

И.Н. Дьяконова, Ю.С. Ишанова, И.В. Рахманова

Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва,
Российская Федерация

Изучение созревания слухового анализатора кролика по данным вызванной отоакустической эмиссии

Цель исследования: в хроническом эксперименте зарегистрировать изменения величин акустического ответа показателей отоакустической эмиссии на частоте продукта искажения у интактных кроликов в постнатальном онтогенезе для получения нормативных данных, которые можно использовать при изучении влияния патологических факторов на слуховую функцию и созревание активности наружных волосковых клеток в онтогенезе. **Материалы и методы:** исследование показателей отоакустической эмиссии проводилось на половозрелых кроликах породы шиншилла с 19-го дня жизни до 3 мес. **Результаты:** в ходе работы были получены сроки созревания функциональной активности наружных волосковых клеток улитки. **Заключение:** полученные нормативные данные позволяют изучать, используя модель кролика, патологическое действие агентов на созревание наружных волосковых клеток улитки в эксперименте.

Ключевые слова: кролики, онтогенез, орган слуха, показатели отоакустической эмиссии на частоте продукта искажения. (Вестник РАМН. 2013; 11: 94–97)

94

Введение

Интенсивное развитие современных технологий в неонатологии делает возможным выхаживание детей с глубокой степенью недоношенности, что, безусловно, увеличивает процент их выживаемости, с одной стороны, но с другой возрастает число детей, родившихся с незрелым слуховым анализатором. Как известно, незрелый слуховой анализатор уже представляет фактор риска для развития в дальнейшем тугоухости или глухоты [1]. Серьезность проблемы нарушения слуховой функции усугубляется необходимостью применять недоношенным детям в ранние сроки ототоксические антибиотики по жизненным показаниям (10–41,3% случаев) [2, 3].

В связи с этим требуются знания критериев, позволяющих дифференцировать повреждение слухового анализатора от задержки созревания, а также информация о степени влияния разного рода повреждающих

факторов на слуховую функцию в целом и темпы ее созревания. Ответы на эти вопросы могут быть получены только в эксперименте при воздействии повреждающих факторов, но при условии знания нормативных величин слуховой функции выбранного лабораторного животного и представления об изменении этих величин в процессе нормального созревания слухового анализатора.

Ранее с использованием метода слуховых вызванных потенциалов (КСВП) были прослежены сроки созревания слухового анализатора кролика в процессе онтогенеза, что дало возможность впоследствии не только изучать патологическое воздействие ототоксических препаратов во время созревания, но и предложить практические рекомендации по длительному наблюдению за формированием слухового анализатора недоношенных детей [4, 5].

В настоящее время в клинической практике скрининговым методом оценки слуховой функции у новорожден-

I.N. Dyakonova, Y.S. Ishanova, I.V. Rakhmanova

N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

The Study of Maturation of the Auditory Analyzer Rabbit According Distortion-Product Otoacoustic Emissions

Aim: in our chronic experiment to register changes of acoustic response of Distortion-Product Otoacoustic Emissions (DPOAE) of intact rabbits in postnatal ontogenesis for the purpose of getting normative data which can be used for studying impact of pathological factors on auditory function and maturation of activity of outer hair cell in ontogenesis. **Materials and methods:** study of otoacoustic emissions used mature chinchilla rabbits with a 19 day life of up to 3 months. **Results:** in the course of ripening were obtained functional activity of outer hair cells of the cochlea. **Conclusion:** normative data obtained allow us to study using a rabbit model, the pathological effects of agents on the maturation of the outer hair cells of the cochlea in the experiment.

Key words: immature rabbits, ontogenesis, organ of hearing, DPOAE.

(Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk — Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2013; 11: 94–97)

ных является метод вызванной отоакустической эмиссии (ВОАЭ). Этот способ оценки слуха оказался предпочтительным, поскольку он неинвазивен, информативен и позволяет с высокой долей вероятности диагностировать патологию органа слуха еще в родильном доме [6–10]. Сущность метода заключается в регистрации вызванных звуковым стимулом микромеханических колебаний (сокращений) наружных волосковых клеток, которые улавливаются чувствительным микрофоном, введенным в наружный слуховой проход. Основной характеристикой ответа ВОАЭ является величина ее амплитуды, которая определяется в основном эффективностью работы наружных волосковых клеток [1].

В доступной литературе нет описания изменения показателей ВОАЭ в процессе онтогенеза, а встречающиеся экспериментальные работы касаются изучения показателей ВОАЭ после введения ототоксических препаратов взрослым кроликам [11]. В связи с этим было решено проследить созревание слуховой функции у кроликов, используя для индикации метод ВОАЭ.

В качестве экспериментальных животных были выбраны кролики, поскольку их слуховая чувствительность в достаточной мере сходна с таковой у человека. Помимо того, известно о возможности использования этого вида животных для изучения влияния различных факторов на созревание слуховой функции, а также для оценки повреждений органа слуха антибиотиками аминогликозидного ряда [12]. К тому же преждевременно рожденных кроликов используют как модель недоношенных детей [13].

Цель исследования: изучить изменения показателей отоакустической эмиссии на частоте продукта искажения (ПИОАЭ) у интактных кроликов в постнатальном онтогенезе с целью возможного дальнейшего использования полученных данных при исследовании влияния ототоксических препаратов или других повреждающих факторов на орган слуха в процессе его созревания.

Материалы и методы

Материал для исследования

В исследуемую группу вошло 20 неполовозрелых кроликов (40 ушей) породы шиншилла. Критериями включения животного в эксперимент были отсутствие признаков соматической патологии, воспаления барабанных перепонки при отоскопии, положительный рефлекс Прейера (непроизвольное движение ушных раковин животных в ответ на звуковой раздражитель).

Методы исследования

Регистрация на ПИОАЭ $2 \times f_1 - f_2$ (f_1 — частота первого тона, f_2 — частота второго тона) выполнялась на скрининговых речевых частотах 1, 2, 4, 6 кГц при интенсивности 65/55 дБ УЗД (уровень звукового давления), соотношение $f_2/f_1 = 1,22$. Общее максимальное время тестирования составляло 60 с. Использовали быстрый тест построения ДР-граммы (график зависимости амплитуды ПИОАЭ от частоты тона). В протоколе ДР-тестов для получения результата «Тест пройден» учитывали следующее условие: соотношение (разница) сигнал / шум (signal/noise, S/N) должно быть более 7 дБ УЗД на 3 из 4 тестируемых частот при разрешенной толерантности стимула 3 дБ УЗД. Для прохождения теста каждый единственный ответ ПИОАЭ должен был быть стабильным в течение определенного временного промежутка в соотношении сигнал / шум на тестируемых частотах.

Качество установки акустического зонда в наружном слуховом проходе оценивали предварительно, по специальному графику на экране прибора. Исследование слуха осуществляли на 12, 19, 26, 35 и 45-е сут жизни животных, затем — через 2 и 3 мес, по достижении уровня половозрелости.

Слуховую функцию оценивали по мощности акустического ответа (усредненная величина амплитуд для всех тестируемых частот), а также по амплитуде ответов на отдельных частотах — 1, 2, 4 и 6 кГц. Помимо этого, с целью объективизации процесса созревания наружных волосковых клеток и отдельных участков базилярной мембраны рассчитывали коэффициент прироста мощности акустического ответа и коэффициент прироста на каждой частоте в отдельности (как за весь период наблюдения, так и за 1 сут) по формуле [14]:

$$K = (A_{cp2} - A_{cp1}) / T_{2-1},$$

где K — коэффициент прироста мощности ответа; A_{cp1} — среднее значение мощности ответа предыдущего обследования; A_{cp2} — среднее значение мощности ответа последующего обследования; T_{2-1} — интервал времени между предыдущим и последующим обследованием (в сут).

Запись ПИОАЭ производили после внутримышечного введения 0,1 мл/кг Рометара 2% (*Xylazinehydrochloridum*, 20 мг в 1 мл). При регистрации ПИОАЭ лабораторных животных не фиксировали, они свободно лежали на специальном столе.

Содержание и все манипуляции на кроликах проведены в соответствии с требованиями к работе с экспериментальными животными («Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных» — Приказ МЗ СССР № 775 от 12.08.1987 г., Федеральный закон «О защите животных от жестокого обращения» от 01.01.1997 г., Приказ МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики»), одобренными Локальным этическим комитетом.

Статистическая обработка данных

Статистический анализ результатов осуществляли методами вариационной статистики с применением программы Statgraphics Centurion XV. Для каждого исследуемого признака определяли показатель среднего арифметического (M) и стандартной ошибки среднего арифметического (m). Нормальность распределения оценивали по значениям асимметрии и эксцесса. При условии соответствия распределения нормальному достоверность полученных различий сопоставляемых величин оценивали с применением t -критерия Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

По данным предыдущего исследования, устойчивые параметры КСВП у кроликов удается зафиксировать, начиная с 12-х сут жизни [4]. Однако осуществить регистрацию ПИОАЭ у кроликов в этот период жизни не удается из-за анатомической узости наружного слухового прохода. В результате регистрацию ПИОАЭ проводили, начиная с 19-х сут жизни.

В ходе многодневных экспериментальных наблюдений результат «Тест пройден» на оба уха был зарегистрирован у всех животных в течение всего срока наблюдения, начиная с 19-х сут и до 3 мес жизни (возраст половозрело-

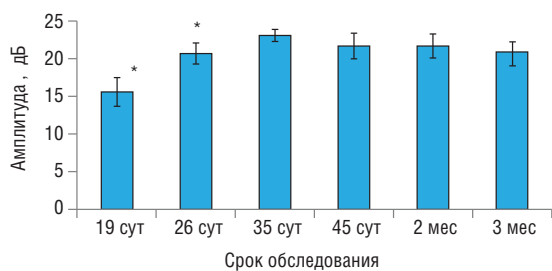


Рис. 1. Мощность ответа ПИОАЭ в течение всего срока наблюдения ($M \pm m$; $n = 40$).

Примечание (здесь и на рис. 2). * — $p < 0,05$.

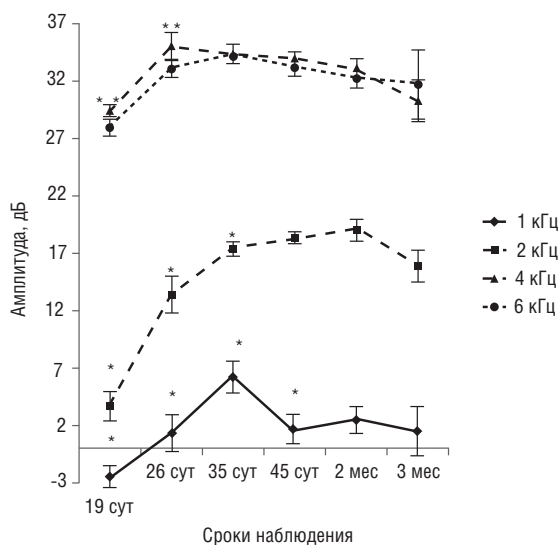


Рис. 2. Динамика формирования частотного ответа улитки у кроликов в течение всего срока наблюдения ($M \pm m$; $n = 40$).

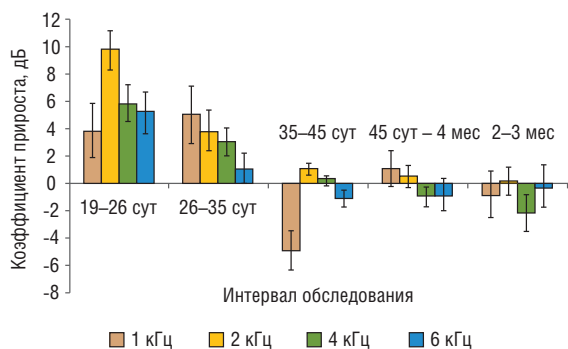


Рис. 3. Зависимость коэффициента прироста мощности ответа от частоты и интервала обследования ($M \pm m$; $n = 40$).

сти). Результаты изменения мощности ответа с возрастом животного отражены на рис. 1.

Мощность ответа ПИОАЭ статистически достоверно возрастала между 19–26-ми и 26–35-ми сут. Максимальный прирост мощности ответа был зарегистрирован между 19-ми и 26-ми сут, что выражалось в получении наибольшего коэффициента прироста ($6,2 \pm 1,08$ дБ). Между 26-ми и 35-ми сут этот коэффициент составил $2,3 \pm 1,03$ дБ (табл.). Необходимо отметить, что усредненное значение амплитуды ответа, зафиксированное на 26-е сут жизни, уже соответствовало таковому у половозрелых животных (3 мес жизни; $p > 0,05$). После 35-х сут жизни коэффициент прироста мощности ответа не претерпевал статистически значимых изменений ($p > 0,05$) и оказался нулевым. Сделанный вывод обоснован рассчитанным коэффициентом прироста мощности ответа (см. табл. 1).

Для выяснения степени зрелости отдельных участков базиллярной мембраны, ответственных за определенную частоту улитки на каждом сроке обследования, были обработаны данные, полученные на каждой из тестируемых частот (рис. 2).

При рассмотрении кривых на рис. 2 обращает на себя внимание неравномерность значений амплитуд различных частот. Доминирующая (наибольшая) амплитуда ответа была зарегистрирована на частоте 6 кГц. В абсолютных значениях акустический ответ на частоте 4 кГц был меньше по сравнению с частотой 6 кГц, но статистически значимо не различался ($p > 0,05$). Наименьшая амплитуда зафиксирована на частоте 1 кГц.

Рост амплитуды ответов на тестируемых частотах происходит неравномерно: для частот 4 и 6 кГц он прекращается к 26-м сут жизни, для частоты 2 кГц — после 35-х сут, для частоты 1 кГц стабилизация амплитуды ответа происходит к 45-м сут жизни.

Для подтверждения различных темпов созревания функциональной активности наружных волосковых клеток были рассчитаны коэффициенты прироста амплитуды ответа для каждой частоты (рис. 3), из которых видно, что наибольший прирост отмечается на частоте 2 кГц в интервале между 19-ми и 26-ми сут.

Ранее, по данным регистрации КСВП, нами была оценена функциональная активность структур периферического отдела слухового анализатора в процессе онтогенеза [4]. Показано, что порог 1-го пика не претерпевает статистически значимых изменений после 26-х сут, т.е. функциональная активность клеток спирального ганглия, ответственного за 1-й пик, остается без изменений. Сдвиг значений латентного периода 1-го пика на 100 и 30 дБ также стабилизируется после 26-го дня жизни. На основании проведенных исследований с использованием метода ВОАЭ можно полагать, что созревание наружных волосковых и клеток спирального ганглия идет параллельно.

Исходя из представленных ранее результатов [4] и данных, полученных в настоящем исследовании, можно заключить, что функциональное созревание структур улитки (наружные и внутренние волосковые клетки, клетки спирального ганглия) происходит к 26-м сут жизни.

Таблица. Коэффициент прироста мощности ответа ПИОАЭ у кроликов в течение онтогенеза ($M \pm m$; $n = 40$)

Коэффициент прироста, дБ									
19–26-е сут		26–35-е сут		35–45-е сут		45-е сут — 2 мес жизни		2–3 мес жизни	
За 1-е сут	За весь период	За 1-е сут	За весь период	За 1-е сут	За весь период	За 1-е сут	За весь период	За 1-е сут	За весь период
0,9±0,15	6,2±1,08	0,26±0,11	2,3±1,03	-0,13±0,04	-1,3±0,43	-0,004±0,04	-0,05±0,7	-0,02±0,03	-0,7±0,9

Таким образом, в ходе проведенной экспериментальной работы было установлено, что к 26-м сут мощность ВOAЭ у кролика в целом сформирована и соответствует амплитудам половозрелых животных. Максимальный прирост мощности ответа зарегистрирован между 19-ми и 26-ми сут жизни. Наименьшая амплитуда ответа характерна для частоты 1 кГц, наибольшая — для частоты 6 кГц. Рост амплитуды ответов на тестируемых частотах происходит неравномерно: для частоты 4 и 6 кГц он прекращается к 26-м, для частоты 2 кГц — к 35-м, на частоте 1 кГц — к 45-м сут жизни.

Заключение

Полученные экспериментальные данные можно использовать в качестве нормативных показателей при изучении влияния патологических факторов (введение ототоксических препаратов, гипоксия, гипербилирубинемия и т.д.) на созревание активности наружных волосковых клеток в онтогенезе.

Для определения влияния повреждающего агента на незрелый слуховой анализатор кролика исследование должно начинаться не позднее 26-го дня с момента его рождения.

REFERENCES

1. Kemp D.T. Otoacoustic emissions, their origin in cochlear function, and use. *Brit. Med. Bull.* 2002; 63: 223–241.
2. Korres S., Nikolopoulos T.P., Komkoto V., Balatsouras D., Kandiloros D., Constantinou D., Ferekidis E. Newborn hearing screening: effectiveness, importance of high-risk factors, and characteristics of infants in the neonatal intensive care unit and well-baby nursery. *Otol. Neurotol.* 2005; 26 (6): 1186–1190.
3. Sun J.H., Li J., Huang P., Bu J., Xu Z.M., Li J., Shen X.M. Early detection of hearing impairment in high-risk infants of NICU. *Zhonghua Er Ke Za Zhi.* 2003. 41 (5): 357–359.
4. D'yakonova I.N., Rakhmanova I.V., Ishanova Yu.S. *Byull. eksp. biol. i meditsiny — Bulletin of experimental biology and medicine.* 2011; 5(151): 536–539.
5. D'yakonova I.N., Rakhmanova I.V., Ishanova Yu.S. *Pediatrich. farmakol — Pediatric pharmacology.* 2011; 5(8): 70–75.
6. Sapozhnikov Ya.M., Bogomil'skii M.R. *Sovremennye metody diagnostiki, lecheniya i korrektsii tugoukhosti i glukhoty u detei* [Current Methods of Diagnosis, Treatment and Correction Obtusity of the Ear and Deafness]. Moscow, 2001. 257 p.
7. Tavartkiladze G.A. *Edinaya sistema audiologicheskogo skrininga. Metod. rekomendats* [Unified System of Audiologic Screening. Guideline]. Moscow, 1996.
8. Tavartkiladze G.A. *Novosti otolaringol. i logopatol — Issues of otolaryngology and lalopathology.* 1996; 3–4, 7–8: 50–54.
9. Tavartkiladze G.A., Shmatko N.D. *Diagnostika i korrektsiya narushenii slukhovoii funktsii u detei pervogo goda zhizni. Metod. pos* [Diagnosis and Correction of Hearing Disorder in Children during the First Year of Life]. Moscow, 2001.
10. Zagoryanskaya M.E., Rummyantseva M.G., Dainyak L.B. *Vestnik otorinolaringologii — Bulletin of otolaryngology.* 2003; 6: 7–10.
11. Pavlidis P., Nikolaidis V., Gouveris H., Papadopoulos E., Kekes G., Kouvelas D. Ototoxicity caused by once- and twice-daily administration of amikacin in rabbits. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 2010; 74 (4): 361–364.
12. Porter C.A., Martin G.K., Stagner B.B. Lonsbury-Martin B. L. Distortion-product otoacoustic emission suppression growth in normal and noise-exposed rabbits. *J. Acoust. Soc. Am.* 2006; 120 (2): 884–900.
13. Chua C.O., Chahboune H., Braun A. Dummula K., Chua C. E., Yu J., Ungvari Z., Sherbany A. A., Hyder F., Ballabh P. Consequences of intraventricular hemorrhage in a rabbit pup model. *Stroke.* 2009; 40 (10): 3369–3377.
14. D'yakonova I.N., Rakhmanova I.V., Ishanova Yu.S. *Vestn. RGMU — Bulletin of RSMU.* 2012; 1: 61–65.

FOR CORRESPONDENCE

D'yakonova Irina Nikolaevna, PhD, professor of the Department of Physiology of Medico-Biological Faculty of N.I. Pirogov RRMU.

Address: 1, Ostrovityanov Street, Moscow, RF, 117997, **tel.:** +7 (495) 434-83-00; **e-mail:** i-dyak@mail.ru

Ishanova Yuliya Sergeevna, MD, senior research scientist of the Laboratory for Scientific Research of Clinical and Experimental Pediatric Otolaryngology of N.I. Pirogov RRMU.

Address: 1, Ostrovityanov Street, Moscow, RF, 117997, **tel.:** +7 (499) 236-45-38; **e-mail:** ishanova@hotmail.com

Rakhmanova Irina Viktorovna, PhD, Head of the Laboratory for Scientific Research of Clinical and Experimental Pediatric Otolaryngology of N.I. Pirogov RRMU.

Address: 1, Ostrovityanov Street, Moscow, RF, 117997, **tel.:** +7 (499) 236-45-38; **e-mail:** ishanova@hotmail.com