



Т.В. Золотова¹, Н.В. Дубинская²

МИКРОЭЛЕМЕНТНЫЙ СОСТАВ КЛЕТОК СПИРАЛЬНОГО ОРГАНА ПРИ СЕНСОНЕВРАЛЬНОЙ ТУГОУХОСТИ

¹Ростовский государственный медицинский университет,

кафедра болезней уха, горла и носа

Россия, 344022, г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29. E-mail: cehhin@aaanet.ru

²МЛПУЗ Городская больница №1 им.Н.А.Семашко

Россия, 344010, г. Ростов-на-Дону, просп. Ворошиловский, 105

Цель: изучение микроэлементного состава клеток спирального органа экспериментальных животных при воспроизведении у них сенсоневральной тугоухости.

Материалы и методы: исследовали микроэлементный состав клеток спирального органа 15 крыс методом рентгено-спектрального микроанализа.

Результаты: у 10 животных с экспериментальной ототоксической сенсоневральной тугоухостью выявлено изменение содержания микроэлементов по сравнению с контролем.

Выводы: в клетках спирального органа улиток крыс при экспериментальной сенсоневральной тугоухости наибольшие сдвиги отмечены по отношению к изменению доли кальция.

Ключевые слова: сенсоневральная тугоухость, экспериментальные животные, микроэлементный состав, спиральный орган.

T.V. Zolotova¹, N.V. Dubinskaya²

THE STUDY OF MICROELEMENT COMPOSITION OF THE SPIRAL ORGAN'S CELLS IN EXPERIMENTAL SENSORINEURAL HEARING LOSS

¹Rostov State Medical University,

ENT department

29 Nakhichevansky st, Rostov-on-Don, 344022, Russia. E-mail: cehhin@aaanet.ru

²Municipal Hospital № 1

105 Voroshilovskiy av, Rostov-on-Don, 344010, Russia

Purpose: Studied microelements composition of the spiral organ's cells in experimental sensorineural hearing loss.

Materials and Methods: The X-ray microanalyses of the spiral organ of 15 rats were performed.

Results: The 10 experimental animals with sensorineural hearing loss showed changes in trace element content compared with controls.

Summary: The greatest improvements were observed in relation to the share of calcium in experimental sensorineural hearing loss.

Keywords: Sensorineural hearing loss, Experimental animals, Microelement composition, Spiral organ.



Введение

Нарушения электролитного баланса в развитии сенсоневральной тугоухости, в частности роль кальциевого метаболизма как одного из основных механизмов, участвующих в регуляции гомеостаза, относятся к изменениям на клеточно-молекулярном уровне и остаются малоизученной областью при патологии слухового анализатора [1,2]. Известно, что система транспорта ионов кальция в мембранных структурах мозга обладает наиболее высокой чувствительностью к перекисному окислению липидов, развивающемуся, например, в острой фазе черепно-мозговой травмы, острого нарушения мозгового кровообращения. Даже незначительное накопление продуктов перекисного окисления липидов в нейрональной мембране приводит к выраженному ингибированию кальций-транспортующей способности, перегрузке нейрона кальцием. Избыток кальция в цитоплазме нейрона может привести к активации внутриклеточных протеаз и вызвать некробиотические изменения в клетке и ее гибель [3]. Повреждающему действию свободных радикалов, индуцируемому различными факторами, отводится важная роль в развитии тугоухости. В случае гиперпродукции свободных радикалов или ослаблении защитных систем организма могут сложиться условия для клеточного повреждения. В результате воздействия свободных радикалов на билипидный слой мембран значительно увеличивается их проницаемость для ионов кальция, что приводит к запуску патологического процесса [3,4]. Известно, что сосудистый фактор играет важнейшую роль в этиопатогенезе поражений слухового анализатора. Гипоксическое состояние вследствие реологических расстройств во внутреннем ухе приводит к активации перекисного окисления липидов, что в свою очередь способствует накоплению кальция в цитоплазме и инициации апоптоза [4,5,6]. Однако значение изменения содержания микроэлементов в тканях внутреннего уха в целом и, в частности, кальция является малоизученной проблемой, исследуемой лишь в единичных работах [1]. Между тем, нарушение кальциевого метаболизма может не только играть определенную роль как одного из этиологических факторов, но и участвовать в патогенетических механизмах развития тугоухости.

Цель исследования – изучить микроэлементный состав клеток спирального органа экспериментальных животных при воспроизведении у них сенсоневральной тугоухости методом рентгеноспектрального микроанализа.

Материалы и методы

Для изучения ультраструктурных характеристик улиток и элементного состава клеток спирального органа в настоящей серии экспериментов исследовано 15 белых крыс линии Вистар: 5 интактных (контроль) и 10 экспериментальных, которым проведено моделирование СНТ, из них 5 получали превентивное лечение. Соответственно, после декапитации исследовано 30 улиток крыс, изолированных по Я.А. Винникову и Л.К. Титовой [7]: 10 улиток здоровых крыс (контроль), 10 – с экспериментальной ототоксической СНТ, и 10 улиток опытных крыс, получавших превентивное лечение. Моделирова-

ние СНТ у крыс осуществляли согласно «Способу моделирования сенсоневральной тугоухости» по Золотовой Т.В., Панченко С.Н. [6]. После выделения улиток декапитированных крыс проводили исследование в 5 участках каждого образца улитки, то есть по 50 на одну группу животных, всего – 500 на всю серию данного исследования.

Предварительная подготовка изолированных образцов улиток крыс с последующим использованием углеродного (для рентгеноспектрального микроанализа) или платинового (для визуального анализа) напыления (Polaron) проводилась по общепринятым методикам с использованием сертифицированного оборудования Ростовского областного патологоанатомического бюро.

Сканирующая электронная микроскопия образцов улиток крыс с использованием электронного микроскопа XL-30 (Philips) позволила определить область волосковых клеток спирального органа для рентгеноспектрального микроанализа.

Рентгеноспектральный микроанализ проводили на встроенном в электронный микроскоп рентгеноспектральном микроанализаторе “Edax” (USA) с ультратонким окном (Be/Li), откалиброванным по меди и алюминию, при ускоряющем напряжении 25000 вольт. Полуколичественную оценку спектров проводили с помощью прикладных программ; при анализе углерод (C) исключали в связи с углеродным напылением образца.

Метод рентгеноспектрального локального микроанализа относится к спектральным методам анализа и позволяет получать информацию о содержании химических элементов по регистрируемому характеристическому спектру рентгеновского излучения, используя в качестве зонда пучок электронов. Цифровое управление лучом сканирующего микроскопа даёт возможность получить поточечное картирование локальных концентраций с выведением концентрационных карт распределения (в атомарных и объёмных процентах) химических элементов. Программированное определение масс-фракций для каждого элемента осуществлялось на основании следующих положений: интенсивность пика рентгеновского излучения элемента (I_x) пропорциональна локальной массе этого элемента; интенсивность фонового излучения (W) пропорциональна общей массе всех элементов. Нами использована количественная оценка содержания элементов в образцах, выраженная в объёмных процентах. Полученные электронограммы и элементные спектры сопоставляли, результаты обрабатывали с помощью статистических программ.

Результаты и обсуждение

Полученные данные рентгеноспектрального микроанализа клеток спирального органа улитки интактных крыс (контроль) в виде элементного спектра и значения весового процента (Wt%) представлены в таблице 1.

Анализ результатов свидетельствовал о преобладании среди микроэлементов, содержащихся в волосковых клетках интактного спирального органа (в Wt%), кислорода ($65,01 \pm 2,45$), фосфора ($15,00 \pm 0,09$), серы ($8,59 \pm 0,24$), натрия ($7,84 \pm 0,51$), селена ($1,04 \pm 0,05$). В небольших количествах (менее 1,0) определялись магний, хлор, калий, кальций, медь, железо. Эти данные служили контролем для наших дальнейших исследований.



Таблица 1.

**Микроэлементный состав клеток спирального
органа образцов улитки крысы
(в весовых процентах, n=50)**

Химический элемент	Wt % (M±m)
O	65,01±2,45
Na	7,84±0,51
Mg	0,22±0,02
Se	1,04±0,05
P	15,00±0,09
S	8,59±0,24
Cl	0,21±0,03
K	0,28±0,06
Ca	0,52±0,12
Fe	0,78±0,07
Cu	0,51±0,13
Zn	0,00
Итого	100%

Примечание. Здесь и далее: обозначение химических элементов – по периодической системе Д.И.Менделеева; Wt % - весовой процент.

Результаты рентгеноспектрального микроанализа клеток спирального органа улитки крысы при экспериментальной сенсоневральной тугоухости (модель) представлены в таблице 2.

При экспериментальной сенсоневральной тугоухости (модель) в спектре микроэлементов клеток спирального органа улитки крысы преобладали (в Wt%) кислород (40,01±2,11), кальций (32,83±3,03), фосфор (19,93±1,56), натрий (3,97±0,24), магний (1,44±0,087). В небольших количествах содержались селен, сера, хлор, калий, железо, медь, цинк. При этом отмечено статистически достоверное ($P<0,01$) уменьшение весового процента серы в 21 раз; селена в 13; хлора в 3,5; меди в 3; натрия в 2; кислорода в 1,6; калия в 1,2 раза и, наоборот, увеличения кальция в 62; магния в 6,5 раза; железа в 4,3; фосфора в 1,3 раза.

Таблица 2.

**Микроэлементный состав клеток спирального органа
образцов улитки крысы при экспериментальной
сенсоневральной тугоухости (n=50)**

Химический элемент	Wt % (M±m)
O	40,01±2,11
Na	3,97±0,24
Mg	1,44±0,087
Se	0,08±0,005
P	19,93±1,56
S	0,41±0,027
Cl	0,06±0,004
K	0,24±0,021
Ca	32,83±3,03
Fe	0,18±0,02
Cu	0,17±0,018
Zn	0,67±0,063
Итого	100%

Сравнительный анализ спектра химических элементов клеток спирального органа улиток контрольных образцов и при экспериментальном моделировании тугоухости и оценка соотношений их весовых процентов свидетельствует о достоверном уменьшении ($p<0,001$) при экспериментальной тугоухости кислорода – в 1,6 раза, натрия в 2 раза, селена – в 13 раз, серы в 21 раз, хлора в 3,5 раза, меди в 3 раза и, наоборот, увеличения ($p<0,001$) магния – в 6,5 раза; фосфора – в 1,3 раза; кальция – в 62 раза, железа в 4,3 раза, в небольшом количестве обнаружен отсутствующий при контрольном исследовании цинк. Содержание калия остаётся относительно стабильным – его уменьшение по сравнению с контролем недостоверно ($p>0,05$).

Исследование элементного состава клеток спирального органа улиток крыс, которым было проведено экспериментальное моделирование сенсоневральной тугоухости с одновременным лечением биоактивной сывороткой «Аудиоинвит» и микронутриентом «Биоселен» [3], свидетельствовало об изменении в микроэлементном спектре. Результаты рентгеноспектрального микроанализа клеток спирального органа улитки крысы при экспериментальном моделировании тугоухости с одновременным лечением (модель и лечение) представлены в таблице 3.

Анализ полученных данных в этой группе свидетельствует о преобладании в спектре (в Wt %) следующих химических элементов: кислород (78,93±3,99), фосфор (7,56±0,39), натрий (4,04±0,29), сера (6,30±0,33), селен (0,62±0,07). В небольших количествах обнаружены хлор, магний, калий, кальций, железо, медь, цинк.

Таблица 3

**Микроэлементный состав клеток спирального органа
образцов улитки крысы при экспериментальной
сенсоневральной тугоухости с одновременным
лечением (n=50)**

Химический элемент	Wt % (M±m)
O	78,93±3,99
Na	4,04±0,29
Mg	0,87±0,08
Se	0,62±0,07
P	7,56±0,39
S	6,30±0,33
Cl	0,57±0,03
K	0,06±0,002
Ca	0,39±0,01
Fe	0,64±0,21
Cu	0,26±0,01
Zn	0,41±0,014
Итого	100%

Сравнительный анализ спектра химических элементов клеток спирального органа улиток при экспериментальной сенсоневральной тугоухости и при тугоухости с одновременным лечением свидетельствует о достоверном увеличении после лечения весового процента кислорода – в 2,0 раза, натрия в 1,02 раза, селена – в 7,8 раз, серы в 15,4 раз, хлора в 9,5 раза, меди в 1,5 раз, а также уменьшение кальция – в 84,3 раза магния – в 1,7 раза; фосфора – в 2,64 раза; железа в 3,5 раза, цинка – в 1,6 раз. Указанные



изменения приближают полученные результаты к данным микроэлементного анализа образцов контроля.

Таким образом, электронная сканирующая микроскопия с последующим рентгеноспектральным элементным микроанализом позволили обнаружить в волосковых клетках спирального органа значительные сдвиги весовых процентов различных химических элементов в процессе моделирования и лечения. Эти сдвиги особенно ярко проявились в отношении кальция.

Результаты проведенного исследования свидетельствовали о значительных изменениях соотношений весовых процентов микроэлементного состава клеток спирального органа при экспериментальной тугоухости у крыс. Изучение данных рентгеноспектрального микроанализа опытных животных с сенсоневральной тугоухостью, получавших превентивное лечение, показало значительные сдвиги, направленные на восстановление элементного состава. Из представленных нами данных очевидно, что наиболее выраженные изменения претерпевает доля кальция в клетках внутреннего уха в процессе моделирования и лечения сенсоневральной тугоухости, что выделяет особую значимость этого микроэлемента в патогенезе тугоухости.

Необходимо отметить, что по результатам исследований других авторов [1] у больных с хронической сенсоневральной тугоухостью отсутствуют изменения показателей кальций-фосфорного обмена в крови и в моче, но проявления дисфункции кальций-фосфорного обмена всё же имеют место и регистрируются в виде остеопороза костей скелета, обнаруженного при остеоденситометрии, и повышения показателей костного метаболизма с увеличением показателей щелочной фосфатазы.

Приведенные материалы получены нами с помощью рентгеноспектрального микроанализа клеток внутреннего уха в эксперименте, но они находят теоретическое подтверждение в работах некоторых авторов. B. Wildemann et al. [8] считает, что одним из биохимических звеньев патогенеза СНТ является блокирование кальциевых каналов, в связи с чем для лечения СНТ, помимо антиагрегационных препаратов, рекомендуется использовать антагонисты кальция. Е.А. Jaffe et al. [9] указывают на то, что одним из регуляторов, проявляющимися при стрессе, наряду с тромбином и лейкотриеном, является гистамин, который стимулирует эндотелиоциты и, что особенно

важно, увеличивают концентрацию свободного кальция в цитоплазме через инозитол-трифосфатный механизм. Увеличение концентрации кальция приводит к выделению фосфолипидов из плазматической мембраны путём активации фосфолипазы и, соответственно, повышению её проницаемости. Г.И. Фроленков и соавт. [10] обнаружили, что уровень сократительной активности наружных волосковых клеток улитки регулируется двумя кальций-зависимыми каналами передачи. Из приведенных собственных и литературных данных роль влияния кальция на различные аспекты патогенеза сенсоневральной тугоухости, включая функционирование волосковых клеток, становится очевидной. Иначе говоря, отмечена корреляция между показателями нарушения обмена кальция и нарушениями слуховой функции.

По итогам серии проведенных экспериментов по моделированию гентамициновой сенсоневральной тугоухости у животных: изучение микроэлементного состава клеток спирального органа улиток белых крыс с использованием сканирующей электронной микроскопии позволило выявить повышение доли кальция в клетках спирального органа декаптитированных глухих крыс по сравнению с контролем (здоровые животные) и нормализацию его после лечения. Эти данные показывают значимость нарушения метаболизма кальция при тугоухости.

Выводы

Таким образом, на основании полученных данных можно сделать следующие выводы: 1) у экспериментальных животных (белых крыс) с воспроизведённой гентамициновой сенсоневральной тугоухостью имеются изменения микроэлементного состава клеток спирального органа с выраженным нарушением метаболизма кальция, что подтверждается данными сканирующей электронной микроскопии со спектральным микроанализом улиток; 2) нарушение микроэлементного состава и кальциевого метаболизма в спиральном органе может играть определённую роль в развитии сенсоневральной тугоухости, что необходимо учитывать при проведении диагностических мероприятий и поисках средств оптимальной терапии, направленных на нормализацию обмена кальция и регулирование апоптоза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Райская-Качесова О.Н. Значение кальциевого обмена в патогенезе хронической тугоухости: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. - СПб, 2003. - 24с.
2. Рожинская Л.Я. Системный остеопороз. - М.: Издатель Мокеев, 2000. - 196 с.
3. Водно-электролитный и кислотно-основной баланс (краткое руководство) / Горн М.М. и др. Пер. с англ. СПб: Невский диалект - Бином, 2000. - 320 с.
4. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Менщикова Е.Б. Окислительный стресс. Биохимические и патофизиологические аспекты. - М.: Медицина, 2001. - 343 с.
5. Золотова Т.В. Дифференцированный подход к лечению сенсоневральной тугоухости: автореф. дисс. ... докт. мед. наук. - М., 2004. - 41 с.
6. Золотова Т.В., Панченко С.Н. Экспериментальная сенсоневральная тугоухость ототоксического генеза у животных: апоптический путь гибели клеток спирального органа. // Вестник оториноларингологии. - 2010. - №4. - С.29-32.
7. Винников Я.А. Кортиев орган: гистофизиология и гистохимия/ Я.А. Винников, Л.К. Титова. - М., Л.: Изд-во АН СССР, 1961. - 260 с
8. Wildemann B. Susac's syndrome: improvement with combined antiplatelet and calcium antagonist therapy / B. Wildemann, C. Schulin, B. Storch-Hagenlocher et al. // Stroke. - 1996. - Vol. 27, N 1. - P. 149-151.
9. Jaffe, E. A. Correlation between thrombin - inducend prostacyclin production and inositol triphosphate and cysosolic free calcium levels cultured human endothelial cells / E.A. Jaffe, J. Grulich, B.B. Weksler et al. // J. Biol. Chem. - 1987. - Vol. 262, №18. - P. 8557 - 65.
10. Уровень подвижности наружных волосковых клеток улитки регулируется двумя Ca^{2+} - зависимыми каналами передачи / Г.И. Фроленков и др. // IV Международный симпозиум "Современные проблемы физиологии и патологии слуха" (Суздаль, 19-21 июня 2001 г.). - М., 2001. - С.189-191.

ПОСТУПИЛА: 24.04.2012