание в том числе на тканеинженерные технологии.

Применение тканеинженерного подхода, не предполагающего использования клеток, не попадает под действие утверждённого в 2017 году Федерального закона N180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах». Казалось бы отсутствие необходимости использования клеточных продуктов должно было бы облегчить проведение соответствующих исследований и внедрение результатов в клиническую практику.

Большинство используемых в качестве регуляторных факторов препаратов представляют собой рекомбинантные человеческие факторы роста, клиническое применение которых в России усложняется отсутствием на текущий момент соответствующих регулирующих правовых актов, а также влиянием социальных, этических и экономических факторов.

Несмотря на накопление в зарубежной литературе достаточного количества публикаций о безопасности и высокой эффективности некоторых тканеинженерных методов лечения с использованием комбинации скаффолда и

регуляторных факторов, в России на сегодняшний день зарегистрировано только два препарата, содержащих человеческие рекомбинантные факторы роста (оба препарата содержат эпидермальный фактор роста). Поэтому наряду с накоплением научных данных о безопасности и эффективности требуется непрерывное развитие прикладной инфраструктуры, а также нормативно-правовой базы, регламентирующей исследования и применение в клинической практике тканеинженерного подхода.

Поэтому большинство работ российских исследователей, в частности в оториноларингологии, посвященных изучению безопасности и эффективности методов тканевой инженерии, носят экспериментальный характер.

В ходе данного исследования использовался рекомбинантный человеческий основной фактор роста фибробластов. Это вещество входит в состав зарегистрированных зарубежом лекарственных препаратов – Трафермин и Спирфермин. В России из зарегистрированных лекарственных препаратов, содержащих рекомбинантный человеческий фактор роста только Эбермин и Эберпрот-П (в их составе эпидермальный фактор роста). Данные препараты используются для восстановления кожных покровов у пациентов с глубокими ожогами, гнойными ранами и трофическими язвами [9, 13, 15, 37]. Применение эпидермального фактора роста в отиатрии, согласно данным литературы, может приводить к формированию холестеатомы.

Относительно результатов проведенной нами работы, очевидны перспективы применения тканеинженерного подхода в лечении пациентов со стойкими перфорациями барабанной перепонки. Аналогичные работы с применением рекомбинантного человеческого фактора роста фибробластов для закрытия стойких дефектов барабанной перепонки у пациентов с хроническим средним отитом проводились в Америке и Японии [139, 197]. Тканеинженерный подход “*in situ*” представляет собой высокоэффективный безопасный способ лечения.

Проводимые экспериментальные исследования представляют собой необходимый фундамент для дальнейшего безопасного и обоснованного внедрения инновационных методов лечения в практическое здравоохранение.

В ходе проведенной нами работы с помощью отовидеоэндоскопии, гистологического исследования и атомно-силовой микроскопии с наноиндентированием была продемонстрирована высокая эффективность основного фактора роста фибробластов для гарантированного полноценного восстановления барабанных перепонки. Учитывая, накапливаемый научный опыт, а также направленность государственных инициатив на развитие инновационных методов лечения и, в частности, регенеративной медицины и тканевой инженерии, перспективы внедрения описываемого тканеинженерного подхода в клиническую практику очевидны.

ВЫВОДЫ

1. В эксперименте на малых лабораторных животных в условиях *in vivo* разработана модель стойкой перфорации барабанной перепонки, включающая проведение мириготомии с последующей установкой вентиляционной трубки на срок не менее 4 -х недель.
2. Изучена возможность эффективного применения фактора роста фибробластов в сочетании с коллагеновым скаффолдом для закрытия стойкой перфорации барабанной перепонки у малых лабораторных животных.
3. При использовании фактора роста фибробластов в сочетании с коллагеновым скаффолдом по данным отомикроскопии отмечено полное закрытие стойкой перфорации барабанной перепонки у всех оперированных животных. При сравнении экспериментально восстановленной и нативной барабанных перепонки ни в одном случае не было выявлено каких-либо визуальных отличий между ними.
4. Гистологическое исследование строения восстановленной с помощью тканеинженерного метода барабанной перепонки показало наличие трехслойной структуры, не отличающейся от строения нативной перепонки чего не было достигнуто ни у одного животного в контрольной группе.
5. По данным атомно-силовой микроскопии значения модулей упругости фиброзного слоя нативной барабанной перепонки и восстановленной с помощью тканеинженерного подхода сопоставимы и значительно отличаются от таковых в контрольной группе животных.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. С целью создания модели стойкой перфорации барабанной перепонки у экспериментальных животных (шиншиллы) в условиях *in vivo* рекомендуется сочетать миринготомию с последующим подворачиванием краев перфорации и установкой вентиляционной трубки на срок не менее 4 недель.
2. Продемонстрированное в эксперименте восстановление морфологических и механических свойств барабанной перепонки с помощью метода тканевой инженерии с использованием фактора роста фибробластов является основой для апробации метода в клинической практике, а также для проведения дальнейших экспериментальных разработок.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

AD – правое ухо

AS – левое ухо

СК19 – цитокератин 19

EGF – эпидермальный фактор роста

FGF – фактор роста фибробластов

INg b1– интегрин b1

PBS – фосфатно-солевой буфер

PDGF – тромбоцитарный фактор роста

TGF- β – трансформирующий фактор роста β

АСМ – атомно-силовая микроскопия

БП – барабанная перепонка

Г-Э – гематоксилин-эозин

ОТПК – обогащённая тромбоцитами плазма крови

ХГСО – хронический гнойный средний отит

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авдеева, С. Н. Распространенность заболеваний ЛОР-органов среди городского населения на современном этапе / С. Н. Авдеева // Рос. оторинолар. – 2006. – № 3. – С. 22.
2. Алиев, М. А. Клиническая анатомия барабанной перепонки / М. А. Алиев // Международный студенческий научный вестник. – 2019. – № 1. – С. 11–11.
3. Аникин, И. А. Причины неудовлетворительных результатов оперативного лечения хронического гнойного среднего отита / И. А. Аникин, С. В. Астащенко, Т. А. Бокучава // Рос. оторинолар. – 2007. – № 5. – С. 3–8.
4. Бабияк, В. И. Оториноларингология : руководство : в 2 томах / В. И. Бабияк, М. И. Говорун, Я. А. Накатис. – СПб. : Питер, 2009. – Т 2. – 832 с. – (Национальная медицинская библиотека).
5. Бартеньева, А. А. Проблемы тимпанопластики / А. А. Бартеньева, М. Я. Козлов. – Л. : Медицина, 1974. – 182 с.
6. Бегун, П. И. Математическое моделирование и исследование барабанной перепонки в норме и при патологиях среднего уха / П. И. Бегун, К. Л. Данг // Российский журнал биомеханики. – 1999. – № 2.
7. Березнюк, В. В. Экспериментальное изучение сроков регенерации барабанной перепонки после различных видов лазерных тимпаностомий / В. В. Березнюк, М. Г. Василенко, Т. В. Усенко // Журнал вушних, носових і горлових хвороб. – 2013. – № 1. – С. 14–18.
8. Бобошко, М. Ю. К вопросу об оценке степени тугоухости / М. Ю. Бобошко, Л. Е. Голованова, О. Н. Владимирова // Российская оториноларингология. – 2015. – Т. 5, № 78. – С. 24.
9. Богданец, Л. И. Эффективность препарата эбермин в лечении трофических язв венозной этиологии / Л. И. Богданец, В. Н. Лобанов, А. И. Кириенко // Флебология. – 2009. – Т. 3. – № 4. – С. 9–14.

10. Бойко, Н. В. Тимпанопластика в детском возрасте / Н. В. Бойко, В. Н. Колесников // Российская оториноларингология. – 2013. – № 2. – С. 108–113.
11. Бочоришвили, Г. В. Диагностика заболеваний, приводящих к кондуктивной тугоухости у детей / Г. В. Бочоришвили, Е. П. Карпова, Е. И. Зеликович // Российская ринология. – 2011. – Т. 19, № 2. – С. 80–81.
12. Вишняков, В. В. Отдаленные результаты тимпаноластики с использованием протезов слуховых косточек / В. В. Вишняков // Материалы конференции «Современные вопросы диагностики и реабилитации больных с тугоухостью и глухотой». – М., 2006. – Р. 42–43.
13. Войновский, Е. А. Применение крема «Эбермин» и полиуретанового раневого покрытия в комплексном лечении огнестрельных ран / Е. А. Войновский, Д. А. Матвеев, Ю. Т. Козловский, А. Проничев // Медицинский вестник МВД. – 2008. – № 1. – С. 9–13.
14. Галлямова, Ю. А. Гипертрофические и келоидные рубцы / Ю. А. Галлямова, З. З. Кардашова // Лечащий врач. – 2009. – № 10. – С. 20–23.
15. Галстян, Г. Р. Клиникоэкономический анализ применения препарата эпидермального фактора роста (эберпрот®) у больных с синдромом диабетической стопы / Г. Р. Галстян, В. И. Игнатьева, М. В. Авксентьева, И. И. Дедов // Эндокринная хирургия. – 2013. – № 1.
16. Гаров, Е. В. Анализ эффективности тимпаноластики у больных хроническим перфоративным средним отитом / Е. В. Гаров, Н. Г. Сидорина, В. Н. Зеленкова [и др.] // Вестник оториноларингологии. – 2014. – № 6. – С. 8–11.
17. Гольдман, И. И. Профилактика некоторых неудач тимпаноластики / И. И. Гольдман, Л. А. Кулакова, В. Л. Лукич [и др.] // Материалы VII съезда оторинолар УССР. – Киев, 1989.
18. Гуров А. В., Ельчанинов А. В., Мурзаханова З. В. Применение плазмы крови, обогащенной тромбоцитарными факторами роста, при экспериментальной перфорации барабанной перепонки // Медицинский совет. – 2019. – №. 20
19. Дайхес, Н. А. Результаты применения лазерного автодина для исследования подвижности барабанной перепонки / Н. А. Дайхес, О. В. Мареев, Г.

О. Мареев, [и др.] // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2011. – Т. 7, №4. – С. 894–897.

20. Джапаридзе, Ш. В. О хирургическом лечении хронического гнойного среднего отита / Ш. В. Джапаридзе, Д. В. Вачарадзе, Л. С. Ломидзе, Т. Р. Хечинашвили // Вестник оториноларингологии. – 2005. – № 3. – С. 46–47.

21. Долгов, В. А. Особенности регенерации тканей барабанной перепонки после ее перфорации при гнойном среднем отите у собак / В. А. Долгов, Н. И. Иванова, Л. Б. Лунькова // Морфология. – 2016. – Т. 149, № 3. – С. 76–77.

22. Дубинец, И. Д. Современные тенденции и возможности при хирургическом лечении хронического среднего отита / И. Д. Дубинец // Российская оториноларингология. – 2006. – Т. 1. – С. 83–85.

23. Забирова, А. Р. Этиология и патогенез сенсоневральной тугоухости / А. Р. Забирова // Российская оториноларингология. – 2012. – № 2. – С. 162–167.

24. Карнеева, О. В. Современный подход к лечению заболеваний верхних дыхательных путей и среднего уха как мера профилактики тугоухости / О. В. Карнеева, Д. П. Поляков // Педиатрическая фармакология. – 2012. – Т. 9, № 1.

25. Карпов, В. П. «Аллоплант» – новый материал для реконструкции барабанной перепонки у больных хроническим перфоративным средним отитом / В. П. Карпов // Российская оториноларингология. – 2008. – С. 78.

26. Кобелев, А. В. Нелинейные вязкоупругие свойства биологических тканей / А. В. Кобелев, Л. Т. Смолюк, Р. М. Кобелева, Ю. Л. Проценко. – Екатеринбург : УрО РАН, 2012. – ISBN 978-5-7691-2276-7.

27. Козлов, Р. С. Исследование распространенности в России острого среднего отита у детей в возрасте от 0 до 5 лет (PAPIRUS-AOM) / Р. С. Козлов, А. А. Муравьев, М. Е. Щербаков [и др.]. // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2017. – Т. 19, № 2.

28. Косяков, С. Я. Современные подходы к лечению хронического гнойного среднего отита с холестеатомой / С. Я. Косяков, Е. В. Пчеленок // Вестник оториноларингологии. – 2014. – № 6. – С. 4–7.

29. Косяков, С. Я. Современные принципы лечения острого среднего, затянувшегося и рецидивирующего острого среднего отита / С. Я. Косяков, А. С. Лопатин // РМЖ. – 2002. – Т. 20. – С. 903–909.
30. Кулакова, Л. А. Использование комплексного препарата "облекол" для стимуляции приживления пластического лоскута при тимпанопластике. / Л. А. Кулакова, Р. К. Абоянц, И. И. Гольдман // Материалы науч.-практ. конф. – Тула, 1988. – С. 26–27.
31. Кулакова, Л. А. Наш опыт применения препаратов на основе коллагена в реконструктивной хирургии среднего уха / Л. А. Кулакова, К. В. Еремеева, Е. Г. Трякина [и др.] // Вестн. оторинолар. – 2012. – № 77 (2). – Р. 40–44.
32. Кулакова, Л. А. Хирургическая реабилитация больных хроническим гнойным средним отитом и его последствиями (с использованием пленки "облекол" и гипербарической оксигенации) : автореф. дис. ... канд. мед. наук / Л. А. Кулакова. – М., 1991.
33. Маас, А. И. Методология симуляционного тренинга навыков эндоскопической тимпаноластики / А. И. Маас, С. Я. Косяков, К. А. Харламов // Вестник оториноларингологии. – 2019. – Т. 84, № 1. – С. 60–63.
34. Макаревич, И. Г. Применение АИГ- неодимового лазера при тимпанопластике / И. Г. Макаревич, Е. В. Ильинская, С. В. Старцев // Материалы XVI съезда оториноларингологов РФ «Оториноларингология на рубеже тысячелетий». – М., 2001. – Р. 95–98.
35. Маллин, Д. А. Использование имплантатов с линейно-цепочным углеродным покрытием в тимпанопластике : дис. ... канд. мед. наук : 14.00.04 / Маллин, Дмитрий Александрович. – Чебоксары, 2007. – 141 с.
36. Мастицкий, С. Э. Статистический анализ и визуализация данных / С. Э. Мастицкий, В. К. Шитиков. – М. : ДМК Пресс, 2015.
37. Набиев, М. Х. Современные возможности местного лечения осложненных форм синдрома диабетической стопы / М. Х. Набиев, Д. А. Абдуллоев, У. М. Бегаков // Здравоохранение Таджикистана. – 2021. – № 2. – С. 68–75.

38. Островский, И. И. Тимпанопластика: проблемы и реализация / И. И. Островский, А. И. Островский / Вестн. оторинолар. – 2000. – № 1. – С. 7–10.
39. Пальчун, В. Т. Оториноларингология: Руководство для врачей / В. Т. Пальчун, А. И. Крюков. – М. : Медицина, 2001.
40. Патент на изобретение RU 2207042 С2, 27.06.2003. Способ прогнозирования результатов тимпаноластики у больных хроническим перфоративным средним отитом. Заявка № 2001122048/14 от 06.08.2001/ Аникин М.И., Аникин И.А., Забиров Р.А., Каган И.И.
41. Патент на изобретение RU 2718268 С1, 01.04.2020. Способ лазерной эндоскопической тимпаноластики у детей. Заявка № 2019122025 от 12.07.2019/ Русецкий, Ю. Ю., Мейтель, И. Ю., Малявина, У. С., Латышева, Е. Н.
42. Пятакина, О. К. Функциональная хирургия при хронических средних отитах / О. К. Пятакина. // Мат. Рос. научн.-практ. конф. оторинолар. «Проблемы и возможности микрохирургии уха». – Оренбург, 2002. – С. 25–28.
43. Плужников, М. С. Современное состояние проблемы хирургической реабилитации больных с хроническими воспалительными заболеваниями среднего уха / М. С. Плужников, В. В. Дискаленко, Л. М. Курмашова // Вестник оториноларингологии. – 2006. – № 5. – Р. 63–66.
44. Потехина, Ю. П. Структура и функции коллагена / Ю. П. Потехина // Рос. остеопат. журн. – 2016. – № 1–2 (32–33). – С. 87–99.
45. Преображенский, Н. А. Применение коллагена в реконструктивной хирургии среднего уха / Н. А. Преображенский, И. И. Гольдман, А. Б. Шехтер // Вестн. оторинолар – 1973. – № 6. – С. 57–62.
46. Романовский, Г. Б. Правовое регулирование медицинских инновационных технологий в Российской Федерации: проблемы и перспективы / Г. Б. Романовский // Российская юстиция. – 2016. – № 10. – С. 59–62.
47. Свистушкин В.М., Золотова А.В., Мокоян Ж.Т., Артамонова П.С. Возможности закрытия стойкой перфорации барабанной перепонки: от исторических аспектов до современных методов. Медицинский Совет. 2020;(6):122-126. <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2020-6-122-126>

48. Свистушкин, В. М. Применение метода радиоволновой миринготомии в условиях эксперимента и в клинической практике/ В. М. Свистушкин, А. В. Золотова, О. Д. Смирнова, Г. Н. Никифорова // Вестник оториноларингологии. – 2017. – № 82 (1). – С. 52–55
49. Свистушкин В.М., Тимашев П.С., Золотова А.В., Мокоян Ж.Т. Тканеинженерный подход к закрытию стойких перфораций барабанной перепонки. Медицинский совет. – 2019. № 8. – С. 132-136
50. Свистушкин В.М., Тимашев П.С., Шехтер А.Б., Золотова А.В., Мокоян Ж.Т., Свистушкин М.В. Экспериментальное обоснование метода тканевой инженерии для закрытия стойких перфораций барабанной перепонки. Вестник Оториноларингологии. – 2020. № 85 (6). –С. 23-26. doi:10.17116/otorino20208506123
51. Семенов, Ф. В. Применение ИАГ-ND лазера с длиной волны 1, 32 мкм при тимпанопластике/ Ф. В. Семенов, А. К. Волик //Российская оториноларингология. – 2000. – №. 2. – С. 57
52. Солдатов, И. Б. Руководство по оториноларингологии / под ред. И. Б. Солдатова. – 2-е изд. – М. : Медицина, 1997. – 608 с.
53. Солнцева, Г. Н. Адаптивные особенности периферического отдела слуховой системы млекопитающих в онтогенезе / Г. Н. Солнцева // Труды ВНИРО. – 2017. – Т. 168.
54. Сологуб, Т. В. Свободнорадикальные процессы и воспаление (патогенетические, клинические и терапевтические аспекты) : учебное пособие для врачей / Т. В. Сологуб, М. Г. Романцов, Н. В. Кремень [и др.]. – М. : Академия Естествознания, 2008.
55. Стрэтт, Д. В. Теория звука / Д. В. Стрэтт. – М. : Рипол Классик, 2014.
56. Хайманова, Ю. В. Влияние хронического среднего отита на сенсоневральный компонент слуха / Ю. В. Хайманова, С. Я. Косяков // Вестник оториноларингологии. – 2012. – Т. 77, № 3. – С. 7–10.
57. Шевлюк, Н. Н. Морфофункциональная характеристика тканей барабанной перепонки в процессе развития экспериментального среднего отита /

Н. Н. Шевлюк, В. А. Долгов, Н. И. Иванова, Л. Б. Лунькова // Вестник новых медицинских технологий. – 2016. – Т. 23, № 3.

58. Шевчик, Е. А. Повышение эффективности тимпаноластики путем НО-терапии : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.01.03 / Шевчик Елена Александровна. – М., 2013. – 26 с.

59. Щербакова, Я. Л. Нарушения слуха и методы их коррекции / Я. Л. Щербакова, Ю. К. Янов, В. Е. Кузовков, С. М. Мегрелишвили // Рос. оторинолар. – 2014. – № 6. – С. 104–110.

60. Эль-Рефай, Х. Эпидемиология кондуктивной тугоухости и ее хирургическое лечение у жителей Гомеля и Гомельской области / Х. Эль-Рефай, В. П. Ситников, Е. Е. Линкевич, И. В. Веялкин, И. Д. Шляга, Е. С. Ядченко // Медицинские новости. – 2015. – № 9 (252).

61. Янов, Ю. К. Любая перфорация барабанной перепонки должна быть закрыта / Ю. К. Янов, В. И. Егоров, А. В. Козаренко // Материалы Российской конференции оториноларингологов. – М., 2003. – С. 194–195.

62. Acar, M. Fat-plug myringoplasty of ear lobule vs abdominal donor sites / M. Acar, D. Yazıcı, T. Sa, [et al.] // European Archives of Oto-Rhino-Laryngology. – 2014. – № 272 (4). – P. 861–866.

63. Aernouts, J. Mechanical properties of human tympanic membrane in the quasi-static regime from in situ point indentation measurements / J. Aernouts, J. R. Aerts, J. J. Dirckx. – DOI 10.1016/j.heares.2012.05.001 // Hear Res. – 2012. – № 290 (1-2). – P. 45–54.

64. Aernouts, J. Static vs. dynamic gerbil tympanic membrane elasticity: derivation of the complex modulus / J. Aernouts, J. J. J. Dirckx. – DOI 10.1007/s10237e011e0355e6 // Biomechanics and Modeling in Mechanobiology. – 2011.

65. Ahn, T. S. Experimental measurement of tympanic membrane response for finite element model validation of a human middle ear / T. S. Ahn, M. J. Baek, D. Lee. – DOI 10.1186/2193-1801-2-527 // Springerplus. – 2013. – № 2. – P. 527.

66. Alliance for Regenerative Medicine; Growth & Resilience in Regenerative Medicine; 2020; URL: <https://alliancerm.org/sector-report/2020-annual-report/>. – Washington, DC, 2021 March 16.
67. Alper, C. Assessment and management of retraction pockets / C. Alper, E. Olszewska. – DOI 10.5604/01.3001.0009.5547 // *Otolaryngol, Pol.* – 2017. – № 71 (1). – P. 1–21.
68. Amoils, C. P. An animal model of chronic tympanic membrane perforation / C. P. Amoils, R. K. Jackler, H. Milczuk [et al.] // *Otolaryngol, Head Neck Surg.* – 1992. – P. 10647–10655.
69. Amoils, C. P. Repair of chronic tympanic membrane perforations using epidermal growth factor / C. P. Amoils, R. K. Jackler, L. R. Lustig. – DOI 10.1177/019459989210700509 // *Otolaryngol. Head Neck Surg.* – 1992. – № 107 (5). – P. 669–683.
70. Bashkin, P. Basic fibroblast growth factor binds to subendothelial extracellular matrix and is released by heparitinase and heparin-like molecules / P. Bashkin, S. Doctrow, M. Klagsbrun [et al.] // *Biochemistry.* – 1989. – № 28. – P. 1737–1743.
71. Bayram, A. Success rates for various graft materials in tympanoplasty – A review / A. Bayram, N. Bayar Muluk, C. Cingi, S. A. Bafaqeeh. – DOI 10.1016/j.joto.2020.01.001 // *J. Otol.* – 2020. – № 15 (3). – P. 107–111.
72. Benecke, J. E. Tympanic Membrane Grafting With AlloDerm / J. E. Benecke // *The Laryngoscope.* – 2001. – № 111 (9). – 1525–1527.
73. Berger, G. Nature of spontaneous tympanic membrane perforation in acute otitis media in children / G. Berger // *J. Laryngol. Otol.* – 1989. – № 103. – P. 1150–1153.
74. Boone, R. Success of cartilage grafting in revision tympanoplasty without mastoidectomy / R. Boone, E. Gardner, J. Dornhoffer // *Otol. Neurotol.* – 2004. – V. 25, – No. 5. – P. 678–681.
75. Brown, C. S. Global Hearing Loss Prevention / C. S. Brown, S. D. Emmett, S. K. Robler, D. L. Tucci. – DOI 10.1016/j.otc.2018.01.006 // *Otolaryngol Clin North Am.* 2018. – № 51 (3). – P. 575–592.

76. Buckingham, R. A. Fascia and perichondrium atrophy in tympanoplasty and recurrent middle ear atelectasis / R. A. Buckingham. – DOI 10.1177/000348949210100907 // *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* – 1992. – № 101 (9). – P. 755–758.
77. Buntrock, P. Stimulation of wound healing, using brain extract with fibroblast growth factor (FGF) activity. III. Electron microscopy, autoradiography, and ultrastructural autoradiography of granulation tissue / P. Buntrock, M. Buntrock, I. Marx [et al.] // *Exp. Pathol* – 1984. – № 26. – P. 247–254.
78. Burgess, W. H. The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins / W. H. Burgess, T. Maciag // *Annu. Rev. Biochem.* – 1989. – № 58. – P. 575–606.
79. Busra, M. F. M. Recent Development in the Fabrication of Collagen Scaffolds for Tissue Engineering Applications: A Review / M. F. M. Busra, Y. Lokanathan, – DOI 10.2174/1389201020666190731121016. // *Curr. Pharm. Biotechnol.* – 2019. – № 20 (12). – P. 992–1003.
80. Cabra, J. Efficacy of cartilage palisade tympanoplasty: randomized controlled trial. / J. Cabra, A. Moñux. – DOI 10.1097/MAO.0b013e3181dbb35e // *Otol. Neurotol.* – 2010. – № 31 (4). – P. 589–595.
81. Carnio, J. Guided Tissue Regeneration to Treat Mucogingival Defects Using a Collagen Sponge as a Space-Filler Material for Cell Proliferation: Clinical Case Reports With Long-Term Follow-Up / J. Carnio, J. T. Ribas, D. Lipton, J. Brown. // *Clinical Advances in Periodontics*, – 2016. – № 6 (1). – P. 9–16.
82. Caye-Thomasen, P. Bilateral myringoplasty in chronic otitis media / P. Caye-Thomasen, T. R. Nielsen, M. Tos // *Laryngoscope.* – 2007. – № 117. – P. 903.
83. Chalot, N. I., The structure of the tympanic membrane: a new concept / N. I. Chalot // *American Journal of Otology.* – 1980. – № 2 (2). – P. 112–117.
84. Chattopadhyay, S. Collagen-Based Biomaterials for Wound Healing / S. Chattopadhyay, R. T. Raines. // *Biopolymers.* – 2014 Aug. – № 101 (8). – P. 821–833.
85. Cheng, T. Viscoelastic properties of human tympanic membrane / T. Cheng, C. Dai, R. Gan // *Annals of Biomedical Engineering.* – 2007. – № 35. – P. 305–314.

86. Cheng, T. Viscoelastic properties of human tympanic membrane. / T. Cheng, C. Dai, R. Z. Gan. – DOI 10.1007/s10439-006-9227-0// *Ann. Biomed. Eng.* – 2007. – № 35 (2). – P. 305–314.
87. Choi, S. J. Efficient treatment of chronic tympanic membrane perforations in animal models by chitosan patch scaffolds / S. J. Choi, S. W. Kim, J. H. Kim [et al.] // *Tissue. Eng. Regen. Med.* – 2011. – № 8. – P. 141.
88. Chole, R. A. Comparative histology of the tympanic membrane and its relationship to cholesteatoma / R. A. Chole, K. Kodama. – DOI 10.1177/000348948909801002 // *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* – 1989. – № 98 (10). – P. 761–766.
89. Cincik, H. Effects of topical application of mitomycin-C and 5-fluorouracil on myringotomy in rats / H. Cincik, A. Gungor, E. Cekin [et al.] // *Otol. Neurotol* – 2005. – № 26. – P. 351–354.
90. Cui, X.-D. Creating an animal model of rats for chronic persistent tympanic membrane perforation / X.-D. Cui, F. Lu, X. Zhao // *Acta Academiae Medicinae Shanghai* – 2005. – № 32. – P. 243–252.
91. Daphalapurkar, N. P. Characterization of the linearly viscoelastic behavior of human tympanic membrane by nanoindentation / N. P. Daphalapurkar, C. Dai, R. Z. Gan, H. Lu // *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* – 2009. – № 2 (1). – P. 82–92.
92. Darouassi, Y. Prognostic factors of myringoplasty: study of a 140 cases series and review of the literature / Y. Darouassi, A. Aljalil, A. Ennouali [et al.] – DOI 10.11604/pamj.2019.33.323.18060 // *Pan. Afr. Med. J.* – 2019. – № 33. – P. 323.
93. Decraemer, W. F. An elastic stress-strain relation for soft biological tissues based on a structural model / W. F. Decraemer, M. A. Maes, V. J. Vanhuyse // *Journal of biomechanics.* – 1980. – Vol. 13, № 6. – P. 463–468.
94. Decraemer, W. F. Anatomical and mechanical properties of the tympanic membrane / W. F. Decraemer, W. R. J. Funnell. // *Ars, B. Chronic Otitis Media: Pathogenesis-oriented Therapeutic Management* / B. Ars (Ed.). – The Hague : Kugler, 2008. – P. 51–84.

95. Deng, Z. Comparison of porcine acellular dermis and dura mater as natural scaffolds for bioengineering tympanic membranes / Z. Deng, J. Wu, J. Qiu [et al.] // *Tissue Eng. A.* – 2009. – № 15. – P. 3729–3739.
96. Djagny, K. B. Gelatin: A valuable Protein for Food and Pharmaceutical Industries: Review / K. B. Djagny, Z. Wang, S. Xu // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* – 2001 – № 6. – 481–492.
97. Dvorak, D. W. Repair of chronic tympanic membrane perforations with long-term epidermal growth factor / D. W. Dvorak, G. Abbas, T. Ali [et al.] // *Laryngoscope.* – 1995. – № 105. – 1300–1304.
98. Eiber, A. Mechanical Modeling and Dynamical Behavior of the Human Middle Ear / A. Eiber. – DOI 10.1159/000013837 // *Audiology and Neurotology.* – 1999. – № 4 (3-4). – P. 170–177.
99. Emami, N. Chronic tympanic membrane perforation in an animal model / N. Emami, M. D. Schloss, S. J. Daniel. – DOI 10.1016/j.ijporl.2014.04.042 // *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* – 2014. – № 78 (8). – P. 1250–1252.
100. Emre, I. E. Endoscopic ear surgery / I. E. Emre, C. Cingi, N. Bayar Muluk, J. F. Nogueira. – DOI 10.1016/j.joto.2019.11.004 // *J. Otol.* – 2020. – № 15 (1). – P. 27–32.
101. Ersözlü, T. Comparison of the Autologous Platelet-Rich Plasma Gel Fat Graft Myringoplasty and the Fat Graft Myringoplasty for the Closure of Different Sizes of Tympanic Membrane Perforations / T. Ersözlü, E. Gultekin – DOI 10.1177/0145561319900388 // *A Ear Nose Throat J.* 2020;99(5):331-336.
102. Estrem, S. A. Preventing myringotomy closure with topical mitomycin C in rats / S. A. Estrem, P. S. Batra // *Otolaryngol. Head Neck Surg.* – 1999. – № 120. – P. 794–798.
103. Evaluation of eardrum laser doppler interferometry as a diagnostic tool / A. M. Huber, C. Schwab, T. Linder [et al.]. – DOI 10.1097/00005537-200103000-00022 // *Laryngoscope.* – 2001. – № 111 (3). – P. 501–507.

104. Ferrazzini, M. Virtual middle ear: a dynamic mathematical model based on the finite element method : Ph.D. Thesis / M. Ferrazzini. – Swiss Federal Institute of Technology, 2003. – Diss. ETH no. 15294.
105. Fina, M. Improved healing of tympanic membrane perforations with basic fibroblast growth factor / M. Fina, S. Bresnick, A. Baird, A. Ryan // *Growth Factors*. – 1991. – № 5 (2). – P. 65–72.
106. Fisch, U. Tympanoplasty, mastoidektomy and stapes surgery / U. Fisch. – Stuttgart ; New York : Thieme Verlag, 1994. – 292 p.
107. Foyt, D. Underlay tympanoplasty with laser tissue welding/ Foyt D, Slattery WH 3rd, Carfrae MJ. // *Ear Nose Throat J*. 2006;85(4):247-250.
108. Frantsuzov, B. L. Opyt primeneniia svobodnogo autotransplantata iz fastsii visochnoï myshtsy pri timpanoplastike [Experience in applying a free autograft from the fascia of the temporal muscle in tympanoplasty] / B. L. Frantsuzov, Iu. A. Sushko // *Zh. Ushn. Nos. Gorl. Bolezn.* – 1964. – № 24 (4). – P. 39–44.
109. Funnell, W. R. A critical review of experimental observations on ear-drum structure and function. / W. R. Funnell, C. A. Laszlo. – DOI 10.1159/000275593 // *ORL J. Otorhinolaryngol. Relat. Spec.* – 1982. – № 44 (4). – P. 181–205.
110. Funnell. W. R. Modeling of the cat eardrum as a thin shell using the finite-element method / W. R. Funnell, C. A. Laszlo. – DOI 10.1121/1.381892 // *J. Acoust. Soc. Am.* – 1978. – № 63 (5). – P. 1461–1467.
111. Fyrmpas, G. Lasers in endoscopic middle ear surgery: where do we stand today?/ G. Fyrmpas, N. Tsetsos, M. Katotomichelakis, M. Rudic – DOI 10.1007/s00405-021-06807-4// *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2021;278(11):4169-4177.
112. Gea, S. L. Tympanic membrane boundary deformations derived from static displacements observed with computerized tomography in human and gerbil / S. L. Gea, W. F. Decraemer, W. R Funnell [et al.] // *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* – 2010 Sep. – № 11 (3). – P. 525.
113. Gladstone, H. B. Tympanic membrane wound healing. An overview / H. B. Gladstone, R. K. Jackler, K. Varav // *Otolaryngol. Clin. North Am.* – 1995. – № 28 (5). – P. 913-932.

114. Glowacki, J. Collagen scaffolds for tissue engineering / J. Glowacki, S. Mizuno. // *Biopolymers*. – 2008. – Vol. 89, iss. 5. – P. 338–344.
115. Hakuba, N. A new method for closing tympanic membrane perforations using basic fibroblast growth factor / N. Hakuba, M. Taniguchi, Y. Shimizu [et al.]. – DOI 10.1097/00005537-200308000-00016. – PMID: 12897558 // *Laryngoscope*. – 2003 Aug. – № 113 (8). – P. 1352–1355.
116. Hakuba, N. Gelatin Hydrogel With Basic Fibroblast Growth Factor for Tympanic Membrane Regeneration / N. Hakuba, Y. Tabata, N. Hato [et al.] // *Otol Neurotol*. – 2014. – № 35 (3). – P. 540–544.
117. Heermann, J. Jr. Fascia and cartilage palisade tympanoplasty. Nine years' experience / J. Heermann Jr., H. Heermann, E. Kopstein. – DOI 10.1001/archotol.1970.00770040334004 // *Arch. Otolaryngol*. – 1970. – № 91 (3). – P. 228–241.
118. Helmholtz, H. The mechanism of the ossicles of the ear and membrana tympani / H. Helmholtz. – Nabu Press, 2009. – 80 p. [Originally Published in *Pfluger Archiv fur Physiologie*, vol. 1. Bonn, Germany Translated by Albert H. Buck and Normand Smith (1873),, New York: William and Wood Co, 1868].
119. Hildmann, H. Middle ear surgery / H. Hildmann, H. Sudhoff. – Berlin : Springer-Verlag, 2006. – 195 p.
120. Holmes, D. Eardrum regeneration: membrane repair / D. Holmes. – DOI 10.1038/546s5a // *Nature*. – 2017. – № 546 (7659). – P. S5–S5.
121. Hom, D. B. Growth factors and wound healing in otolaryngology / D. B. Hom. – DOI 10.1177/019459989411000615 // *Otolaryngol. Head Neck Surg*. – 1994. – № 110 (6). – P. 560–564.
122. Homoe, P. Otosurgery for chronic otitis media in remote areas: a fly in and fly out project in Greenland / P. Homoe, C. Siim, P. Bretlau // *European Archives of ORL and Head & Neck*. – 2007. – V. 264. – P. 193.
123. Hong, P. Repair of tympanic membrane perforation using novel adjuvant therapies: a contemporary review of experimental and tissue engineering studies / P. Hong, M. Bance, P. F. Gratzer // *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol*. – 2013. – № 77. – P. 3–12.

124. House, W. F. Myringoplasty. Use of ear canal skin compared with other techniques / W. F. House, J. L. Sheehy. – DOI 10.1001/archotol.1961.00740020417009 // Arch. Otolaryngol. – 1961. – № 73. – P. 407–415.

125. Huang, G. A method for measuring linearly viscoelastic properties of human tympanic membrane using nanoindentation / G. Huang, N. P. Daphalapurkar, R. Z. Gan, H. Lu, // Journal of biomechanical engineering. – 2008. – Vol. 130, № 1.

126. Ibekwe, T. Tympanic Membrane Perforation Among Adults in West Africa / T. Ibekwe, G. Ijaduola, O. Nwaorgu // Otology & Neurotology. – 2007. – № 28 (3). – P. 348–352.

127. Ikada, Y. Protein release from gelatin matrices / Y. Ikada, Y. Tabata. – DOI 10.1016/s0169-409x(97)00125-7 // Adv. Drug. Deliv. Rev. – 1998. – № 31 (3). – P. 287–301.

128. Imaizumi, M. Regenerative potential of basic fibroblast growth factor contained in biodegradable gelatin hydrogel microspheres applied following vocal fold injury: Early effect on tissue repair in a rabbit model / M. Imaizumi, R. Nakamura, Y. Nakaegawa [et al.] – DOI 10.1016/j.bjorl.2019.09.003 // Braz. J. Otorhinolaryngol. – 2019. – № S1808-8694(19)30117-X.

129. Immich, A. P. S. Improved tympanic membrane regeneration after myringoplastic surgery using an artificial biograft / A. P. S. Immich, P. C. Pennacchi, A. F. Naves [et al.] // Materials Science and Engineering: C. – 2017. – № 73. – P. 48–58.

130. Jalali, M. M. Comparison of cartilage with temporalis fascia tympanoplasty: A meta-analysis of comparative studies / M. M. Jalali, M. Motasaddi, A. Kouhi [et al.]. – DOI 10.1002/lary.26451 // Laryngoscope. – 2017. – № 127 (9). – P. 2139–2148.

131. Jang, C. H. Mesenchymal stem cell-laden hybrid scaffold for regenerating subacute tympanic membrane perforation. / C. H. Jang, S. Ahn, J. W. Lee [et al.]. – DOI 10.1016/j.msec.2016.11.094. – PMID: 28024609 // Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl. – 2017 Mar 1. – № 72. – P. 456-463.

132. Jang, C. H. Regeneration of chronic tympanic membrane perforation using 3D collagen with topical umbilical cord serum / C. H. Jang, Y. B. Cho, M. Yeo [et al.] // Int. J. Biol. Macromol. – 2013. – № 62. – P. 232–240.

133. Kabacoff. R. I. R in Action. Data analysis and graphics with R / R. I. Kabacoff. – Mining, 2016.
134. Kaftan, H. Ein verbessertes Tiermodell für chronische Trommelfellperforationen [An improved animal model for chronic perforation of the tympanic membrane] / H. Kaftan, W. Hosemann, A. Beule, D. Junghans. – DOI 10.1007/s00106-003-0963-2 // HNO. – 2004. – № 52 (8). – P. 714–719.
135. Kaftan, H. Systemic corticoid application in combination with topical mitomycin or dexamethasone. Inhibition of wound healing after myringotomy / H. Kaftan, W. Hosemann // HNO. – 2005. – № 53. – P. 779–783.
136. Kakigi, A. Expression of fibroblast growth factor receptors 1-4 in human chronic tympanic membrane perforation / A. Kakigi, A. Uchida, M. Nishimura [et al.] // J. Otorhinolaryngol. Relat. Spec. – 2010. – № 71. – P. 67–70.
137. Kamifusa, K. Thickness of human normal eardrum / K. Kamifusa, A. Kodama, Y. Oka, T. Ishii // Ear. Research Japan. – 1988. – № 9. – P. 16–21.
138. Kanemaru, S. I. Application of Regenerative Treatment for Tympanic Membrane Perforation With Cholesteatoma, Tumor, or Severe Calcification / S. I. Kanemaru, R. Kanai, M. Yoshida [et al.]. – DOI 10.1097/MAO.0000000000001701 // Otol. Neurotol. – 2018. – № 39 (4). – P. 438–444.
139. Kanemaru, S., Multicenter phase III trial of regenerative treatment for chronic tympanic membrane perforation / Kanemaru SI, Kanai R, Omori K, et al.- DOI 10.1016/j.anl.2021.02.007 // Auris Nasus Larynx. – 2021. - № 48 (6). – P. 1054-1060.
140. Kassem, F. Morphology of the human tympanic membrane annulus / F. Kassem, D. Ophir, J. Bernheim, G. Berger. – DOI 10.1016/j.otohns.2010.01.020 // Otolaryngol. Head Neck Surg. – 2010. – № 142 (5). – P. 682–687.
141. Kato, M. Repair of chronic tympanic membrane perforations with fibroblast growth factor / M. Kato, R. Jackler // Otolaryngol. Neck Surg. – 1996. – № 115 (5). – P. 38-47.
142. Kawabata, I. Fiber Arrangement in the Tympanic Membrane: Scanning Electron Microscope Observations / I. Kawabata, H. Ishii // Acta Oto-Laryngologica. – 1971. – Vol. 72. – № 1–6. – C. 243–254.

143. Ke, T. Co-Transplantation of Skin-Derived Precursors and Collagen Sponge Facilitates Diabetic Wound Healing by Promoting Local Vascular Regeneration / T. Ke, M. Yang, D. Mao [et al.] // *Cell Physiol. Biochem.* – 2015. – № 37. – P. 1725–1737.
144. Kierzek, A. Dziewietnastowieczni lekarze wobec perforacji błony bebenkowej [Nineteenth century physicians against drum perforation] / A. Kierzek // *Otolaryngol. Pol.* – 1995. – № 49 (6). – P. 614–617.
145. Kim, J. A healing method of tympanic membrane perforations using three-dimensional porous chitosan scaffolds / J. Kim, S. Kim, S. Choi [et al.] // *Tissue Eng. A.* – 2011. – № 17 (27). – P. 63–72.
146. Kim, J. H. Development of water-insoluble chitosan patch scaffold to repair traumatic tympanic membrane perforations / J. H. Kim, J.-H. Bae, K. T. Lim [et al.] // *J. Biomed. Mater. Res. A.* – 2009. – № 90 (4). – P. 46–55.
147. Kim, J. Tympanic membrane regeneration using a water-soluble chitosan patch / J. Kim, S. Choi, J. Park [et al.] // *Tissue Eng. A.* – 2010. – № 16 (2). – P. 25–32.
148. Kim, S. W. Latent progenitor cells as potential regulators for tympanic membrane regeneration / S. W. Kim, J. Kim, H. Seonwoo [et al.]. – DOI 10.1038/srep11542 // *Sci. Rep.* – 2015. – № 5. – P. 11542.
149. Kirikae, I. Physiology of the Middle Ear / I. Kirikae. – DOI 10.1001/archotol.78.3.109 // *Arch. Otolaryngol.* – 1963. – № 78 (3). – P. 109.
150. Kirikae, I. The Structure and Function of Middle Ear / I. Kirikae. – Tokio : Tokio University Press, 1960. – 60 p.
151. Knutsson, J. Collagen type distribution in the healthy human tympanic membrane / J. Knutsson, D. Bagger-Sjöbäck, M. von Unge. – DOI 10.1097/MAO.0b013e3181c0e621. // *Otol. Neurotol.* – 2009. – № 30 (8). – P. 1225–1229.
152. Knutsson, J. Localization of progenitor stem cells in the human tympanic membrane / J. Knutsson, M. Von Unge, H. Rask-Andersen // *Audiol. Neurootol.* – 2011. – № 16. – P. 63–69.

153. Koike, T. Modeling of the human middle ear using the finite-element method / T Koike., H. Wada, T. Kobayashi. – DOI 10.1121/1.1451073 // J. Acoust. Soc. Am. – 2002. – № 111 (3). – P. 1306–1317.
154. Koyo, Y. Morphological studies of the human tympanic membrane / Y. Koyo // Journal of Otolaryngology of Japan. – 1954. – № 57. – P. 115–126.
155. Kuypers, L. C. Thickness distribution of fresh and preserved human eardrums measured with confocal microscopy / L. C. Kuypers, W. F. Decraemer, J. J. J. Dirckx // Otolology and Neurotology. – 2006. – № 27 (2). – P. 256–264.
156. Kwong, K. Fat graft myringoplasty using umbilical fat / K. Kwong, M. Smith, J. Coticchia // International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology. – 2012. – № 76 (8). – P. 1098–1101.
157. Ladak, H. M. Response of the cat eardrum to static pressures: mobile versus immobile malleus. / H. M. Ladak, W. F. Decraemer, J. J. Dirckx, W. R. Funnell. – DOI 10.1121/1.1802673 // J. Acoust. Soc. Am. – 2004. – № 116 (5). – P. 3008–3021.
158. Li, J. Plasmin/plasminogen is essential for the healing of tympanic membrane perforations / J. Li, P. O. Eriksson, A. Hansson [et al.] // Thromb. Haemost. – 2006. – № 96 (4). – P. 512–519.
159. Liew, L. J. Tympanic Membrane Derived Stem Cell-Like Cultures for Tissue Regeneration/ L. J. Liew, L. Q. Chen, A. Y. Wang [et al.]. – DOI 10.1089/scd.2018.0021 // Stem Cells Dev. 2018. – № 27 (10). – P. 649–657.
160. Lim, D. J. Human tympanic membrane. An ultrastructural observation / D. J. Lim // Acta Oto-laryngologica. – 1970 – № 70 (3). – P. 176–186.
161. Lim, D. J. Structure and function of the tympanic membrane: a review / D. J. Lim // Acta. Otorhinolaryngol. Belg. – 1995. – № 49 (2). – P. 101–115.
162. Litton, W. B. Epithelial Migration Over the Tympanic Membrane and External Auditory Canal. – DOI 10.1001/jama.1963.03700120125061 // JAMA. – 1963. – № 183 (12). – P. 171. Litton, W. B.
163. Lott, D. G. Tissue Engineering for Otorhinolaryngology – Head and Neck Surgery / D. G Lott, J. R. Janus // Mayo Clinic Proceedings. – 2014. – № 89 (12). – P. 1722–1733.

164. Lou, Z. C. Regeneration of the tympanic membrane using fibroblast growth factor-2 / Z. C. Lou, Z. H. Lou, J. Xiao – DOI 10.1017/S002221511800083X // *J. Laryngol. Otol.* – 2018. – № 132 (6). – P. 470–478.
165. Lou, Z. Direct application of bFGF without edge trimming on human subacute tympanic membrane perforation / Z. Lou, P. Huang, J. Yang [et al.] // *Am. J. of Otolaryngol.* – 2016. – № 2 (37). – P. 156-161.
166. Lou, Z. FGF-2 for subacute tympanic membrane perforations / Z. Lou. – DOI 10.1016/j.amjoto.2016.08.010. – PMID: 27780584 // *Am. J. Otolaryngol.* – 2017 Jan-Feb. – № 38 (1). – P. 113–114.
167. Luo, H. A comparison of Young's modulus for normal and diseased human eardrums at high strain rates / H. Luo, H. Lu, C. Dai, R. Z. Gan // *International Journal of Experimental and Computational Biomechanics.* – 2009. – Vol. 1, № 1. – P. 1-22.
168. Luo, H. Mapping the Young's modulus distribution of the human tympanic membrane by microindentation / H. Luo, F. Wang, C. Cheng [et al.]. – DOI 10.1016/j.heares.2019.02.009 // *Hear Res.* – 2019. – № 378. – P. 75–91.
169. Maharajan, N. Application of mesenchymal stem cell for tympanic membrane regeneration by tissue engineering approach. / N. Maharajan, G. W. Cho, C. H. Jang. – DOI 10.1016/j.ijporl.2020.109969 // *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* – 2020. – № 133. – P. 109969.
170. Matsumoto, S. The Effect of Control-released Basic Fibroblast Growth Factor in Wound Healing: Histological Analyses and Clinical Application / S. Matsumoto, R. Tanaka, K. Okada [et al.]. – DOI 10.1097/GOX.0b013e3182a88787. – PMID: 25289238. – PMCID: PMC4174161 // *Plast. Reconstr. Surg. Glob. Open.* – 2013 Oct 7. – № 1 (6). – P. e44.
171. Mfoumou, E. Vibration-based damage detection and evaluation of sheet materials using a remote acoustic excitation / E. Mfoumou, C. Hedberg, S. Kao-Walter. – DOI 10.1134/s1063771008010181 // *Acoust. Phys.* – 2008. – № 54 (1). – P. 127–134.
172. Michels, T. C. Hearing Loss in Adults: Differential Diagnosis and Treatment / T. C. Michels, M. T. Duffy, D. J. Rogers // *Am. Fam. Physician.* – 2019. – № 100 (2). – P. 98–108.

173. Mokoyan Z, Svistushkin V, Zolotova A, Svistushkin M. Chronic tympanic membrane perforation: Histopathological evidence of the experimental model. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2021;151:110964. doi:10.1016/j.ijporl.2021.110964
174. Mota, C. Multiscale fabrication of biomimetic scaffolds for tympanic membrane tissue engineering. / C. Mota, S. Danti, D. D'Alessandro [et al.] // *Biofabrication.* – 2015. – № 7 (2). – P. 15–19.
175. Nair, L. CO2 Laser for De-epithelialization in Tympanoplasty/ Nair L, Gildener-Leapman N, Parnes S. – DOI 10.1007/s12070-018-1430-4// *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg.* 2019;71(Suppl 2):1364-1368.
176. Neumann, A. Type III tympanoplasty applying the palisade cartilage technique: a study of 61 cases / A. Neumann, H. J. Schultz-Coulon, K. Jahnke. – DOI 10.1097/00129492-200301000-00008 // *Otol. Neurotol.* – 2003. – № 24 (1). – P. 33–37.
177. Nocera, A. D. Development of 3D printed fibrillar collagen scaffold for tissue engineering / A. D. Nocera, R. Comín, N. A. Salvatierra, M. P. Cid. – DOI 10.1007/s10544-018-0270-z // *Biomed. Microdevices.* – 2018. – № 20 (2). – P. 26.
178. O'Connor, K. N. The effects of varying tympanic-membrane material properties on human middle-ear sound transmission in a three-dimensional finite-element model / K. N. O'Connor, H. Cai, S. Puria. – DOI 10.1121/1.5008741 // *J. Acoust. Soc. Am.* – 2017. – № 142 (5). – P. 2836.
179. O'Reilly, R. Creating a Stable Tympanic Membrane Perforation Using Mitomycin C. / R. O'Reilly, S. Goldman, S. Widner, S. Cass. – DOI 10.1067/mhn.2001.112199 // *Otolaryngology Head and Neck Surgery.* – 2001. – № 124 (1). – P. 40–45.
180. Onal, K. Functional results of temporalis fascia versus cartilage tympanoplasty in patients with bilateral chronic otitis media / K. Onal, S. Arslanoglu, M. Songu [et al.]. – DOI 10.11604/pamj.2019.33.323.18060 // *J. Laryngol. Otol.* – 2012. – № 126. – P. 22.
181. Ozkaptan, Y. Effects of fibroblast growth factor on the healing process of tympanic membrane perforations in an animal model / Y. Ozkaptan, M. Gerek, S. Simsek, S. Deveci // *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* – 1997. – № 254. – P. S2–S5.

182. Parekh, A. Repair of the tympanic membrane with urinary bladder matrix / A. Parekh, B. Mantle, J. Banks [et al.] // *Laryngoscope*. – 2009. – № 119. – 1206–1213.
183. Pfliederer, A. G. A study of recurrence of retraction pockets after various methods of primary reconstruction of attic and mesotympanic defects in combined approach tympanoplasty / A. G. Pfliederer, S. Ghosh, N. Kairinos [et al.] // *Clin. Otolaryngol.* – 2003. – Vol. 28, N 6. – P. 548–551.
184. Powell, H. M. Influence of electrospun collagen on wound contraction of engineered skin substitutes / H. M. Powell, D. M. Supp, S. T. Boyce // *Biomaterials*. – 2008. – Vol. 29, iss. 7. – P. 834–843.
185. Pyykkö, I. Laser-assisted myringoplasty-technical aspects / I. Pyykkö, D. Poe, H. Ishizaki – DOI 10.1080/000164800454215 // *Acta Otolaryngol Suppl.* 2000;543:135-138.
186. Ragab, S. M. The effect of radiofrequency and mitomycin C on the closure rate of human tympanostomy / S. M. Ragab // *Otol. Neurotol.* – 2005. – № 26. – P. 355–360.
187. Rahman, A. Stem cells and enhanced healing of chronic tympanic membrane perforation / A. Rahman, P. Olivius, J. Dirckx [et al.] // *Acta Otolaryngol.* – 2008. – № 128. – P. 352–359.
188. Ramalho, J. R. Healing of subacute tympanic membrane perforations in chinchillas treated with epidermal growth factor and pentoxifylline / J. R. Ramalho, R. F. Bento. – DOI 10.1097/01.mao.0000226316.04940.f9. – PMID: 16868521 // *Otol. Neurotol.* – 2006 Aug. – № 27 (5). – P. 720–727.
189. Rohani, S. A. Estimation of the Young's modulus of the human pars tensa using in-situ pressurization and inverse finite-element analysis / S. A. Rohani, S. Ghomashchi, S. K. Agrawal, H. M. Ladak. – DOI 10.1016/j.heares.2017.01.002 // *Hear Res.* – 2017. – № 345. – P. 69–78.
190. Ruah, C. Age-related morphologic changes in the human tympanic membrane / C. Ruah, P. Schachern, D. Zelterman [et al.] // *Archives of Otolaryngology, Head & Neck Surgery*. – 1991. – № 117. – P. 627–634.

191. Sadé, J. Atelectatic tympanic membrane: histologic study / J. Sadé – DOI 10.1177/000348949310200912 // *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* – 1993. – № 102 (9). – P. 712–716.
192. Salen, B. Myringoplasty Using Septum Cartilage / B. Salen // *Acta Otolaryngol. Suppl.* – 1964. – № 188. – P. 82.
193. Saliba, I. Hyaluronic acid fat graft myringoplasty: a minimally invasive technique / I. Saliba, O. Woods // *Laryngoscope.* – 2011. – № 121 (3). – P. 75–80.
194. Santa Maria, P. L. Chronic tympanic membrane perforation: a better animal model is needed / P. L. Santa Maria, M. D. Atlas, R. Ghassemifar. – DOI 10.1111/j.1524-475X.2007.00251// *Wound Repair Regen.* – 2007. – № 15 (4). – P. 450–458.
195. Santa Maria, P. L. Response to letter to the editor written by Peter Luke Santa Maria, MBBS, PhD / H. Seonwoo, S. W. Kim, J. Kim [et al.] // *Tissue Eng. A.* – 2013. – № 19. – P. 2110–2111.
196. Santa Maria, P. L. The role of epidermal growth factor in the healing tympanic membrane following perforation in rats / P. L. Santa Maria, S. L. Redmond, M. D. Atlas, R. Ghassemifar // *Journal of Molecular Histology.* – 2010. – № 41 (6). – P. 309–314.
197. Santos, F. Topical fibroblast growth factor-2 for treatment of chronic tympanic membrane perforations / F. Santos, E. Shu, D. J. Lee, D. H. Jung, A. M. Quesnel, K. M. Stankovic, D. B. Welling // *Laryngoscope investigative otolaryngology.* – 2020. – T. 5. – № 4. – P. 657–664.
198. Sasaki, N. Stress-strain curve and Young's modulus of a collagen molecule as determined by the X-ray diffraction technique / N. Sasaki, S. Odajima // *J. Biomech.* – 1996. – № 29 (5). – P. 655–658.
199. Schmidt, S. H. Tympanic-membrane structure–new views. A comparative study / S. H. Schmidt, S. Hellstrom. // *ORL Journal for Otorhinolaryngology and its Related Specialities.* – 1991. – № 53 (1). – P. 32–36.
200. Schwarz, D. Acoustic Properties of Collagenous Matrices of Xenogenic Origin for Tympanic Membrane Reconstruction / D. Schwarz, D. Pazen, K. Gosz [et al.] // *Otology & Neurotology.* – 2016. – № 37 (6). – P. 692–697.

201. Seonwoo, H. Latent stem cell-stimulating therapy for regeneration of chronic tympanic membrane perforations using IGFBP2-releasing chitosan patch scaffolds / H. Seonwoo, S. W. Kim, B. Shin [et al.] – DOI 10.1177/0885328219845082 // *J. Biomater. Appl.* – 2019. – № 34 (2). – P. 198–207.
202. Shea, J. J. Jr. Vein graft closure of eardrum perforations / J. J. Shea Jr. // *J. Laryngol. Otol.* – 1960. – № 74. – P. 358.
203. Sheehy, J. L. Myringoplasty. A review of 472 cases / J. L. Sheehy, R. G. Anderson. – DOI 10.1177/000348948008900407 // *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* – 1980. – № 89 (4 Pt 1). – P. 331–334.
204. Shekhter, A. B. Medical Applications of Collagen and Collagen-Based Materials / A. B. Shekhter, A. L. Fayzullin, M. N. Vukolova [et al.] – DOI 10.2174/0929867325666171205170339 // *Curr. Med. Chem.* – 2019. – № 26 (3). – P. 506–516.
205. Shen, Y. Plasminogen initiates and potentiates the healing of acute and chronic tympanic membrane perforations in mice / Y. Shen, Y. Guo, M. Wilczynska [et al.] – DOI 10.1186/1479-5876-12-5 // *J. Transl. Med.* – 2014. – № 12. – P. 5.
206. Shomer, N. H. Review of Rodent Euthanasia Methods / N. H. Shomer, K. H., Allen-Worthington, D. L. Hickman [et al.]. – DOI 10.30802/AALAS-JAALAS-19-000084 // *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* – 2020. – № 59 (3). – P. 242–253.
207. Singh, M. Comparative study of the underlay and overlay techniques of myringoplasty in large and subtotal perforations of the tympanic membrane / M. Singh, A. Rai, S. Bandyopadhyay, S. Gupta // *J. Laryngology & Otology.* – 2003. – Vol. 117, No. 6. – P. 444–448.
208. Spandow, O. Structural Characterization of Persistent Tympanic Membrane Perforations in Man / O. Spandow, S. Hellström, M. Dahlström. – DOI 10.1097/00005537-199603000-00020 // *Laryngoscope.* – 1996. – № 106 (3). – P. 346–352.
209. Spiegel, J. H. Tympanic membrane perforation repair with acellular porcine submucosa / J. H. Spiegel, J. L. Kessler // *Otol. Neurotol.* – 2005. – № 26. – P. 563–566.

210. Stavrakas, M. Platelet-rich plasma in otolaryngology / M. Stavrakas, P. D. Karkos, K. Markou, N. Grigoriadis – DOI 10.1017/S0022215116009403 // J Laryngol Otol. 2016;130(12):1098-1102.

211. Stinson, W. Reparative processes in the membrana tympani: some interesting manifestations / W. Stinson. – DOI 10.1001/archotol.1936.00640050613006 // Archives of Otolaryngology – Head and Neck Surgery. – 1936. – № 24 (5). – P. 600–605.

212. Storrs L. Myringoplasty / L. Storrs. – DOI 10.1288/00005537-196602000-00001// The Laryngoscope. – 1966. – № 76 (2). – P. 185–195.

213. Tahar Aissa, J. Healing of laser-induced tympanic membrane perforations in rats: no contribution of granulocyte colony-stimulating factor or Gelfoam / J. Tahar Aissa, M. Hulcrantz. – DOI 10.1016/j.ijporl.2012.03.006 // Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol. – 2012. – № 76 (7). – P. 963–968.

214. Takechi, M. Developmental mechanisms of the tympanic membrane in mammals and non-mammalian amniotes / M. Takechi, T. Kitazawa, T. Hirasawa [et al.]. – DOI 10.1111/cga.12132 // Congenit. Anom. (Kyoto). – 2016. – № 56 (1). – P. 12–17.

215. Teh, B. M. Tissue engineering of the tympanic membrane / B. M. Teh, R. J. Marano, Y. Shen [et al.] – DOI 10.1089/ten.TEB.2012.0389 // Tissue Eng. Part B Rev. – 2013. – № 19 (2). – P. 116–132.

216. Tos, M. Cartilage tympanoplasty methods: proposal of a classification / M. Tos. – DOI 10.1016/j.otohns.2008.09.021 // Otolaryngol. Head Neck Surg. – 2008. – № 139 (6). – P. 747–758.

217. Tos, M. Reasons for re-perforation after tympanoplasty in children / M. Tos, S. E. Stangerup, S. Orntoft. – DOI 10.1080/000164800454233 // Acta Otolaryngol. Suppl. – 2000. – № 543. – P. 143–146.

218. Trakimas, D. R. Otopathologic evaluation of temporalis fascia grafts following successful tympanoplasty in humans / D. R. Trakimas, R. Ishai, I Ghanad [et al.]. – DOI 10.1002/lary.27239 // Laryngoscope. – 2018. – № 128 (10). – P. E351–E358.

219. Truy, E. Chronic tympanic membrane perforation: an animal model / E. Truy, F. Disant, A. Morgon // Am. J. Otol. – 1995. – № 16. – P. 222–225.

220. Tuck-Lee, J. P. Finite element modeling of acousto-mechanical coupling in the cat middle ear / J. P. Tuck-Lee, P. M. Pinsky, C. R. Steele, S. Puria // *Journal of the Acoustical Society of America*. – July 2008. – № 124 (1). – P. 348–362.
221. Shen, Y. Tympanic membrane repair using silk fibroin and acellular collagen scaffolds / Y. Shen, S. Redmond, B. Teh, S. Yan, Y. Wang, M. Atlas // *The Laryngoscope*.-2013. - 123(8). – P. 1976-1982.
222. Uebo, K. Thickness of normal human tympanic membrane / K. Uebo, A. Kodama, Y. Oka, T. Ishii // *Ear Research Japan*. – 1988. – № 19. – P. 70–73.
223. United States patent. US 4077069. 1977 Jan 14. Perkins, inventor. Synthetic tympanic membrane / C. Rodney.
224. Uslu, C. Cartilage reinforcement tympanoplasty: otological and audiological results / C. Uslu, A. Tek, A. Tatlipinar [et al.] // *Acta Otolaryngol.* – 2010. – V.130, No. 3. – P. 375–383.
225. Van Deirse, J. B. Attico-antrotomy with Abdominal Fat Transplantation and Myringoplasty / J. B. Van Deirse, R. E. Van den Borg. – DOI 10.1159/000274163 // *ORL*. – 1958. – № 20(4-5). – P. 327–332.
226. Villar-Fernandez, M. A. Outlook for Tissue Engineering of the Tympanic Membrane / M. A. Villar-Fernandez, J. A. Lopez-Escamez. – DOI 10.4081/audiores.2015.117 // *Audiol. Res.* – 2015. – № 5 (1). – P. 117.
227. Vollandri, G. Biomechanics of the tympanic membrane / G. Vollandri, F. Di Puccio, P. Forte, C. Carmignani. – DOI 10.1016/j.jbiomech.2010.12.023. // *J. Biomech.* – 2011. – № 44 (7). – P. 1219–1236.
228. Von Békésy, G. Experiments in hearing / G. Von Békésy, E. G. Wever. – New York : McGraw-Hill, 1960. – T. 8.
229. von Unge, M. The early events in the healing of laser-produced tympanic membrane perforation / M. von Unge, M. Hulcrantz. – DOI 10.3109/00016489.2010.533696 // *Acta Otolaryngol.* – 2011. – № 131 (5). – P. 480–487.
230. Wallenborn, W. M. Acute traumatic tympanic membrane perforations: cover or observe / W. M. Wallenborn // *Arch. Otolaryngol.* – 1987. – № 113. – P. 1285–1287.

231. Wang, A. Y. Animal models of chronic tympanic membrane perforation: a 'time-out' to review evidence and standardize design / A. Y. Wang, Y. Shen, J. T. Wang [et al.]. – DOI 10.1016/j.ijporl.2014.10.007 // Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol. – 2014. – № 78 (12). – P. 2048–2055.

232. Wang, A. Y. Rat model of chronic tympanic membrane perforation: Ventilation tube with mitomycin C and dexamethasone / A. Y. Wang, Y. Shen, L. J. Liew [et al.] – DOI 10.1016/j.ijporl.2015.11.010 // Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol. – 2016. – № 80. – P. 61–68.

233. Wang, X. Finite-element analysis of middle-ear pressure effects on static and dynamic behavior of human ear / X. Wang, T. Cheng, R. Z. Gan. – DOI 10.1121/1.2749417 // J. Acoust. Soc. Am. – 2007. – № 122 (2). – P. 906–917.

234. Weber, D. E. Tissue-engineered calcium alginate patches in the repair of chronic chinchilla tympanic membrane perforations / D. E. Weber, M. T. Semaan, J. K. Wasman [et al.] // Laryngoscope. – 2006. – № 116 (7). – P. 10–19.

235. Wei, X. M. Advances of chronic tympanic membrane perforation animal model / X. M. Wei, G. D. Feng, Z. Q. Gao // Zhonghua er bi yan hou tou jing wai ke za zhi = Chinese journal of otorhinolaryngology head and neck surgery. – 2019. – T. 54. – №. 10. – C. 781-786.

236. Whittemore Jr., K. R. A normative study of tympanic membrane motion in humans using a laser Doppler vibrometer (LDV) / K. R. Whittemore Jr., S. N. Merchant, B. B. Poon, J. J. Rosowski. – DOI 10.1016/s0378-5955(03)00332-0 // Hear Res. – 2004. – № 187 (1-2). – P. 85–104.

237. WHO. Deafness and hearing loss. Fact sheet N 300. Updated March 2019. – URL: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/deafness-and-hearing-loss>.

238. Williams, K. R. H. A finite element analysis of the natural frequencies of vibration of the human tympanic membrane. Part I / K. R. Williams, T. H. Lesser. – DOI 10.3109/03005369009076572 // Br. J. Audiol. – 1990. – № 24 (5). – P. 319–327.

239. Wu, J. Study of clinical outcome and prognosis in pediatric core binding factor-acute myeloid leukemia / J. Wu, A. D. Lu, L. P. Zhang [et al.]. – DOI

10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2019.01.010 // *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi.* – 2019 Jan 14. – № 40 (1). – P. 52–57.

240. Wullstein, H. *Theory and Practice of Tympanoplasty* / H. Wullstein. – DOI 10.1288/00005537-195608000-00008. // *Laryngoscope.* – 1956. – № 66 (8). – P. 1076–1093.

241. Xie, S. HB-EGF expression as a potential biomarker of acquired middle ear cholesteatoma / S. Xie, X. Wang, H. Ren [et al.] // *Acta Otolaryngol.* – 2017. – № 137 (8). – P. 797–802.

242. Zhao, F. Finite element analysis of the middle ear transfer functions and related pathologies / F. Zhao, T. Koike, J. Wang [et al.]. – DOI 10.1016/j.medengphys.2009.06.009 // *Med. Eng. Phys.* – 2009. – № 31 (8). – P. 907–916.

243. Zöllner, F. *The Principles of Plastic Surgery of the Sound-Conducting Apparatus* / F. Zöllner. – DOI 10.1017/s0022215100051240 // *The Journal of Laryngology & Otology.* – 1955. – № 69 (10). – P. 637–652.