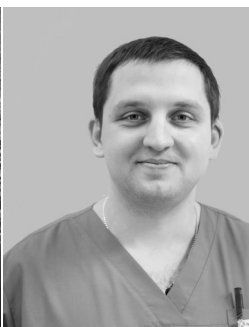


ОТОАКУСТИЧЕСКАЯ ЭМИССИЯ КАК МЕТОД ОЦЕНКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ СЛУХОВОГО АНАЛИЗАТОРА

С.Г. Журавский^{1,2} – д. м. н., ведущий научный сотрудник лаборатории слуха и речи НИЦ ПСПбГМУ, руководитель научной группы экспериментальной патоморфологии ИЭМ СЗФМИЦ, А. А. Паневин^{1,2} – аспирант лаборатории слуха и речи НИЦ ПСПбГМУ, младший научный сотрудник научной группы экспериментальной патоморфологии ИЭМ СЗФМИЦ

¹ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава России, ²ФГБУ «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Минздрава России

Ключевые слова: исследование слуха у экспериментальных животных, отоакустическая эмиссия ототоксичность, отопротекция. **Key words:** study of hearing in experimental animals, otoacoustic emission, ototoxicity, otoprotection.



РЕФЕРАТ

Представлен метод исследования отоакустической эмиссии (ОАЭ) для объективной оценки состояния слухового анализатора у экспериментальных животных (крыс, мышей, монгольских песчанок, морских свинок). ОАЭ представляет собой волновой микромеханический ответ волосковых клеток спирального органа улитки, измеряемый в наружном слуховом проходе. Данные ОАЭ позволяют получать картину функциональной активности акустического рецептора быстрого

в исполнении, неинвазивным и адекватным для групповых сравнений способом. Существующие неспециализированные (клинические) приборы дают возможность проводить оценку в диапазоне 1-8 кГц. У каждого из грызунов имеются свои особенности этих кривых, коррелирующих с видовыми максимумами слуховой чувствительности в области высоких и ультразвуковых частот. При работе с этими биологическими объектами наиболее демонстративными оказываются результаты анализа режима ОАЭ на частоте продукта искажения. Оптимальными средствами общей анестезии при исследовании ОАЭ являются Золетил (внутрибрюшинные инъекции) и изофлюран (ингаляционный наркоз). Мы проводили исследование ОАЭ на приборе «Нейро-Аудио» (ООО «Нейрософт», Россия) с программным обеспечением «Neuro-Audio.NET». В этом случае, в зависимости от вида животного, получают данные амплитуд ОАЭ с величинами от 10-15 дБ до 25-30 дБ. Изучение показателей амплитуды ОАЭ может быть востребовано в ветеринарной практике в рамках характеристики общего состояния здоровья животных, в экспериментальных исследованиях в токсикологии, психофармакологии и отоневрологии. В рамках доклинических исследований метод будет полезен для отбора животных с интактным слухом, в исследованиях по скринингу фармакологических субстанций на выявление ототоксического потенциала, оценке положительных ототропных (слухосохраняющих) свойств.

ВВЕДЕНИЕ

В экспериментальной патологии (токсикологии, психофармакологии, отоневрологии) нередко возникают задачи, связанные с трактовкой ответов на акустическую стимуляцию. Для этого необходимо быть уверенным в сохранности слуховой системы животных перед экспериментом. Наиболее «древним» способом решения этой задачи является исследование простейших защитных безусловно-рефлекторных реакций защитного характера (Preyer's reflex) [6]. Позднее слуховая функция в экспериментах оценивалась при изучении электрических ответов головного мозга – коротколатентных слуховых вызванных потенциалов – на акустический раздражитель (щелчок, тон) [1]. Этот объективный метод дает информацию как о состоянии структур внутреннего уха, так и проводников – ретрокохлеарного участка цепи слухового анализатора [7]. Главным его недостатком является методическая громоздкость. Открытый в 1978 г. Д. Кэмпом феномен отоакустической эмиссии послужил фундаментальным основанием для разработки новой методики оценки функциональной активности улитки [5,10].

Отоакустическая эмиссия (ОАЭ) представляет собой волновой микромеханический ответ структур улитки, измеряемый в наружном слуховом проходе. Источником формирования ОАЭ становятся активно со-кращающиеся наружные волосковые клетки (НВК), которые либо спонтанно, либо в ответ на звуковой стимул генерируют механическую энергию внутри улитки. Эта функция спирального органа (СО) развивалась в процессе эволюции анализатора, как внутриорганный механизм «обратной связи», который позволяет рецептору в допустимом диапазоне регулировать интенсивность механо-электрической трансдукции. Происходит это путем глушения избыточной амплитуды колебаний волокон базилярной мембраны сокращениями пула НВК

при эфферентной импульсации в рамках безусловно-рефлекторного ответа. Демпфирование афферентной импульсации снижает риск развития экзайтоксического повреждения возбудимых структур анализатора. Физиологической метафорой будет, если определить, что для улитки значение эфферентной системы (пучка Расмуссена) подобно значению *p. vagus* для сердца. С целью обеспечения этой функции НВК экспрессируют ряд сократительных мышечных белков, таких как *Myo 7a* и претин [5,13].

Создаваемая сокращениями НВК быстро затухающая звуковая волна передается через мембраны улитковых окон, структуры среднего уха и может быть зарегистрирована в виде акустического сигнала в наружном слуховом проходе высокочувствительным микрофоном [9,12]. Параметром оценки ОАЭ является ее интенсивность, характеризующаяся амплитудой ответа, измеряемой в дБ уровня звукового давления (УЗД). С организационной точки зрения ОАЭ представляется способом тонотопической оценки функциональной сохранности СО (рис. 1).

Из-за своей доступности и понятной трактовки метод приобрел широкую популярность в клинике для проведения аудиологического скрининга у новорожденных в условиях родильных домов [5]. В тоже время в последнее десятилетие метод стал активно использоваться в экспериментальной патологии для оценки остроты слуха в условиях *in vivo*.

Цель работы – представить возможности объективной оценки состояния слуха у экспериментальных животных при использовании метода отоакустической эмиссии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные и условия их содержания.

Работа выполнена на самцах крыс, стока Wistar (200-220 г, N=5), самцах нелинейных мышей (25 г, N=5), пигментированных морских свинок (самцы, 250-380 г, N=5) (ФГУП «ПЛЖ «Рапполово», РФ) и самцах монгольских песчанок (40 г, N=5) без признаков соматической патоло-

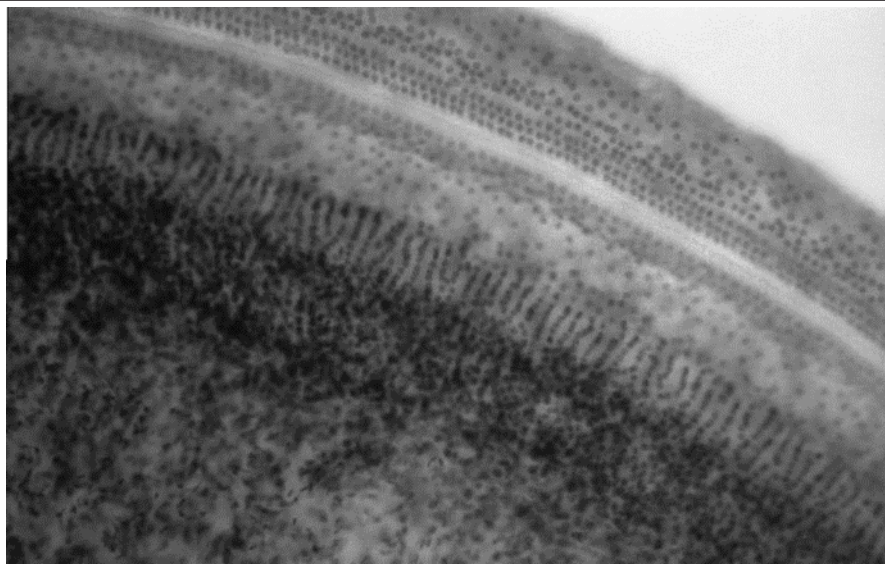


Рис 1. Плоскостной препарат спирального органа интактной морской свинки на уровне основного завитка улитки (Окраска по Einarson'у. Ув. $\times 140$). Три ряда НВК отделены от ряда ВВК светлой линией туннеля Корти.

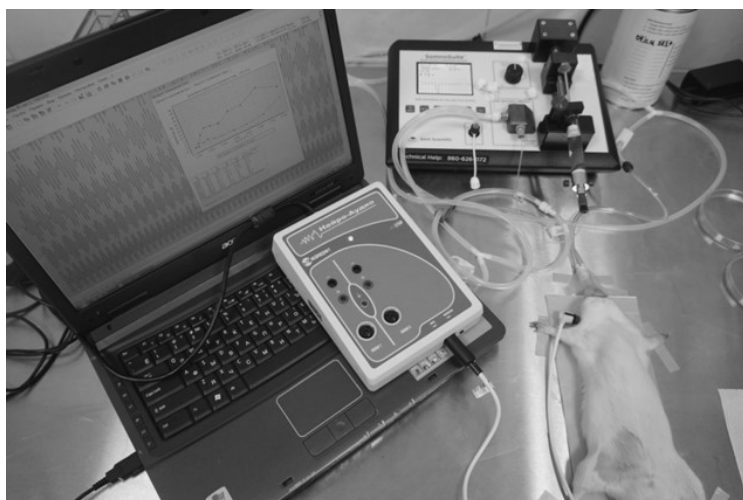


Рис 2. Экспериментальное животное в состоянии ингаляционной анестезии изофлюраном.

гии, с сохранным рефлексом Прейера и без признаков воспаления при отоскопии. Рефлекс Прейера проверяли простейшим способом по реакции животных на щелчок в свободном звуковом поле.

Содержание животных и выполня-

емые экспериментальные исследования соответствовали рекомендациям руководства по использованию лабораторных животных для научных и учебных целей в ПСПБГМУ им. И.П. Павлова [2].

Измерение отоакустической эмиссии (ОАЭ)

Оценка ОАЭ производилась на приборе «Нейро-Аудио» (ООО «Нейрософт», Россия), подключенном к персональному компьютеру с программным обеспечением «Neuro-Audio.NET» (рис. 2). Герметичность obturation зондом наружного слухового прохода у животных обеспечивали с помощью одного из прилагаемого в комплекте вкладыша конической формы для исследования слуха у новорожденных. В работе изучали один из вариантов ОАЭ – отоакустическую эмиссию на частоте продукта искажения (distortion product otoacoustic emission – ДРОАЕ). Выбор связан с тем, что по техническим возможностям прибора именно методика ДРОАЕ позволяет характеризовать функциональную сохранность НВК в зоне спирального органа, ответственной за восприятие звуков выше 5 кГц (рис. 3). Подобная необходимость обусловлена тем, что у грызунов слуховое восприятие смещено в сторону высоких частот. Кривая их слышимости лежит в диапазоне от 0,8-1,0 кГц до 80-100 кГц с максимальной слуховой чувствительностью у белых крыс в зоне выше 8-10 кГц, у морских свинок и песчанок – от 1 до 10 кГц, у мышей – от 10 до 20 кГц [6,8].

Измерения проводили поочередно на обоих ушах у животных в условиях

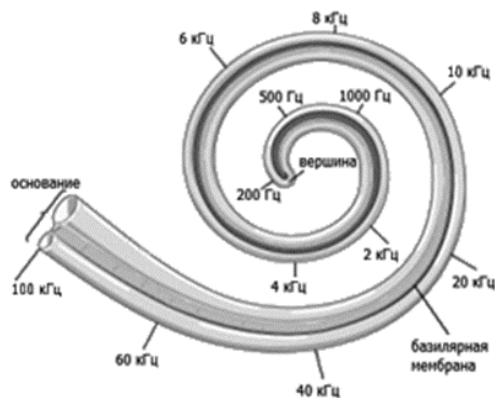


Рис 3. Схематическое изображение расположения зон слуховой чувствительности у крысы.

общей анестезии («Золетил 100», 6 мг/кг, i.p.) или ингаляционным введением изофлюрана (кислородно-воздушная смесь с 2,5% содержанием изофлюрана) (рис. 2).

Ответы на стимулы накапливались в течение 180 сек. Для анализа использовали только те показатели ОАЭ, амплитуда которых по шкале была не ниже – 10 дБ УЗД и одновременно выше на 3 дБ уровня фиксируемого шума на данной частоте.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

У крыс ОАЭ на частоте продукта искажения достоверно начинала фиксироваться с частоты 1,5 кГц. Кривая графически имеет косовосходящую (под углом 45-55°) форму. Уровень плато фиксируется в диапазоне 2-6 кГц на интенсивности 25-30 дБ УЗД (рис. 4а).

У мышей ОАЭ начинает фиксироваться с 5,0 кГц. Кривая имеет плавно восходящую форму. Амплитуда ответов заметно меньше – достигает только 10-15 дБ УЗД (рис. 4б).

У морских свинок наблюдается иной ход кривой ОАЭ. Достоверные показатели ОАЭ начинают фиксироваться сразу же с частоты 700 Гц, выходя в плато уже на последующей частоте при амплитуде 25-30 дБ УЗД (рис. 4в).

У монгольских песчанок кривая ОАЭ схожа с морскими свинками.

Отмеченные особенности хода кривой ОАЭ (начало подъема) у различных видов грызунов несут прямую корреляцию с видовыми максимумами слуховой чувствительности в области высоких и ультразвуковых частот (рис. 4).

Для демонстрации практического применения метода на рис. 4г представлена кривая ОАЭ после моделирования острого акустического повреждения слухового анализатора у крысы. В этом случае отмечается косонисходящее движение кривой ОАЭ, начиная с 3 кГц и при полном угнетении амплитуды на последующих частотах.

В случае тотального повреждения сенсоневральных элементов слухового анализатора (ототоксичность, латентные лабиринтиты), а также при кондуктивной

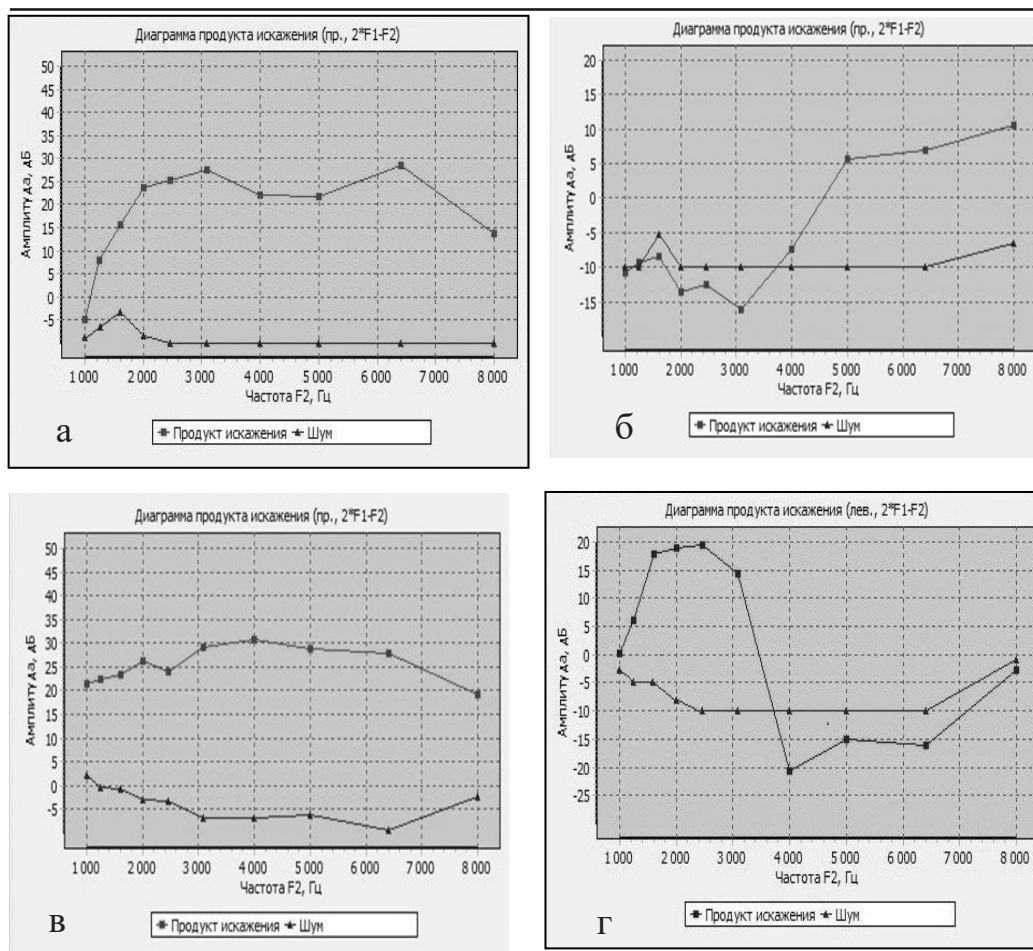


Рис. 4. Кривая ОАЭ на частоте продукта искажения изучаемых животных.
 а – интактная крыса; б – интактная мышь; в – интактная морская свинка; г – крыса после акустической стимуляции на частоте 5,0 кГц интенсивностью 110-112 дБ в течение 2 часов.

патологии (гнойный, экссудативный отит и пр.) показатели ОАЭ не фиксируются. Подобное состояние трактуется как отсутствие слуховой функции.

ОБСУЖДЕНИЕ

Применение «клинического прибора» у экспериментальных животных, принимая во внимание частотный диапазон слуха грызунов, позволяет давать оценку функциональной активности спирального органа в области верхушки улитки (рис. 3).

Критерием включения для воз-

можности индивидуального проведения данной методики должен быть активный, живой рефлекс Прейера. При наружном и отоскопическом осмотре требуется убедиться в интактности состояния наружного слухового прохода и барабанной перепонки. Обнаружение ее рубцов, указывающих на возможный адгезивный процесс в тимпанальной булле, перфораций, выбуханий в просвет наружного слухового прохода за счет экссудата, гноетечения, есть основание для выбра-

ковки животных из экспериментальной группы. Идеальная картина барабанной перепонки делает излишним применение импедансной тимпанометрии, как средства отбора в группу для эксперимента животных с патологией среднего уха.

При всей кажущейся простоте метод требует серьезного навыка экспериментатора. Получаемый ответ ОАЭ чувствителен к процессу установления акустического зонда. В условиях мизерных размеров слухового прохода лабораторных грызунов неверно выбранное направление при установке приводит к тому, что зонд упирается в стенку слухового прохода. При этом появляется артефакт в фиксации амплитуды ОАЭ – ее отсутствие или резкое угнетение.

В экспериментальных условиях для анестезии препаратом первого выбора можно считать ингаляционный анестетик изофлюран, так как он минимально токсичен из-за низкого коэффициента растворения в крови, однако, для его использования требуется специальное анестезиологическое оборудование (рис. 3) [2]. Из инъекционных средств по данным нашего коллеги С.А. Иванова при исследовании ОАЭ оптимальным для анестезии является золетил [4]. Сочетание тилетамина и золазепамы в одном лекарственном препарате обеспечивает плавное вхождение в наркоз, достаточную глубину анестезии, выраженный седативный эффект, практически не угнетает дыхание и сердечную деятельность. Немаловажно, что препарат доступен для применения в ветеринарной практике и не требует особых условий использования и хранения [11,14].

В экспериментах отоневрологического профиля анализ ОАЭ, характеризующий функциональную активность анализатора, целесообразно проводить с последующим исследованием гистологической картины улитки. В зависимости от задач, это возможно как традиционным способом (с приготовлением поперечных срезов через модиолус), так и с помощью плоскостных препаратов спирального органа, приготовляемых по методике Я.

А. Винникова и Л. К. Титовой [3].

Исследование ОАЭ представляет собой перспективную методику для экспериментов по скринингу ототоксических, отопротективных свойств фармакологических веществ, для экспериментов психофармакологического профиля, в которых изучаются рефлекторные ответы, связанные с акустическим анализатором, для оценки сохранности слуховой функции у генетически модифицированных животных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Измерение ОАЭ является практичным, объективным, количественным, неинвазивным и быстрым способом тонотопической оценки функции улитки.

2. Кривая ОАЭ у каждого вида грызунов имеет свои специфические особенности, свойственных видовым максимумам слуховой чувствительности в области высоких и ультразвуковых частот.

Otoacoustic emission: a method for assessment of the functional status of the auditory analyzer

S. G. Zhuravskii1, A. A. Panevin

ABSTRACT:

Otoacoustic emission (OAE) testing method for objective assessment of the status of the auditory analyzer in experimental animals (rats, mice, Mongolian gerbils, guinea pigs) is presented. OAE is a wave micromechanical response of hair cells in the spiral organ of the cochlea measured in the external auditory canal. OAE data enable to monitor the acoustic receptor's functional activity using a quick, noninvasive and group comparison-appropriate technique. Current non-specialized (clinical) instruments make it possible to assess in the 1-8 kHz range. Each of the rodents has its specificities of these curves correlating with the species' peak levels of auditory sensitivity in the high and ultrasonic frequency range. It has emerged that when working with these biological objects the most demonstrative are the analysis results for the OAE mode at the distortion product frequency. Zoletil (intraperitoneal injections) and isoflurane (inhalation anaesthesia) are the optimal anesthetic agents for OAE testing. We performed the OAE study using the Neuro-Audio sys-

tem (NeuroSoft LLC, Russia) with Neuro-Audio.NET software installed. In this case, depending on the species of animals, the OAE amplitude values were within the range from 10-15 dB to 25-30 dB. Studying the OAE amplitude values may be sought after in veterinary practice when assessing the overall health of the animals, in experimental studies in toxicology, psychopharmacology and otoneurology. In the preclinical studies, this method will be useful for selection of animals with intact hearing, screenings of pharmacological agents for potential ototoxicity, assessment of beneficial otoprotective (hearing preservational) properties.

ЛИТЕРАТУРА

- 1.Альтман А.Я. Руководство по аудиологии / А.Я. Альтман, Г.А. Таварткиладзе. – М.: ДМК Пресс, 2003. – 359 с.
- 2.Белозерцева И.В. Руководство по использованию лабораторных животных для научных и учебных целей в ПСПбГМУ им. И.П. Павлова / И.В. Белозерцева, О.А. Драволина, М.А. Тур. – СПб.: Издательство СПбГМУ, 2014. – 80 с.
- 3.Винников Я.А. Метод прижизненной изоляции перепончатого лабиринта (улитки и преддверия), приготовления и описания плоскостных препаратов кортиева органа / Я.А. Винников, Л.К. Титова // Арх. анат. –1959. –Т.36, №4. –С. 82.
- 4.Иванов С.А. Обеспечение отодоступности с помощью наноразмерных носителей и отопротективный эффект звукового прекондиционирования: автореф. дис. ... канд. мед. наук / Иванов Сергей Александрович. – СПб. – 2014. – 20 с.
- 5.Таварткиладзе Г.А. Руководство по клинической аудиологии / Г.А. Таварткиладзе. – М.: Медицина, 2013. – 676 с.
- 6.Brown A.M. Auditory sensitivity at high frequencies in mammals / Brown A.M., Pye J.D. // Adv. Comp. Physiol. Biochem. – 1975. – Vol.6. – P.1-73.
- 7.Burkard R.F. Auditory Evoked Potentials: Basic Principles and Clinical Application / R.F. Burkard, M. Don, J.J. Eggermont. New York, 2007. – 731p.
- 8.Fay R.R. Hearing in vertebrates: A psychophysics databook // Winnetka., IL. – 1988. – P. 363-366.
- 9.Harel N. The effects of an-esthesia on otoacoustic emissions / N. Harel, A. Kakigi, H. Hirakawa. et al // Hear. Res. –1997. – Vol.110, N1-2. – P. 25-33.
- 10.Kemp D. T. Stimulated acoustic emissions from within the human auditory system // J. Acoust. Am. – 1978. – Vol. 64. N5. – P. 1386-1391.
- 11.Machado E.F. Effects of different general anesthetics on serum hemolysis and hepatic and muscular glycogenolysis in rats / E.F. Machado, A.C. Normand, L.A. Nunes, R. Brenzikofer, D.V. Macedo // Hear Res. – 2009. – Vol. , N11. – P.1035-38.
- 12.Musiek F. Otoacoustic Emissions and the Olivocochlear Bundle // The Hear. Journ. – 1992. – Vol.45. N11. – P. 12-15.
- 13.Robinette M.S. Otoacoustic Emissions: Clinical Applications / M.S. Robinette, T.J. Glatcke. Ed. 3 edition. – Thieme, 2007. – 496p.
- 14.Saha D.C. Comparison of cardiovascular effects of tiletamine-zolazepam, pentobarbital, and ketamine-xylazine in male rats / D.C. Saha, A.C. Saha, G. Malik, M.E. Astiz, E.C. Rackow // J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci. – 2007. – Vol.46. – P.74-80.