

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«РОСТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

На правах рукописи

ДУБИНСКАЯ
Наталья Викторовна

**СЕНСОНЕВРАЛЬНАЯ ТУГОУХОСТЬ И
РОЛЬ МЕТАБОЛИЗМА КАЛЬЦИЯ В ЕЁ ПАТОГЕНЕЗЕ**

14.01.03 – болезни уха, горла и носа

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор
Золотова Татьяна Викторовна

Санкт–Петербург
2018

О Г Л А В Л Е Н И Е

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. Обзор литературы	
1.1. Современные данные о заболеваемости, этиологии и патогенезе сенсоневральной тугоухости. Нарушение обмена кальция в патогенезе повреждения слухового анализатора.....	10
1.2. Регуляция обмена кальция в организме, потенциал–зависимые кальциевые каналы и нарушение обмена кальция и других ионов при сенсоневральной тугоухости по данным экспериментальных и клинических исследований.....	19
1.3. Характеристика блокаторов кальциевых каналов и возможности их применения	28
ГЛАВА 2. Материал и методы исследования	
2.1. Характеристика материала исследования	37
2.2. Клиническая характеристика больных с сенсоневральной тугоухостью.....	37
2.3. Характеристика экспериментальных животных.....	40
2.4. Методы исследования	42
2.5. Методы статистической обработки материала.....	50
ГЛАВА 3. Особенности обмена кальция и его регуляции у больных с сенсоневральной тугоухостью. Собственные данные	
3.1. Изучение динамики заболеваемости сенсоневральной тугоухостью по материалам оториноларингологического стационара.....	54
3.2. Состояние кальциевого метаболизма у больных с сенсоневральной тугоухостью по показателям остеоденситометрии.....	55
3.3. Содержание кальция и его регуляторов в сыворотке крови у больных с сенсоневральной тугоухостью	59
3.4. Связь характеристик сенсоневральной тугоухости и состояния	

костного метаболизма, минерального обмена и минеральной плотности костной ткани.....	67
--	----

ГЛАВА 4. Экспериментальное обоснование коррекции обмена кальция при сенсоневральной тугоухости. Собственные данные.

4.1. Моделирование сенсоневральной тугоухости у лабораторных животных.....	78
4.2. Результаты морфологических исследований спирального органа при моделировании сенсоневральной тугоухости у животных.....	85
4.3. Изучение эффективности блокатора кальциевых каналов (нимодипина) в профилактике и лечении сенсоневральной тугоухости в эксперименте.....	102

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	113
-----------------	-----

ВЫВОДЫ	121
--------------	-----

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	121
--------------------------------	-----

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	123
------------------------	-----

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	142
-------------------------	-----

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Статистические данные последних лет свидетельствуют о неуклонном росте заболеваемости тугоухостью во всем мире. По данным исследований экспертов Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в мире 4–6% населения (около 360 миллионов) страдают нарушениями слуха (2017). Около 278 миллионов людей имеют глубокое двустороннее нарушение слуховой функции [172]. В Российской Федерации такая патология составляет 2–10% с преобладанием (63,2–80%) сенсоневральной тугоухости (СНТ) [28, 59, 92].

Тенденция к неуклонному росту числа пациентов с тугоухостью продолжается, что связывают с воздействием ухудшающихся факторов окружающей среды, в том числе, бытового шума, широким неконтролируемым использованием лекарственных препаратов с ототоксическим действием, неуклонным ростом сердечно–сосудистой патологии, психоэмоциональными перегрузками [60,61, 70, 89, 165]. Важную роль в возникновении сенсоневральной тугоухости играет негативное действие шума на организм работников «шумоопасных» рабочих мест, в значительном числе случаев неустранимого, что приводит к социально–экономическим издержкам [75,76,77, 96,132]. Трудности адаптации лиц с выраженными социально–значимыми дефектами в обществе приводят к хроническому стрессу, снижают качество их жизни [71, 99].

По классическим представлениям при СНТ преобладают дегенеративно–атрофические изменения в структурах внутреннего уха, но накапливается всё больше данных об апоптическом пути гибели клеток внутреннего уха [39, 40, 126] и возможностях его регулирования, в частности посредством белка с антиапоптическим действием – нуклеолина [130]. Существует множество современных теорий патогенеза заболевания, таких как оксидативный стресс, теории повреждения мембран улитки, иммуноопосредованного поражения

лабиринта, нарушения обмена элементного состава организма, в частности, железа, теория микротромбообразования, опосредованного полиморфизмом генов системы гемостаза [53]. Окислительный стресс, изменения стереоцилий, разрушение опорных клеток, глутаматная эксайтотоксичность, отек сосудистой полосы и воспалительная реакция считаются по современным данным патофизиологическими механизмами развития СНТ [165], изучение которых с уточнением роли каждого из них предстоит в настоящем и будущем.

Несмотря на большое количество диагностических методик, непосредственно патогенетические аспекты раскрыты все еще недостаточно. Медикаментозное лечение заболевания, к сожалению, даже при острых формах сенсоневральной тугоухости далеко не всегда дает положительный эффект, что чаще всего связано с отсутствием патогенетической направленности используемых лекарственных препаратов [3, 36, 37, 40, 159].

Негативное влияние многочисленных факторов на центральную нервную систему и органы чувств, в том числе на рецепторы внутреннего уха, на весь организм в целом приводит к нарушению его гомеостаза, к изменениям в системах анализаторов [75]. В последние годы все больше внимания уделяется роли нарушений электролитного баланса в развитии различных патологических состояний. В частности, рядом авторов изучался кальций – фосфорный метаболизм, как один из основных регуляторов гомеостаза организма [68, 84, 83].

Вместе с тем, недостаточно изучена роль элементных нарушений, в частности, кальциевого обмена в развитии тугоухости. В отечественной и зарубежной литературе имеются лишь единичные работы, посвященные этой теме [21, 52, 83, 167, 175], что подтверждает необходимость дальнейшего изучения роли кальциевого метаболизма в патогенезе СНТ.

Учитывая имеющиеся сведения, целесообразно продолжение исследований по уточнению патогенетических аспектов СНТ, в частности, роли нарушений кальциевого обмена. Необходим поиск методов терапевтического воздействия патогенетической направленности и эффективной профилактики

слуховых нарушений.

Степень разработанности темы исследования

На современном этапе развития науки существует множество вариантов объяснения механизмов повреждений внутреннего уха при СНТ, но единая точка зрения так и не выработана. Это находит отражение в большом количестве предложенных методов лечения тугоухости, имеющих различные точки приложения [27, 31, 33, 38, 40, 57, 52, 60, 78, 106]. Результаты этих методов до настоящего времени не являются удовлетворяющими ни пациентов, ни лечащих врачей. Это делает вопросы оптимизации диагностики патогенетически значимых изменений при СНТ и их эффективной коррекции актуальными в современных условиях.

Цель исследования

Изучение роли метаболизма кальция в патогенезе сенсоневральной тугоухости.

Задачи исследования

1. Выявить предикторы прогрессирования сенсоневральной тугоухости на основе изучения показателей кальциевого метаболизма у больных с различными формами и степенями сенсоневральной тугоухости.
2. Воспроизвести сенсоневральную тугоухость в эксперименте у лабораторных животных и определить при этом морфологические изменения внутреннего уха.
3. Определить особенности элементного состава нейроэпителиальных клеток спирального органа лабораторных животных с экспериментальной

сенсоневральной тугоухостью без лечения и после лечения блокаторами кальциевых каналов.

4. Определить эффективность блокатора кальциевых каналов (нимодипина) у лабораторных животных с экспериментальной сенсоневральной тугоухостью

Научная новизна исследования

В работе впервые проведено комплексное обследование больных с различными формами и степенями сенсоневральной тугоухости с изучением данных, характеризующих состояние кальциевого метаболизма. Разработан новый способ моделирования сенсоневральной тугоухости [Патент РФ № 2627155], основанный на звуковом воздействии, усиленном иммобилизационным стрессированием, на организм животных – белых крыс.

Впервые на экспериментальной модели сенсоневральной тугоухости собственной модификации показано положительное влияние блокаторов кальциевых каналов на структуры слухового анализатора животных. Обоснована целесообразность использования в патогенетической терапии сенсоневральной тугоухости препаратов этой группы с активным действующим веществом нимодипином.

Практическая и научная значимость исследования

На основании высокоточных современных методов исследования на экспериментальной модели тугоухости у животных, показано изменение доли кальция в клетках внутреннего уха экспериментальных животных в ответ на акустическое воздействие

В эксперименте на лабораторных животных показана эффективность использования блокаторов кальциевых каналов в лечении сенсоневральной

тугоухости по данным морфологических исследований.

Разработаны методические рекомендации для врачей «Значение исследования кальциевого обмена для диагностики и лечения сенсоневральной тугоухости».

Материалы исследования используются в учебных программах по оториноларингологии для студентов и программах последипломного образования на кафедре болезней уха, горла, носа ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Положения, выносимые на защиту

1. Сенсоневральная тугоухость у лабораторных животных может быть воспроизведена в эксперименте при применённых условиях акустической стимуляции и иммобилизационного стрессирования.
2. Использование блокаторов кальциевых каналов (нимодипина) эффективно у лабораторных животных с экспериментальной тугоухостью и может быть рекомендовано больным для предотвращения прогрессирования сенсоневральной тугоухости.
3. Нарушение метаболизма кальция у больных с сенсоневральной тугоухостью играет роль предиктора прогрессирования тугоухости

Личный вклад автора в результаты исследования

Личный вклад автора состоит в организации и проведении исследования по всем разделам диссертации, формулировании цели, задач исследования, определении методов обследования, сборе и анализе полученных данных. Автор непосредственно провела экспериментальную часть работы, выполненную на лабораторных животных. Проводила обследование и ведение всех больных, заполнение специально разработанных карт, статистический анализ полученных данных.

Достоверность данных и апробация работы

Работа выполнена на значительном клиническом материале с современной статистической обработкой полученных данных. Её результаты подтверждены экспериментальным исследованием с моделированием тугоухости у лабораторных животных. Результаты исследований, основные положения диссертации доложены на 65-й конференции молодых ученых РостГМУ (Ростов-на-Дону, 2011), III, IV Петербургских Форумах оториноларингологов России (Санкт-Петербург, 2014, 2015); Proceedings XXXI World Congress of Audiology (Moscow, Russia, 2012); Первой всероссийской открытой конференции по проблемам уха в рамках 10-го семинара "Избранные вопросы отологии/отохирургии" (Москва, 2012); V Межрегиональной научно – практической конференции оториноларингологов Южного и Северо-Кавказского федеральных округов с международным участием (Ростов-на-Дону, 2012); 60-й научно-практической конференции «Молодые ученые – российской оториноларингологии» (Санкт-Петербург, 2013); заседаниях Ростовского отделения Всероссийского научного общества оториноларингологов (Ростов-на-Дону, 2014), Межрегиональной научно-практической конференции «Ринология и отиатрия – современные проблемы» (Ростов-на-Дону, 2015). Все материалы получены, обработаны и проанализированы автором.

Публикации

По результатам исследований опубликовано 36 печатных работы, в том числе 7 – в рецензируемых журналах, включенных в Перечень ВАК России, получен Патенты РФ на изобретение № 2627155, № 2648534, изданы методические рекомендации для врачей.

ГЛАВА 1

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Современные данные о заболеваемости, этиологии и патогенезе сенсоневральной тугоухости. Нарушение обмена кальция в патогенезе повреждения слухового анализатора

Неуклонное увеличение заболеваемости сенсоневральной тугоухостью (СНТ) среди населения сопряжено с ростом патологии сердца и сосудов, нейродегенеративных заболеваний, интенсивных шумовых нагрузок в быту и на производстве, острых и хронических заболеваний, в лечении которых используются ототоксические препараты [94]. Тугоухость может возникать вследствие генетических аномалий, возрастных изменений, сосудистых нарушений на фоне артериальной гипертензии, вегето–сосудистой дистонии, атеросклероза, различного вида травматических воздействий: баротравма, акустическая, механическая, вибрационная травма [40, 53, 61, 70, 75,76].

Помимо существования традиционных вредных шумовых воздействий в таких сферах деятельности человека как строительство, горная промышленность, транспорт, воздушные суда, земледелие, существуют и, так называемые, рекреационные воздействия, не менее опасные – ночные клубы, дискотеки, тренажерные залы, спортплощадки, где существенно превышаются допустимые уровни шумового воздействия. Так, по данным A.C.Y.Wong, приблизительно 2/3 населения Великобритании в возрасте 18–30 лет подвержены опасному высокоинтенсивному звуковому воздействию (более 85 дБ), которое может вызвать повреждение слуха [173].

По данным российских авторов, значительную часть больных, страдающих СНТ составляют лица трудоспособного возраста [24,45, 46]. Во вредных условиях, не отвечающих санитарно–гигиеническим нормам, трудятся около 21,3% работников [80], что также подтверждает социальную значимость проблемы и необходимость поиска методов лечения и профилактики данной

патологии. Широкие возможности реабилитации больных со значительными дефектами слуховой функции, особенно детского возраста, связаны с перспективами развития кохлеарной имплантации [51, 95, 103]. Большинство исследователей считает, что типичными в патогенезе СНТ являются нарушение кровообращения во внутреннем ухе, трофики волосковых клеток спирального органа, других структур слухового анализатора, вплоть до их дегенерации, независимо от этиологии [8, 40, 59, 69].

Необходимость изучения нарушений электролитного баланса связано с влиянием этих изменений в развитии различных патологических состояний в организме. Особенно это касается механизмов регуляции кальций–фосфорного метаболизма как обеспечивающих гомеостаз. Важность исследования роли метаболизма кальция при патологии внутреннего уха определяется его участием во многих физиологических и биохимических процессах, таких как апоптоз клеток, поддержание целостности и проницаемости цитоплазматических мембран, регуляция синаптической передачи, сокращение мышечных волокон, синтез гормонов и ферментов, регенерация костной ткани, активизация внутриклеточных биоэнергетических процессов превращения АТФ в цАМФ, свёртываемости крови [1, 66].

При патологических состояниях в организме, таких как ишемия или гипоксия, ионы кальция, особенно при повышении их концентрации в клетках, способны чрезмерно усиливать процессы клеточного метаболизма, увеличивать потребность тканей в кислороде, вызывать различные деструктивные процессы [100]. Учитывая гистологические данные о большом количестве митохондрий как в кардиомиоцитах, так и в наружных волосковых клетках спирального органа, можно судить о высоком уровне метаболизма в этих клетках [17], что свидетельствует о схожести ряда физиологических процессов в них. Но, несмотря на относительное равенство условий для клеточного метаболизма, возможности для компенсации гипоксии и улучшения кровообращения во

внутреннем ухе хуже, чем в миокарде вследствие инертности внутрिलाбиринтных кровеносных сосудов [134].

Известно, что система транспорта ионов кальция в мембранных структурах мозга обладает наиболее высокой чувствительностью к перекисному окислению липидов. При накоплении даже незначительного количества продуктов перекисного окисления липидов в нейрональной мембране происходит выраженное ингибирование кальций–транспортующей способности, связанное с разобщением гидролиза АТФ с транспортом кальция и перегрузкой нейрона ионами кальция. Избыток ионов кальция в цитоплазме нейрона может вызвать некробиотические изменения в клетке вплоть до ее гибели, поскольку ионы кальция рассматриваются как триггеры многих метаболических процессов, включая активацию внутриклеточных протеаз [22]. Разрыхляя мембраны нейронов, продукты перекисного окисления липидов инициируют образование в них гидрофильных «пор», ингибируют мембранолокализованные липидзависимые ферменты, в том числе ферменты цикла Кребса и транспортные АТФ–азы (Na–K – АТФаза и Са – АТФаза). Они так же вызывают деформацию, набухание, слипание и даже полное разрушение митохондрий, что существенно уменьшает продукцию АТФ [22, 100].

Контроль гомеостаза кальция важен для выживаемости клеток. Как и в других органах, в клетках внутреннего уха задействованы как внутриклеточные, так и внеклеточные источники кальция. Плазматические мембраны волосковых клеток, трансдуктивные каналы, лиганд–зависимые каналы и потенциал–зависимые кальциевые каналы участвуют в поступлении кальция в волосковые клетки [170]. С другой стороны, кальций–транспортная АТФ–аза и натрий–кальциевый обменный механизм являются главными путями выхода кальция из волосковых клеток. Основными функциями кальция во внутреннем ухе считаются: 1) регулировка приспособляемости трансдуктивных каналов в нормальных наружных волосковых клетках [140], 2) медиация холинергической проводящей реакции [128]. Вход ионов кальция во внутреннюю волосковую

клетку во время деполяризации регулирует высвобождение медиаторов, в частности, нейромедиатора глутамата, что вызывает активацию афферентных волокон VIII пары черепно-мозговых нервов. Работа ионных каналов по данным Х. Бербом и соавт. представляется следующим образом [9] (Рисунок 1.1):

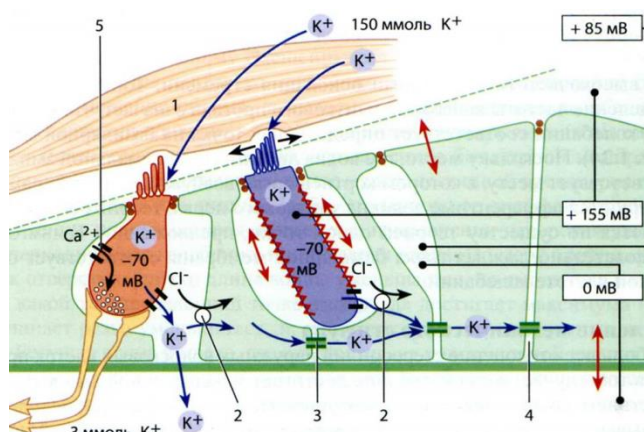


Рисунок 1.1 – Спиральный орган, волосковые клетки и их ионные каналы

1 – покровная мембрана, 2 – ионные каналы, 3 – K^+ , Cl^- – котранспортная система кортиколимфы, 4 – нексусный канал, 5 – кальциевый канал, открывающийся при возбуждении

Входной калиевый ток в волосковые клетки необходим для их деполяризации, что происходит вследствие высокой концентрации ионов K^+ в эндолимфе и высокого улиткового потенциала (+85 мВ), высокой разности потенциалов между волосковыми клетками (–70 мВ) и эндолимфой (+80 мВ – +85 мВ). Ионы калия выходят из волосковых клеток через ионные каналы в базолатеральной мембране, открывающиеся при возбуждении клетки, и проводятся через кортиколимфу с помощью (K^+), (Cl^-) – котранспортной системы и нексусных каналов поддерживающих клеток в спиральную связку. Входной кальциевый ток через Ca^{2+} – каналы, открывающиеся при возбуждении, регулирует высвобождение медиаторов во время деполяризации [9].

Важная роль в патогенезе тугоухости отводится состоянию окислительно-восстановительных процессов во внутреннем ухе, повреждающему действию свободных радикалов, образование которых может провоцироваться ототоксическими антибиотиками (аминогликозидный ряд: стрептомицин,

неомицин, канамицин, гентамицин), противоопухолевыми препаратами (лизонидазол, цисплатина), петлевыми диуретиками (верошпирон, фуросемид, этакриновая кислота) и др. В рамках исследования Esterberg R. et al. показано, что аминогликозидные антибиотики могут вызывать выделение активных форм кислорода в цитоплазму волосковых клеток при нарушении баланса кальция между эндоплазматическим ретикулумом и митохондриями. Полученные этой группой ученых данные позволяют полагать, что упомянутые лекарственные препараты усиливают приток кальция в митохондрии, что повышает проницаемость митохондриальной мембраны и увеличивает продукцию активных форм кислорода и их выброс в цитоплазму с последующим повреждением и гибелью волосковых клеток [120, 123].

Лишь единичные работы посвящены исследованию роли кальция при чрезмерном воздействии звуков на слуховой анализатор. Выявлено, избыточное шумовое воздействие приводит к повышению уровня свободного кальция в наружных волосковых клетках улитки. Это повышение вызывается проникновением кальция через ионные каналы, например, через кальциевые каналы L-типа, и приводит к дальнейшей стимуляции выброса кальция из внутриклеточных резервов: из эндоплазматического ретикулума и митохондрий. Повышенный уровень кальция в улитке может привести к выработке активных форм кислорода, а также к запуску апоптотического и некротического пути гибели клеток, независимо от образования активных форм кислорода [155].

Ещё один путь действия кальция – это модулирование активности митоген-активируемой протеинкиназы (МАПК) и других внутриклеточных сигнальных каскадов, включая апоптоз: имеются обширные доказательства того, что эти каскады играют важную роль в повреждении как волосковых клеток улитки, так и нейронов спирального ганглия [160, 133].

По данным Wang Y. et al. морфологический анализ структур внутреннего уха после интенсивного шумового воздействия выявляет повреждения стереоцилий волосковых клеток, синапсов и нейронов спирального ганглия,

поддерживающих клеток спирального органа и отек сосудистой полоски, что является причиной потери слуха [107].

Результаты исследования Т. Tagoe на лабораторных крысах с применением электронной микроскопии и иммуноцитохимического анализа показали, что воздействие громкого звука индуцирует потерю слуха и повреждение клеточных структур в нескольких участках слухового пути, вызывает изменения миелиновой оболочки слухового нерва, что опосредует нарушение распространения потенциала действия вдоль волокон. С Биофизическое моделирование выявило, что структурные изменения привели к пониженной скорости проводимости и блоку проводимости. Таким образом, демиелинизация может иметь принципиальное значение в ухудшении слуха после воздействия громкого звука [110].

S.G. Kujawa, M.C. Liberman [2009] в эксперименте с шумовым воздействием на лабораторных мышах выявили, что под воздействием звуков повреждению подвергаются нейроны спирального ганглия, чему способствует тесная взаимосвязь аксонов и глии [143, 151]. Подобные изменения обнаружены Y. Xing et al. и при возрастной тугоухости [105].

Fernandez K.A. и соавт. получили доказательства повреждения синапсов спирального узла наряду с гибелью волосковых клеток в эксперименте на животных с акустическим воздействием 90–100 дБ. Причем ранним морфологическим признаком поражения слухового анализатора выявлена потеря кохлеарных синапсов и нейронов [109].

Müller M. и соавт. пришли к выводу, что при острой шумовой травме (использовался акустический сигнал 140–144 дБ) первоначально в фокусе поражения находятся клеточные элементы Кортиева органа, при этом характерны изменения в виде некроза. Далее в посттравматическом периоде происходит в течение 2 недель расширение первичного поражения с необратимой потерей сенсорных клеток. Различные клинические и доклинические исследования показывают, что применение глюкокортикоидов при острой

шумовой травме и при другой острой тугоухости приводят к улучшению состояния слуха [114].

Результаты исследования нейроэпителиальных клеток спирального органа улиток крыс в эксперименте по моделированию «гентамициновой» сенсоневральной тугоухости методом рентгеноспектрального микроанализа, проведенного Т.В. Золотовой, показали, что особенно заметные изменения среди других элементов в клетках претерпевает доля ионов кальция. Увеличение доли (весового процента) внутриклеточного кальция в группе животных с СНТ, вызванной ототоксическими антибиотиками, сменяется её относительным уменьшением после проведенного лечения [39, 42]. Доказана гибель волосковых клеток на фоне изменения гомеостаза спирального органа в связи с разрушением эпителия спиральной связки и спирального выступа, нарушение функции сосудистой полоски, ответственной за ионный состав эндолимфы [42,40]. Таким образом, очевидна особая значимость нарушения кальциевого баланса в патогенезе сенсоневральной тугоухости ототоксического генеза.

В ряде исследований больных с хронической СНТ получены данные об отсутствии нарушений соотношений кальция и фосфора в крови и моче [19, 83]. Однако признаки нарушения кальций–фосфорного метаболизма были зарегистрированы при использовании метода остеоденситометрии и исследовании в сыворотке крови регуляторов кальциевого обмена: показатели, характерные для остеопоротических изменений костей скелета, а так же увеличение концентрации щелочной фосфатазы [83]. Исследования Kim J.Y. et al., Ozkiriş M. et al. [121, 136] свидетельствуют о том, что снижение МПК у женщин в постменопаузе может являться дополнительным фактором риска развития СНТ [121, 136]. Таким образом, сделаны выводы, что нарушения кальций–фосфорного обмена, если и не выступают в качестве этиологических факторов развития тугоухости, то могут играть существенную роль в патогенетических механизмах как СНТ, так и в определенных видов кондуктивной тугоухости.

Определено так же, что дизрегуляция кальций–фосфорного метаболизма способствует развитию пресбиакузиса [83].

Исследованиями Г.И. Фроленкова и соавт. установлено, что регуляция подвижности наружных волосковых клеток улитки осуществляется двумя кальций–зависимыми каналами передачи [97]. Генетически детерминированный дефект кальциевых каналов выявлен в головном мозге и внутреннем ухе у лиц с семейным анамнезом, страдающих мигренью, эпизодическими головокружениями и снижением слуха. Данная мутация может приводить к обратимой деполяризации волосковых клеток и проявляться слуховыми и вестибулярными симптомами [111].

В эксперименте на морских свинках Х. Li выявлено, что низкая концентрация кальция в перилимфе играет роль в предотвращении потери слуха, вызванной шумовым воздействием. Повышение концентрации кальция во внутренних волосковых клетках, по мнению автора, происходит из–за открытия кальциевых каналов во время действия шума. В тоже время, в этом эксперименте показано, что снижение концентрации кальция в перилимфе предотвращает его накопление во внутренних волосковых клетках [158].

В исследованиях М. А. Vicente–Torres указывается, что акустическая гиперстимуляция вызывает перегрузку кальцием наружных волосковых клеток улитки в эксперименте на мышах. Кальций–зависимая фосфатаза активизируется в митохондриях наружных волосковых клеток улитки в ответ на воздействие шума. Установлена связь между этими двумя процессами, а так же доказано прямое повреждающее действие этих биохимических процессов на наружные волосковые клетки в среднем и основном завитках улитки [171].

Считается, что воздействие шума вызывает избыточное накопление активных форм кислорода. В экспериментах на животных показано, что кумулятивный эффект окислительного стресса может вызвать повреждение макромолекул, таких как митохондриальная ДНК, что в результате приводит к снижению функции митохондрий и индукции апоптоза волосковых клеток [119].

Экспериментальные исследования Журавского С.Г. и др., посвященные патоморфологическому субстрату острой и хронической СНТ показали, что в большинстве случаев гибель ВК идет по пути апоптоза. Апоптоз проявляется в виде увеличения клеточного ядра, эктопического расположения ядрышек, образования пузырей на клеточной поверхности, конденсированным хроматином в виде полулуния [26,79]. Этиологические факторы, предшествующие апоптозу, могут быть как экзогенного происхождения (акустическая травма, ототоксические антибиотики), так и эндогенного происхождения (метаболические изменения, инволютивные процессы).

Установленным явлением при повреждении нейронов улитки в результате шумового воздействия является избыточное высвобождение возбуждающего нейротрансмиттера глутамата на афферентные синапсы внутренних волосковых клеток. Эксайтотоксичность глутамата, являющаяся следствием чрезмерного высвобождения глутамата после шумового воздействия, приводит к притоку катионов, к примеру, кальция, через пост-синаптическую мембрану. Такой осмотический дисбаланс в результате приводит к клеточному отеку (вакуолизации) нейронов спирального ганглия и афферентных окончаний синапсов внутренних волосковых клеток [175].

Итак, роль изменений метаболизма кальция в патогенезе сенсоневральной тугоухости является малоизученной темой, которая в научной литературе подробно не рассматривалась. Имеются малочисленные исследования, посвященные этой еще далеко не решенной проблеме [19, 83, 34, 35, 40, 43], что нацеливает на дальнейшее ее изучение.

1.2. Регуляция обмена кальция в организме, потенциал–зависимые кальциевые каналы и нарушение обмена кальция и других ионпри сенсоневральной тугоухости по данным экспериментальных и клинических исследований

В организме человека кальций – самый распространенный катион, который является неотъемлемым элементом многих физиологических процессов, в том числе в головном мозге и внутреннем ухе. В организме взрослого человека кальция содержится в среднем около 1 – 2 кг, причем он находится в основном в костях (99%) в форме гидроксиапатита. Оставшаяся часть содержится во внеклеточной жидкости и представлена ультрафильтруемым несвязанным с белком кальцием (60%), способным проходить через клеточные мембраны, из которых 50% – ионизированный, 10% – комплексированный, т.е. связанный с небелковыми анионами – цитратом, фосфатом, сульфатом и бикарбонатом. Остальные 40% кальция внеклеточной жидкости находятся в соединении с белками (преимущественно альбумином). Только ионизированный кальций является физиологически важным, его концентрация регулируется [Волков М.М., 2010]. Норма общего кальция в плазме крови 2,2 – 2,75 ммоль/л. Ионизированный кальций по данным различных авторов колеблется от 1,0–1,15 ммоль/л [1, 18, 63] до 1,05 – 1,25 ммоль/л [13]. Вместо определения ионизированного кальция часто ориентируются на скорректированный на альбумин кальций сыворотки крови. На связывание кальция с белком влияет кислотность внеклеточной жидкости. Ацидемия повышает, а алкалемия понижает концентрацию ионизированного кальция. Суммарный объём обмена кальция между костной тканью и внеклеточной жидкостью составляет 5–12 ммоль/сут [13].

Регуляция минерального гомеостаза – сложный процесс взаимодействия различных веществ. Соли кальция в организме представлены преимущественно в виде фосфатов, поэтому обмен фосфора и кальция тесно взаимосвязаны. В

течение 24 часов почками фильтруется около 10 г кальция, из которого 99,9% его реабсорбируется и в результате с мочой экскретируется 100–200 мг кальция в сутки. Эти механизмы настолько стабильны, что изменение указанных значений даже на 1% приводит срабатыванию механизмов регуляции уровня кальция, восстанавливающих его равновесие [73].

Менее 1% кальция, содержащегося в организме, находится во внеклеточной жидкости. Его концентрация тщательно регулируется паратиреоидным гормоном, метаболитами витамина Д, кальцитонином, глюкокортикоидами. К регуляторам минерального гомеостаза относятся также тиреоидные гормоны, инсулин, соматотропин, факторы роста фибробластов, инсулиноподобные факторы роста ИФР–1, ИФР–2 и местные факторы, синтезируемые клетками костной ткани: остеокласт–активирующий фактор, простагландины, интерлейкины [18]. Основные эффекты и взаимодействие регуляторов фосфорно–кальциевого метаболизма можно представить схематически (Рисунок 1.2).

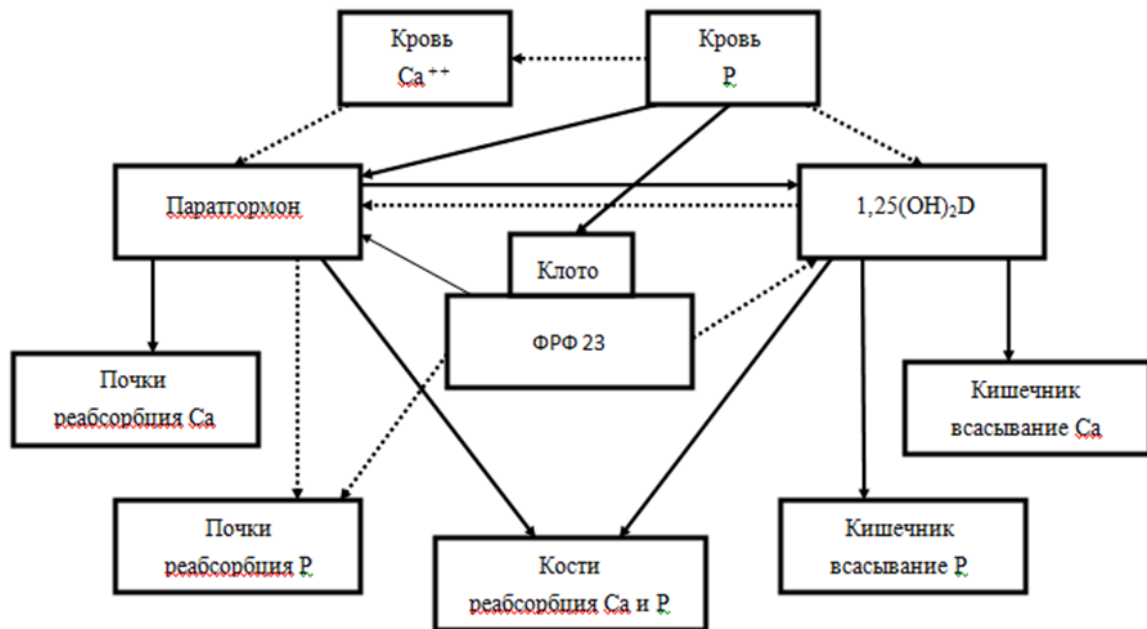


Рисунок 1.2 – Схема регуляции фосфорно–кальциевого баланса [по Волков М.М. и соавт., 2010]

Ca – кальций; P – фосфаты; ФРФ 23 – фактор роста фибробластов 23; 1,25(OH)₂D – кальцитриол или D – гормон, стрелки со сплошной линией – стимулирующий эффект, стрелки со штриховой линией – тормозящий эффект.

Кальцитонин – это пептидный гормон, состоящий из 32 аминокислот, который продуцируется С-клетками щитовидной железы при увеличении уровня кальция в сыворотке крови. Рецепторы к этому гормону обнаружены на остеокластах, моноцитах, в почках, гипофизе, печени, а также мозге. Он ингибирует резорбцию костей (подавляет активность и формирование остеокластов, а также снижает реабсорбцию кальция и фосфора в почках и уменьшает абсорбцию кальция в кишечнике [13]. Относится к кальций-регулирующим гормонам гипокальциемического действия. Кальцитонин постоянно присутствует в крови. Его концентрация повышается при приеме пищи, богатой солями кальция. Физиологическая роль кальцитонина определяется участием в регуляции обмена кальция и фосфатов в организме; его действие осуществляется при участии паратгормона и активировании витамина Д. Кальцитонин угнетает остеолиз, снижая повышенное содержание кальция в сыворотке крови, он усиливает выделение кальция, фосфора и натрия с мочой за счет снижения их реабсорбции в почечных канальцах, однако при этом концентрация кальция в сыворотке не опускается ниже значений нормы [13].

Остеокальцин – витамин К зависимый белок. Синтезируется остеобластами и одонтобластами, состоит из 49 аминокислот, содержит три остатка гаммакарбоксиглутаминовой кислоты, участвующих в связывании кальция. Изменения концентрации остеокальцина отражают метаболическую активность остеобластов в процессе нового синтеза. Прямое влияние на его синтез оказывают кальцийрегулирующие гормоны – кальцитонин, паратиреоидный гормон, витамин Д.

Паратгормон или паратиреоидный гормон (ПТГ) – это линейный полипептид из 84 аминокислотных остатков, вырабатывается главными клетками околощитовидных желез в ответ на низкое содержание кальция в сыворотке крови. Определение уровня этого гормона в крови позволяет оценить состоятельность функции паращитовидной железы. Он увеличивает резорбцию костной ткани, активирует витамин Д, который увеличивает реабсорбцию

кальция в желудочно–кишечном тракте. Изменение концентрации ПТГ в первую очередь отражается на состоянии костной ткани – увеличение концентрации этого гормона приводит к активизации остеокластов и вымыванию из костей кальция. Воздействует на каналы почек, снижая выделение кальция, и увеличивает выделение фосфора с мочой. Концентрация ПТГ напрямую связана с концентрацией кальция в крови, и изменение концентрации гормона говорит об изменении метаболизма этого минерала. Поэтому уровень паратгормона необходимо соотносить с уровнем кальция крови. Кальцитриол (активная форма витамина Д) повышает всасывание кальция в тонком кишечнике, тормозит секрецию паратиреоидного гормона, способствует минерализации костей [13].

Костная щелочная фосфатаза (остаза) – изоферментная форма щелочной фосфатазы сыворотки крови, её костная фракция. КЩФ синтезируется активно делящимися остеобластами в костной ткани, её активность отражает метаболические изменения в костной ткани. Костная щелочная фосфатаза (КЩФ) участвует в регуляции кальциевого обмена, этот фермент определяет скорость формирования кости, участвует в созревании матрикса и его минерализации. Считается, что концентрация КЩФ в сыворотке крови отражает состояние метаболизма остеобластов, а, значит, влияет на процессы ремоделирования костной ткани, участвует в метаболизме кальция в организме человека [101].

Beta–Cross Laps или C– концевые телопептиды коллагена 1 типа, который составляет более 90% органического матрикса кости. Альфа–аспарагиновая кислота, входящая в состав C–терминальных телопептидов, конвертируется в бета–форму. В норме малые фрагменты коллагена, образующиеся при его деградации, поступают в кровь и выводятся почками с мочой. Они специфичны только для костной ткани. Их уровень может увеличиваться при увеличении костной резорбции вследствие многих причин (гиперпаратиреозидизм, остеопороз, остеодистрофия, болезни печени, менопауза и др.)

Относительно недавно обнаружены новые гормоны: ФРФ 23 (фактор роста фибробластов 23) и клото. ФРФ 23 – это протеин с молекулярной массой 30 кДа,

имеющий свой собственный рецептор ФРФ 23 – фосфатурический гормон, который синтезируется в костях, понижает реабсорбцию фосфата в почечных канальцах, повышает секрецию паратиреоидного гормона, снижает синтез кальцитриола, являясь его прямым антагонистом [127]. Для реализации эффектов ФРФ 23 необходим белок клото, представляющий собой глюкозидазу, которая присоединяется к рецепторам ФРФ 23. Белок клото синтезируется в почках и является трансмембранным протеином, который также в определенной мере обеспечивает чувствительность организма к инсулину, тормозит процесс старения в опытах на животных [142].

С.В. Лелевич и соавт. представляют основную схему регуляции минерального обмена, по которой к главным регуляторам из перечисленных относят паратгормон, кальцитриол и кальцитонин. Секреция паратгормона регулируется в зависимости от уровня кальция в крови: известен механизм отрицательной обратной связи по которому гиперкальциемия подавляет, а гипокальциемия стимулирует высвобождение паратгормона. Паратгормон повышает концентрацию кальция в сыворотке крови, усиливая его вымывание из костей и реабсорбцию в почках. Кальцитонин является физиологическим антагонистом паратгормона, стимулирует выведение кальция почками. Кальцитриол стимулирует всасывание кальция в кишечнике [73].

Кальциевые каналы. Огромную роль ионы кальция играют в жизнедеятельности клетки. Транспорт ионов кальция в клетку происходит через специальные каналы – макромолекулярные белки (L, T, N, P, Q, R), содержащие специфические участки (рецепторы), распознающие ионы. Ионы кальция удаляются из клетки с помощью кальций–натриевого ко–транспортера (обменника) в соотношении 3/1 или 4/1 [25].

Концентрация ионов кальция регулируется саркоплазматической мембраной и сарколеммой Ca^{2+} –АТФазой, митохондриальным унипортом Ca^{2+} . Кальций–транспортная АТФаза поддерживает низкую концентрацию этих ионов в клетке (10^{-7}М) по сравнению с окружающей средой и внутриклеточным депо –

пузырьками саркоплазматического ретикулума ($3 \cdot 10^{-3} \text{M}$). Перенос ионов кальция через мембрану может быть обусловлен градиентом концентраций и активным транспортом с затратами энергии, который подразделяется на индивидуальный и кооперированный: N– и P/Q– типы кальциевых каналов активируются высокоамплитудным потенциалом действия, располагаются на пресинаптической терминали, играют роль только в модуляции высвобождения медиаторов в синаптическую щель [66].

Кальциевые каналы имеют сложную структуру [117], представленную в упрощенном виде (в нашей модификации) на рисунке 1.3.

T–тип кальциевых каналов активируются низкоамплитудным потенциалом действия, обеспечивает медленный ток кальция, является ключевым каналом для процесса спонтанной ритмической деполяризации клеток водителя ритма сердца, обильно представлен в клетках синусного узла; R–тип кальциевых каналов активируются высокоамплитудным потенциалом действия [66, 67].

L–тип кальциевых каналов активируются высокоамплитудным потенциалом действия, обеспечивает медленный ток кальция. Структура канала включает пору, наружное и внутреннее устье, воротные частицы и селективный фильтр, образованный 5–6 атомами кислорода в виде кольца, регулирующего проницаемость. Стенки поры представлены остатками гидрофильных аминокислот, гидрофобные участки контактируют с липидами мембран клетки [135].

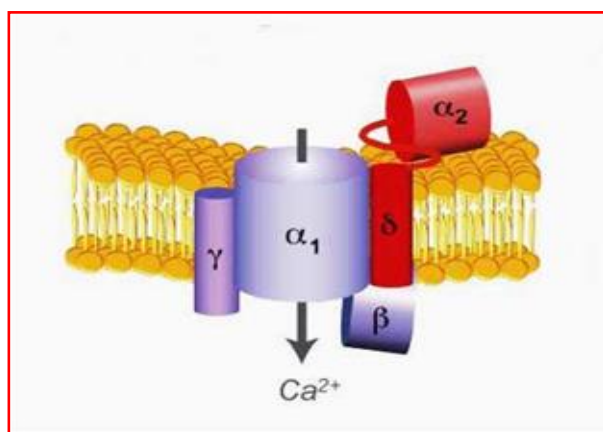


Рисунок 1.3 – Ионопроводящая пора, сформированная альфа–субъединицей, субъединицы кальциевых каналов – α_1 , β , γ , δ (в модификации)

Молекулярная структура L-типа кальциевых каналов представлена 5 субъединицами. Наиболее крупная из них α_1 отвечает за селективность, чувствительность к мембранному потенциалу, проводимость. Помимо клеток миокарда и мускулатуры L-тип кальциевых каналов идентифицирован в нейронах центральной и периферической нервной системы позвоночных. Они активируются при высоких потенциалах на мембране (свыше 10 мВ), характерна высокая проводимость и очень медленная кинетика инактивации ($t > 500$ мс), чувствительность к ингибирующему действию органических блокаторов [2, 66, 67].

Потенциал-зависимые кальциевые каналы в волосковых клетках млекопитающих в основном представлены подгруппой $\text{Ca}_v1.3$. Кроме того, подгруппа $\text{Ca}_v1.3$ играет важную роль в развитии улитки [131] и в регулировании экспрессии кальций-зависимых калиевых каналов высокой и низкой проводимости [164]. Отсутствие каналов $\text{Ca}_v1.3$ вызывает глухоту и нарушения в развитии наружных и внутренних волосковых клеток у мышей [161].

Документально зафиксирована локализация потенциал-зависимых кальциевых каналов в улитках лабораторных животных. В улитке мышей широко наблюдается иммуногистологическое окрашивание долгоживущих потенциал-зависимых кальциевых каналов: в сосудистой полоске лабиринта улитки, в спиральной связке, в спиральной кайме, в спиральном органе (в опорных клетках, внутренних и наружных волосковых клетках), нейронах спирального ганглия [131, 157].

Имеются экспериментальные данные о действии блокаторов долгоживущих потенциал-зависимых кальциевых каналов на слуховой вызванный потенциал улитки. Предположительно, долгоживущие потенциал-зависимые кальциевые каналы выполняют функцию пресинаптического торможения вызванного и произвольного выброса нейротрансмиттеров из волосковых клеток [124, 162].

На основании экспериментальных данных предполагается, что долгоживущие потенциал-зависимые кальциевые каналы и подгруппы $\text{Ca}_v1.3$

играют важную роль в медиации выброса нейротрансмиттеров, а также в физиологическом «обслуживании» волосковых клеток [170].

Известно, что неотъемлемой частью гомеостаза организма является водно–электролитный обмен. Основные катионы организма – калий, натрий, кальций, магний. Анионы – гидрокарбонат, фосфаты, сульфат, хлориды. Во внеклеточной жидкости представлены в основном ионы натрия, хлора, гидрокарбоната. Во внутриклеточной жидкости – более высокие концентрации ионов калия, магния, фосфатов, сульфата. Электролиты в организме выполняют ряд важных функций: образуют биоэлектрический потенциал, определяют рН жидкостей, катализируют процессы обмена веществ, участвуют в свертываемости крови, стабилизируют костную ткань и др. Определение ионизированного кальция позволяет более точно оценить состояние кальциевого обмена. Все физиологические эффекты кальция, такие как участие в мышечном сокращении, в механизмах секреции гормонов, рецепторных процессах, в механизмах клеточного деления и др.) осуществляются его ионизированной формой [47].

Оценка минерального обмена и кальций регулирующих гормонов – осуществляется лабораторными методами. Обычно исследуют уровни кальция, натрия, калия, фосфора, хлора и др. в сыворотке крови наиболее известными способами: 1) пламенная фотометрия (атомно–эмиссионная спектроскопия пламени) электролита в биологической жидкости, проводимая с помощью прибора – пламенного фотометра, основана на измерении интенсивности излучения, испускаемого атомами, возбужденными в пламени, после их возвращения в основное невозбужденное состояние. Длина волны испускаемого света отражает химическую природу электролита. Сложность использования метода связана с необходимостью применения взрывоопасной смеси горючих газов. 2) Атомно–абсорбционная спектрофотометрия основана на измерении поглощения монохроматического пучка света атомами в пламени. Метод более чувствителен по сравнению с пламенной фотометрией и позволяет определять весь спектр электролитов. 3) Потенциометрический метод анализа основан на

зависимости величины потенциала электрода от состава раствора, в который электрод погружен. Потенциометрические методы с использованием этих ионоселективных электродов могут быть прямые и непрямые. Прямой метод предпочтительней, так как при нем не меняется (без разведения) состав образца.

4) Фотометрическое определение концентрации электролитов не требует дорогостоящего специального оборудования и основано на образовании окрашенных соединений при взаимодействии электролитов с определенными органическими веществами. Плотность окраски пропорциональна количеству электролита, что позволяет рассчитать его концентрацию.

5) При определении концентрации калия и натрия можно применять технологию «сухой химии», используя многослойные аналитические полоски. Принцип отражательной фотометрии позволяет использовать тест – полоски не только для качественной, но и для полуколичественной оценки результатов [73].

Концентрация гормонов в крови и тканях очень мала (10^{-6} – 10^{-10} моль/л), поэтому для их определения требуются высокочувствительные биохимические методы. Широко используются радиолигандные методы, основанные на конкурентном связывании меченого и немеченого гормона с различными белками: антителами, транспортными белками или рецепторами. Применяют химические методы например, флюорометрический и колориметрический, а также иммунологические методы, например, радиоиммунный анализ. Основные биохимические маркеры, которые должны быть проанализированы для оценки состояния костной ткани, скорости метаболизма, оценки эффективности лечения, профилактики заболеваний, связанных с нарушением метаболизма костной ткани – паратгормон, остеокальцин, кальцитонин. Маркеры позволяют увидеть даже самые незначительные сдвиги в процессе наблюдения за больным [73].

Учитывая, что наибольшая часть кальция в организме находится в костной ткани, широкое распространение при оценке минерального обмена, а именно костного метаболизма, приобрели следующие методики: 1) рентген – позволяет увидеть критическую потерю массы костной ткани, более 30%, наименее

чувствительный метод; 2) денситометрия (остеоденситометрия) – позволяет определить количественную потерю костной ткани на различных участках – бедренная, лучевая кость, поясничный отдел позвоночника; 3) костная ультрасонометрия – оценивает скорость прохождения звука через кость и механическую реакцию кости. В настоящее время наиболее часто для определения минеральной плотности костной ткани используют остеоденситометры. Показатели остеоденситометрии в сочетании с определением уровней биохимических маркеров метаболизма костной ткани преимущественно используются для диагностики остеопороза и другой костной патологии [90], у спортсменов для оценки процессов адаптации и прогнозирования развития у них патологии костной ткани, у больных с костно–суставной патологией [15], при стоматологических заболеваниях [48]. Применение комплекса лабораторных и остеоденситометрических методов для оценки кальциевого метаболизма, этиологических, патогенетических особенностей и прогнозирования течения заболевания у больных с сенсоневральной тугоухостью ранее не проводилось.

1.3. Характеристика блокаторов кальциевых каналов и возможности их применения

Блокаторы кальциевых каналов или антагонисты кальция представляют собой группу лекарственных препаратов с одинаковым механизмом действия, но различающихся по тканевой селективности, фармакокинетике, влиянии на сердечно–сосудистую систему и ряду других свойств. Применение их в клинической практике насчитывает более 30 лет [44, 87].

Общим свойством блокаторов кальциевых каналов (или антагонистов кальция) является конкурентный антагонизм в отношении потенциал–зависимых кальциевых каналов клеточных мембран. Они инактивируют кальциевые каналы и тем самым уменьшают количество ионов кальция, проникающих из внеклеточного пространства внутрь клеток. В первую очередь стало

общеизвестным гипотензивное действие блокаторов кальциевых каналов [118, 144]. Группы препаратов, блокирующих каналы кальция, в настоящее время введены в современные схемы лечения терапевтических больных. В дополнение к отрицательному инотропному эффекту на сердечную мышцу они приводят к снижению тонуса гладкой мускулатуры сосудов и к вазодилатации, в связи с чем применяются при сердечно–сосудистых заболеваниях [87].

Для некоторых антагонистов кальция основным является действие на церебральную гемодинамику и нейропротективное влияние. Так, в экспериментальном исследовании на животных блокаторы кальциевых каналов проявили протективный эффект в отношении нейронов, имеющих повышенную чувствительность к глутаматной токсичности при моделировании нейродегенеративных заболеваний. Это проявлялось в замедлении развития патологии – уменьшении моторных симптомов, уменьшении потери нейронов стриатума [10, 16]. В работах Безprozванного И.Б. показана необходимость дальнейшего изучения блокаторов кальциевых каналов и проведения клинических испытаний данной группы препаратов при болезни Альцгеймера, болезни Хантингтона, спинномозговой атаксии [12].

В модифицированной таблице представлены данные о группах антагонистов кальция с учетом их тропности (Таблица 1.1) [64].

Таблица 1.1 – Группы антагонистов кальция и точки и их приложения

№ п/п	Группы	Представители	Точки приложения
1	Дигидропиридиновые производные:	Нифедипин, никардипин, исрадипин, нифедипин–ГИТС, нифекард, лацидипин, фелодипин, нитрендипин, нилудипин, амлодипин (норваск)	Блокируют в большей степени медленные кальциевые каналы в клетках гладкой мускулатуры артериол (периферических, коронарных, мозговых)
2	Производные фенилалкиламинов	верапамил (изоптин, финоптин, лекоптин), тиапамил, галлопамил, эмопамил, бепридил	Блокируют в большей степени медленные кальциевые каналы миокардиоцитов, клеток синусового узла и

		(беприкор)	атриовентрикулярного соединения
3	Производные бензодиазепина	Дилтиазем (кардил, дилзем)	Занимают промежуточное положение между препаратами 1й и 2й группы, блокируя медленные кальциевые каналы миокардиоцитов, клеток гладкой мускулатуры сосудов
4	Антагонисты кальция из различных химических групп, не имеющие самостоятельного значения в лечении гипертонической болезни	Дигидропиридиновое производное – <u>нимодипин</u> (нимотоп); пиперазины циннаризин (стугерон); флунаризин (сибелиум); производное фенилалкиламинов – сензит (фендилин)	Относительная избирательность к гладкой мускулатуре сосудов <u>головного мозга</u> ; гипотензивный эффект этих препаратов в значительной мере связан с влиянием на регионарную гемодинамику (мозговой и/или коронарный кровотока)

В нескольких контролируемых исследованиях показано, что нимодипин (внутривенно или внутрь) при назначении в первые часы после субарахноидального кровоизлияния уменьшает размеры повреждения головного мозга, способствует регрессии неврологической симптоматики и снижает летальность [87, 156]. Проведенные опыты позволили установить, что различные блокаторы кальциевых каналов оказывают неодинаковое влияние на центральные и периферические механизмы регуляции сосудистого тонуса [54,55]. Циннаризин оказывает угнетающее влияние на активность в симпатических нервах и ослабляет рефлекторную прессорную реакцию артериального давления. Флунаризин, напротив, облегчает как сомато–симпатические рефлексы, так и в большинстве случаев вазомоторный рефлекс. Дигидроперидиновые производные (нимодипин и нифедипин), с одной стороны, стимулируют в значительной степени центральные механизмы регуляции симпатического и вазомоторного тонуса и, с другой, – блокируют развитие констрикторных реакций сосудов, вызванных раздражением афферентных волокон соматических нервов. Нифедипин, нимодипин, флунаризин и циннаризин увеличивают объемную скорость мозгового кровотока [16].

На протяжении последних десятилетий антагонисты кальция, прежде всего нифедипин и другие дигидроперидины, занимают одно из лидирующих положений в лечении артериальной гипертензии и нарушений мозгового кровообращения. Кроме того, исследования показали и антиатеросклеротические свойства блокаторов кальциевых каналов. Для подтверждения этого направления в действии препаратов применяли электроннолучевую и спиральную компьютерную томографию, которая позволяет рассчитать индекс содержания кальция. В исследованиях, которые проводились в рамках INSIGHT (International Nifedipine GITS in Hypertension Treatment), было показано, что нифедипин предупреждает прогрессирующее утолщение интимы–медии сонных артерий и задерживает отложение кальция в атеросклеротически измененных коронарных артериях. Указанные эффекты отражают антиатеросклеротические свойства нифедипина–ГИТС [65].

Повышенная функциональная активность волосковых клеток улитки часто проявляется политональными субъективными ощущениями в ухе. Данный симптом встречается на начальных этапах развития СНТ, после отохирургических вмешательств как ранний признак наряду с головокружением, поэтому целесообразно назначение блокаторов кальция перед операцией на ухе для профилактики стрессовых и травматических осложнений и в острой фазе сенсоневральной тугоухости для предотвращения некробиоза сенсоэпителиоцитов [17].

В работах немецких ученых J. Maurer et al. было проведено сравнение эффекта блокатора кальциевых каналов дилтиазема на морских свинках, которых подвергали воздействию широкополосного шума в 90 и 110 дБ. Выводы говорят в пользу меньшей степени потери слуха в группах животных, получавших препарат и подвергнутых шуму в 90 дБ, чем в 110 дБ [149].

Морфометрический анализ улиток морских свинок показал менее выраженные повреждения внутренних и наружных волосковых клеток у тех животных, которые получали препараты антагонистов кальция до акутравмы и в

ранний посттравматический период. Предполагается, что влияние препаратов распространяется именно на клеточную мембрану сенсорных клеток и на кохлеарную сосудистую сеть [147, 148].

Исследования Naples J.G. показали на модели животных, что БКК представляют эффективное средство в качестве терапии приобретенных форм сенсоневральной тугоухости, предотвращая приток кальция, который возникает во время клеточного апоптоза во внутреннем ухе [152].

Однако в литературе встречаются и иные мнения. На основании многочисленных клинических наблюдений больных с СНТ Berrettini S. et al. пришли к выводу, что блокаторы кальциевых каналов должны быть обязательно включены в схему лечения в тех случаях, когда наиболее вероятен сосудистый генез заболевания, а так же в случаях идиопатической сенсоневральной тугоухости [112].

Исследованиями Н. Shen доказано прямое протективное действие блокаторов кальциевых каналов Т-типа trimethadione и ethosuximide на наружные волосковые клетки спирального органа мышей в эксперименте. Он считает, что в этиологии сенсоневральной тугоухости повреждающее воздействие шума стоит на 2-м месте после возрастного фактора. Действие препаратов в этом исследовании оценивались иммуноцитохимическими методами, что позволило выявить сохранность клеточных структур нейроэпителиальных клеток по сравнению с группой контроля [157].

Худавердян Д.Н. в эксперименте на животных, получавших ототоксический антибиотик канамицин, показано увеличение микроциркуляции в сосудистой полоске перепончатой улитки в ответ на введение блокатора кальциевых каналов верапамила. Эффект этого препарата связан с устранением индуцированного антибиотиком спазма артериол сосудистой полоски даже на фоне снижения системного артериального давления, что способствует сохранению ее метаболической и электрохимической функции [98]. Таким образом, верапамил способен устранить катализирующее действие внутриклеточного кальция на ДНК

эндонуклеаз с последующим торможением начальных этапов апоптоза. В эксперименте так же доказана способность верапамила ингибировать активность ядерных кальций–зависимых эндонуклеаз на примере нейронов и нейросекреторных клеток гипоталамуса [163].

Среди составляющих звеньев поливалентной теории развития сенсоневральной тугоухости неоспоримо главенствующая роль принадлежит сосудистой [53], поэтому постоянно ведется поиск препаратов, наиболее эффективно действующих в зоне ишемии головного мозга и внутреннего уха, не вызывающих неблагоприятных сдвигов в гемодинамике и синдрома внутримозгового обкрадывания [11, 29, 30, 40, 53].

Свойства и особенности действия нимодипина. В последние годы появились публикации, посвященные препарату группы антагонистов кальция, производного дигидропиридинов – нимодипин. Он препятствует поступлению ионов кальция внутрь клеток через медленные кальциевые каналы в начале фазы реполяризации клеточной мембраны. Ионам кальция принадлежит важная роль в регулировании деятельности головного мозга, они участвуют в процессах возбуждения мембран нейронов и последующих внутриклеточных молекулярных каскадах. Нимодипин хорошо проникает через гематоэнцефалический барьер, воздействует на нейроны и на мелкие сосуды головного мозга, имеет высокое сродство с рецепторами кальциевых каналов нервных клеток [56].

D. Bracco и R. Chioloero описывают регулирующее влияние нимодипина на тонус внутримозговых сосудов, обменные процессы в центральной нервной системе и нейромедиаторный баланс, что препятствует развитию клеточного апоптоза [115].

Одна из важных причин нарушения функции коры головного мозга с возрастом связана с изменением кальциевого метаболизма [23]. Результаты исследования группы больных дисциркуляторной ангиоэнцефалопатией показали нормализацию параметров мозговой гемодинамики, положительное влияние на нейрогормональный, нейрогуморальный и биоэнергетический гомеостаз при

лечении препаратом нимодипин [56]. За последние годы накоплен значительный опыт применения нимодипина в лечении больных с субарахноидальными кровоизлияниями [5]. Только в отношении нимодипина получены четкие доказательства уменьшения риска развития вазоспазма мозговых артерий, который возникает в 30–70% случаев после субарахноидального кровоизлияния и у 25% пациентов приводит к инфаркту мозга или смерти [168, 141].

Нимодипин обладает высокой липофильностью и легко проникает через гематоэнцефалический барьер в отличие от других блокаторов кальциевых каналов [23, 145 Драпкина О.М., 2008; Lopez–Arrieta A., 2002]. Изучен также его нейропротективный эффект при церебральной ишемии. Нимодипин избирательно взаимодействует с кальциевыми каналами типа L, которые составляют около 30% всех кальциевых каналов нейронов, что приводит к изменению трансмембранного поступления ионов кальция в нейроны, клетки глии и мозговые сосуды. Положительный эффект препарата при церебральной ишемии и когнитивных расстройствах у пожилых пациентов обусловлен двойным влиянием на нейроны: прямым нейротропным и опосредованно – сосудистым фактором. Доказана связь увеличения мозгового кровотока с вазоактивным эффектом препарата, так как не изменяется величина утилизации кислорода [20].

Успешным оказалось применение нимодипина при лечении церебральной ишемии, протекающей на фоне артериальной гипертензии. Уменьшение перфузии ионов кальция в гладкомышечные клетки сосудов головного мозга приводит к снижению их тонуса и увеличению мозгового кровотока преимущественно в пораженной зоне, что объясняет отсутствие феномена «обкрадывания» [20, 116, 145]. В ряде исследований доказано блокирование нимодипином гипоксического повреждения нейронов и нейротоксического действия лактата, а также снижение концентрации свободных радикалов в ишемизированных нейронах [146].

Повышенный уровень связывания нимодипина обнаружен в гиппокампе, хвостатом ядре, коре головного мозга. Кроме того, показана способность нимодипина регулировать такой кальций–зависимый процесс, как

высвобождение ацетилхолина [139]. Препарат препятствует гибели нейронов как путем некроза, так и путем апоптоза [169]. Ряд исследований свидетельствует о благоприятном влиянии нимодипина у пациентов с когнитивными расстройствами при деменции на память и процесс обучения [23, 108, 104, 138].

Нимодипин избирательно блокирует кальциевые каналы L-типа, обнаруженные, в том числе, и в волосковых клетках спирального органа, нейронах вестибулярных ядер. Эффекты нимодипина связаны с сосудорасширяющим действием на сосуды головного мозга, нейропротекторным действием на нейроны, который осуществляется ингибированием чрезмерного притока ионов кальция в клетки [154]. Описывается также, что нимодипин может выступать в роли аналога тканевого активатора плазминогена, повышать уровень аденозина в плазме крови [122].

Положительные результаты применения препарата «Немотан», содержащего нимодипин, получил С.М.Пухлик. Препарат был использован на небольшом количестве больных при комплексной терапии острых (26 больных) и хронических (11 больных) кохлеовестибулярных расстройств. Прием «Немотана» в дозе 1–2 таблетки (30 – 60 мг) 3 раза в день на протяжении 1 месяца, по мнению автора, может быть рекомендован больным с хроническими кохлеовестибулярными расстройствами, преимущественно вертебрально–базилярной этиологии, в качестве монотерапии [82].

Исследования Monzani D. et al., посвященные лечению болезни Меньера с помощью комбинации препаратов бетагистина и нимодипина, показали положительный эффект нимодипина в виде уменьшения шума в ушах, улучшения слуха, а у пожилых пациентов с хронической дисциркуляторной энцефалопатией улучшения когнитивной функции [125]. Описанные преимущества и эффекты нимодипина позволяют предполагать его эффективность при лечении СНТ, что требует экспериментального и клинического подтверждения.

Таким образом, данные отечественных и зарубежных источников свидетельствуют о влиянии нарушений метаболизма кальция на различные патологические процессы, в том числе, на функцию внутреннего уха, описаны способы их устранения, но экспериментальные исследования на моделях тугоухости у животных, а также клинические на больных с сенсоневральной тугоухостью целенаправленно не проводились. Данная проблема требует дальнейших научных разработок с практическим выходом в виде обоснования и проведения соответствующей патогенетической терапии.

ГЛАВА 2

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Характеристика материала исследования

Работа состоит из экспериментальной и клинической частей и выполнена на кафедре болезней уха, горла, носа (заведующий кафедрой – заслуженный врач РФ, д.м.н., профессор А.Г. Волков) Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО РостГМУ МЗ РФ) (ректор – д.м.н., профессор С.В. Шлык), а также на базе оториноларингологических отделений №1 и №2 МБУЗ «Городская больница №1 им. Н.А. Семашко» г. Ростова–на–Дону (главный врач – д.м.н., профессор Д.В. Сизякин). Биохимические исследования, экспериментальная часть работы и морфологические исследования проведены на базе Центральной научно–исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО РостГМУ МЗ РФ и Государственного учреждения здравоохранения Ростовской области «Патологоанатомическое бюро» (ГУЗ РОПАБ).

2.2 Клиническая характеристика больных с сенсоневральной тугоухостью

Проведено обследование 175 больных с сенсоневральной тугоухостью, госпитализированных в круглосуточный и дневной оториноларингологические стационары для обследования и лечения за период с 2009 по 2015 годы.

Критерии включения: взрослые в возрасте от 18 до 55 лет, поступившие в ЛОР стационар для обследования и лечения по поводу сенсоневральной тугоухости; наличие у обследуемых снижения слуха с нарушением звуковосприятия.

Критерии исключения: нарушения звукопроводения, тяжёлая соматическая патология у пациентов на момент обследования.

Острая СНТ имела место у 80 больных, госпитализированных в сроки от 2–х до 30 суток от начала заболевания, хроническая – у 95. Возраст – от 18 до 55 лет, среди них – 52 мужчины и 123 женщины. Распределение обследованных пациентов по возрасту и полу представлено в таблицах 2.1, 2.2.

Таблица 2.1 – Распределение больных с сенсоневральной тугоухостью по возрасту и полу

Возрастные группы	Число больных с сенсоневральной тугоухостью					
	Мужчины		Женщины		Всего	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
До 20 лет	4	2,3	7	4	11	6,3
21–30 лет	5	2,9	17	9,7	22	12,6
31–40 лет	17	9,7	15	8,6	32	18,3
41–50 лет	9	5,1	26	14,5	35	19,6
51 и старше	17	9,7	58	33,2	75	42,9
Итого	52	29,7	123	70,3	175	100

Преобладающее число больных оказалось в возрастной группе старше 40 лет – 110 человек, что составило 62,9%.

При выявлении жалоб и сборе анамнеза определено, что все 175 больных отмечали снижение слуха, 122 из них (71,4%) жаловались на сочетание снижения слуха и субъективного шума в ушах различной интенсивности и частотной характеристики (звон, писк, свист, треск, шипение, гудение). Большая часть больных (76 чел. – 78,69%) характеризовала ощущение шума в ушах как «писк» или «гул высоковольтных проводов».

Односторонний процесс наблюдался у 35 человек (20%), двусторонний – у 140 (80%).

Все обследованные были разделены на две сопоставимые по возрасту и полу группы в зависимости от формы СНТ:

- группа 1: острая СНТ – 80 человек (48,6%),
- группа 2: хроническая СНТ – 95 человек (51,4%).

Таблица 2.2 – Распределение больных по группам в зависимости от возраста и пола

Возраст	1 группа (80 больных)		2 группа (95 больных)		Контроль (42 человека)	
	мужчины	женщины	мужчины	женщины	мужчины	женщины
18–44 лет	18	28	13	41	10	7
44–55 лет	15	19	11	30	12	13
Итого	33	47	24	71	22	20

Группу контроля составили 42 здоровых человека (20 женщин и 22 мужчины) в возрасте от 18 до 55 лет. Выделена так же группа больных для исследования методом денситометрии в возрасте старше 45 лет (25 человек).

В группе 1 появлению жалоб предшествовали различные события: стрессовые ситуации, физическое или эмоциональное напряжение, нарушения режима приема лекарственных препаратов и другие. Сосудистая патология (гипертоническая болезнь, вегето–сосудистая дистония, атеросклероз сосудов головного мозга), как причина возникновения острой СНТ, диагностировалась наиболее часто. В нашем исследовании сопутствующие заболевания сердечно–сосудистой системы зафиксированы у 37 больных (46,25%). Развитие тугоухости на фоне перенесенной ОРВИ и гриппа наблюдалось у 14 больных (17,5%), вследствие акутравмы – у 11 (13,75%), после приема ототоксических препаратов – у 4 (5%) обследованных. С невыясненной этиологией оказалось 14 человек (17,5%).

В группе 2: «в результате акустич воздействия» 33 % ,токсическая – у 9 больных (9,5%), без видимой причины – у 54 (56,8%).

Продолжительность заболевания в группе 1 (острая СНТ) была от 2–х до 30 дней, в группе 2 (хроническая СНТ) – от 3 месяцев до 54 лет.

Выделены так же группы больных для исследования методом денситометрии в возрасте старше 45 лет . Больных с острой СНТ из 1 группы 34(19%) , из 2й группы 41(23%)

2.3 Характеристика экспериментальных животных

Экспериментальное исследование по моделированию сенсоневральной тугоухости проведено на 42 белых половозрелых беспородных крысах самцах, в возрасте 2,5 – 3,5 месяцев, массой тела 190 – 210 г.

Оценивали внешний вид животного, поведение, состояние слуха крысы. Для эксперимента отбирали здоровых крыс, с густой, гладкой шерстью, обычным поведением, отсутствием признаков гнойного отита, что подтверждали при мик–роотоскопии, осуществляемой с помощью отоскопа (Riester, Германия). Оценку слуха у крыс проводили по рефлексу Прейера, а также при исследовании отоаку–стической эмиссии на частоте продуктов искажения (ОАЭЧПИ) и задержанной вызванной отоакустической эмиссии (ЗВОАЭ) [26, 72, 102]. Рефлекс Прейера считали положительным («животное слышит») при произвольном подёргивании ушных раковин на звуковой раздражитель [40, 32;]. В процессе формирования модели тугоухости у животных наблюдали за изменениями рефлекса Прейера: «сохранение» рефлекса, «угасание», «исчезновение».

Для исследования ОАЭЧПИ и ЗВОАЭ использовали компьютерную систему регистрации на базе прибора «OtoRead» фирмы Interacoustics (Дания). Регистрация эмиссии свидетельствует о нормальном функционировании наружных волосковых клеток, что соответствует нормальной слуховой функции [92]. ОАЭЧПИ на частоте продуктов искажения является акустическими сигналами, которые могут быть определены в наружном слуховом проходе у человека с нормально функционирующими наружными волосковыми клетками после стимуляции парой чистых тонов f_1 и f_2 . Результирующая эмиссия является продуктом искажения тона на частоте $2f_1 - f_2$. ЗВОАЭ является акустическим сигналом, который может быть определен при нормальном функционировании наружных волосковых клеток в ответ на стимуляцию слуховой системы сериями широкополосных щелчков. Процессор цифровых

сигналов в приборе генерирует 2 чистых тона (f_1 и f_2) при регистрации ОАЭЧПИ или серии широко–полостных щелчков при регистрации ЗВОАЭ через цифро–аналоговый преобразователь. Эти тоны или щелчки подводятся от телефона к уху через трубки, расположенные в зонде. Микрофон в зонде измеряет звук в слуховом проходе и передает сигнал к аналого–цифровому преобразователю. Прибор OtoRead при использовании полосовых фильтров и разделении шума и эмиссии обеспечивает оценку функции НВК в широком диапазоне частот.

Кончик зонда с вкладышем вводили глубоко в наружный слуховой проход для обеспечения герметичности. После калибровки дисплей отображает результаты теста в виде графика из 6 столбцов. Каждая частота (ОАЭЧПИ) или частотная полоса (ЗВОАЭ) показана одним столбцом. Каждая полоска отображает соотношение сигнал/шум (SNR) в 2 дБ. Например, если столбец доходит до верха экрана, то SNR равен 12 дБ или более (6 полосок по 2 дБ каждая). После тестирования на дисплее прибора появляется надпись «прошел» или «не прошел». Получали 2 варианта ответа: «прошёл» тест, «не прошёл» тест. Звук (широкополосный с частотой 355–5000 Гц) подавали посредством звукореагтотестера ЗРТ–01 (Московский завод “Ритм”) в свободном звуковом поле на фиксированном расстоянии (0,1 м) от головы при интенсивности 90 дБ и условно обозначали этот процесс как «озвучивание».

Были выделены **6 групп** животных: группа 1 – контрольная (К) и 5 экспериментальных групп крыс – группы 2, 3, 4, 5, 6:

- группа 1 (К): 8 интактных белых крыс (контроль),
- группа 2: 5 крыс, которых подвергали звуковому воздействию – «озвучивание»;
- группа 3: 9 крыс, которых подвергали звуковому воздействию («озвучивание») и иммобилизации («стресс»), формируя «модель акутравмы»;
- группа 4: 3 крысы, которых подвергали звуковому воздействию («озвучивание») и иммобилизации, формируя «модель акутравмы», без лечения, с обследованием по прошествии двух недель;

- группа 5: 9 крыс, которые получали лечение одновременно со звуковым воздействием («модель акутравмы» и «одновременное лечение»),
- группа 6: 8 крыс, которые после окончания звукового воздействия («озвучивание») с иммобилизацией, то есть через 2 недели от начала эксперимента, получали «позднее лечение».

После окончания эксперимента по группам животных умервщляли под наркозом в строгом соответствии с принципами Хельсинской декларации. Выделяли височные кости крыс, фиксировали их в 10% растворе нейтрального формалина и после «проводки» с целью декальцинации и других этапов подготовки материала получали срезы спирального органа. Окрашивали гематоксилин – эозином и проводили исследования улиток внутреннего уха с оценкой состояния структур спирального органа методом световой микроскопии.

18 препаратов подготавливали другим способом с целью последующего проведения электронной микроскопии улитки и элементного анализа клеток спирального органа. Выделяли улитки «методом прижизненной изоляции улитки», с последующим погружением в сосуд с 2,5% глутаровым альдегидом. Продолжительность фиксации составляла 2 часа. Затем образец промывали тем же буфером, проводили по восходящей батарее спиртов. После воздействия 100% спирта образец просушивали на воздухе в течение 1 суток. Затем улитку монтировали на столики и напыляли углеродом в напылительной установке Polaron (VG Microtech, England). Далее образцы просматривали в сканирующем электронном микроскопе XL30 (Philips), оборудованном детектором Edax с ультратонким окном.

2.4 Методы исследования

Больным, обратившимся в оториноларингологический стационар с предварительным диагнозом сенсоневральная тугоухость, было проведено стандартное обследование: сбор анамнеза, осмотр ЛОР–органов, включая

отомикроскопию, лабораторные исследования (клинический анализ и уровень глюкозы крови, общий анализ мочи, электрокардиография, контроль артериального давления, а также при необходимости – компьютерная томография или магнитно–резонансная томография головного мозга, доплерография сосудов головы и шеи, консультации терапевта, окулиста, невролога по показаниям.

Всем больным проведено аудиологическое исследование посредством субъективных и объективных методов.

Исследование кальциевого метаболизма проводилось при помощи аппаратной методики – остеоденситометрии лучевой кости, а так же лабораторных тестов: определение общего и ионизированного кальция, фосфора в сыворотке крови, паратгормона, остеокальцина, кальцитонина, костной щелочной фосфатазы (КЩФ), β -CrossLaps.

Аудиологическое исследование. Для исследования слуха использовано оборудование аудиологической лаборатории кафедры болезней уха, горла, носа ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» МЗ РФ.

Всем 175 больным и 42 здоровым лицам контрольной группы проведено аудиометрическое исследование посредством субъективных и объективных методов.

Субъективные методы включали исследование слуха при помощи шепотной и разговорной речи, камертональное исследование, тональную пороговую и надпороговую аудиометрию, определение чувствительности к ультразвуку и его латерализации: использовали звуковой генератор ГЗ–33 с пьезокерамическим датчиком, согласно рекомендациям Б.М. Сагаловича [88]. Для исследования слуховой функции методом тональной пороговой и надпороговой аудиометрии использовали клинический аудиометр АС–40 фирмы «Interacoustics» (Дания): определяли пороги слуха на частотах от 125 Гц до 8000 Гц по стандартной методике [4, 58]. При односторонней или асимметричной тугоухости, если разница между воздушными порогами обеих ушей превышала 40 дБ, использовали маскирующее устройство аудиометра, подающее «узкополосный»

шум интенсивностью 60 – 70 дБ на лучше слышащее ухо для исключения переслушивания. Объективные методы исследования слуха включали: акустическую импедансометрию (тимпанометрию, исследование акустического рефлекса); в случае необходимости – регистрацию задержанной вызванной отоакустической эмиссии, коротколатентных слуховых вызванных потенциалов.

Степень снижения слуха оценивали по Международной классификации тугоухости, согласно которой уровень среднего значения порогов слышимости рассчитывается по воздушному звукопроведению на речевых частотах (500, 1000, 2000, 4000 Гц); в настоящее время именно эта классификация рекомендуется к применению [4, 7]. Международная классификация тугоухости [176] предусматривает следующие критерии, рассчитанные в диапазоне речевых частот:

- 1–я степень тугоухости – средние значения порогов слышимости от 26 до 40 дБ,
- 2–я степень тугоухости – от 41 до 55 дБ,
- 3–я степень тугоухости – от 56 до 70 дБ,
- 4–я степень тугоухости – от 71 до 90 дБ,
- 91 дБ и более – глухота.

Надпороговая аудиометрия включала проведение тестов Люшера, Фоулера, SISI–тест – для определения феномена ускоренного нарастания громкости звука (ФУНГ, recruitment of loudness), поскольку наличие ФУНГ является патогномоничным для поражения нейрорепиталиальных структур спирального органа [6, 81]. Для определения чувствительности к ультразвуку и его латерализации использовали звуковой генератор ГЗ–33 с пьезокерамическим датчиком, на фиксированной ультразвуковой частоте 128 кГц (пороги восприятия ультразвука отолотически здорового человека 1 – 3 в), согласно рекомендациям Б.М. Сагаловича [88].

Акустическая импедансометрия проводилась с использованием прибора «Автоматический импедансометр SD–30» фирмы «Siemens» (Германия). Исследование позволяет регистрировать акустическое сопротивление

звукопроводящей системы в ответ на изменение давления в наружном слуховом проходе – тимпанометрия, а также регистрировать сокращения стременной мышцы в ответ на акустическую стимуляцию – акустическая рефлексометрия. Полученные тимпанограммы оценивали по классификации J. Jerger [4, 6, 137]. Тимпанометрия позволяет выявить 5 типов тимпанограмм – типы A, B, C, D, E, и подтипы Ad и As. [6, 81, 91]:

Для сенсоневральной тугоухости характерна тимпанограмма тип A.

Акустическая рефлексометрия позволяет выявить изменения податливости звукопроводящей системы при рефлекторном сокращении стременной мышцы. В качестве сигнала, стимулирующего рефлекс использовался звук с частотами от 500 до 2000 Гц длительностью 1000 мс, подаваемый контра- или ипсилатерально. При нормальном состоянии органа слуха порог акустического рефлекса составляет 80–90 дБ над порогом слуховой чувствительности. При сенсоневральной тугоухости акустическая рефлексометрия позволяет регистрировать акустический рефлекс при ипси- и контралатеральной стимуляции. При сенсоневральной тугоухости, сопровождающейся феноменом ускоренного нарастания громкости, пороги акустического рефлекса снижаются, отмечается сужение динамического диапазона [4, 7, 93].

Исследование кальциевого метаболизма и его регуляторов. Исследование кальциевого метаболизма и его регуляторов осуществляли у больных с сенсоневральной тугоухостью по различным параметрам:

- по состоянию минеральной плотности костной ткани (МПКТ), зависящей от содержания кальция в кости, – методом остеоденситометрии;
- лабораторными методами – определения в сыворотке крови общего и ионизированного кальция, фосфора, натрия, калия, хлоридов, магния, а также паратгормона, остеокальцина, кальцитонина, β –CrossLaps;

Остеоденситометрия. Для остеоденситометрии использовали моноэнергетический костный рентгеновский денситометр DTX–200 (Osteometer Meditech, США), предназначенный для исследования дистального отдела костей

предплечья. Длительность исследования составляет около трёх минут. В настоящей работе проводили денситометрию лучевой кости предплечья больным, страдающим сенсоневральной тугоухостью. Остеоденситометрия – метод, применяемый для исследования плотности костной ткани, позволяет выявлять уже 2 –5% потери массы кости, оценить динамику плотности костной ткани в процессе развития патологии или лечения. При этом определяется поверхностная минеральная плотность (в г/см^2) кости. Рентгеновский луч проходит через исследуемый участок к детектору, по ослаблению излучения автоматически рассчитывается количество минералов в пройденной лучом площади костной ткани. Основное значение при исследовании костей имеет количество соединений кальция, имеющего сравнительно высокий атомный номер. Установлена связь между поглощенной энергией ионизирующего излучения и плотностью костной ткани. [74].

Основными показателями, определяющими МПКТ являются: минеральное содержание кости (ВМС), выраженное в граммах минерала в исследуемом участке, и минеральная плотность кости (ВМД), которая рассчитывается на диаметр кости и выражается в г/см^2 .

Известно, что содержание минеральных веществ в кости, представленных преимущественно солями кальция, связано с её прочностью сильнее других параметров – его вклад в прочность составляет 70 – 80 % [85, 86]. Программное обеспечение денситометра сравнивает полученные результаты с базой данных, в которой имеются нормативные показатели плотности костной ткани различных участков скелета в зависимости от пола, возраста, рассчитанные на основе проведенных больших популяционных исследований. Далее прибор отображает разницу статистически – в количестве стандартных отклонений используемой базы. Это количество обозначено как Т –критерий и Z –критерий.

- Т–показатель (критерий) – показывает количество костной массы у исследуемого по сравнению с пиком костной массы у молодого взрослого человека такого же пола. Указанный выше показатель до (–1) считается

нормальным. Показатель от (-1) до $(-2,5)$ указывает на первую стадию потери костной массы – остеопению. Показатель ниже $-2,5$ указывает на значительную потерю костной массы и определяется как остеопороз [49, 50, 74].

- Z-показатель (критерий) – отражает количество костной массы у исследуемого по сравнению с другими людьми того же возраста, пола и веса. Если он является необычно высоким или низким, это может указывать на необходимость проведения дальнейших анализов.

По рекомендации Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) для оценки результатов денситометрии используется T-критерий [85,86]. Результаты денситометрического исследования лучевой кости соматически и отологически здорового человека представлены на Рисунке 2.1.

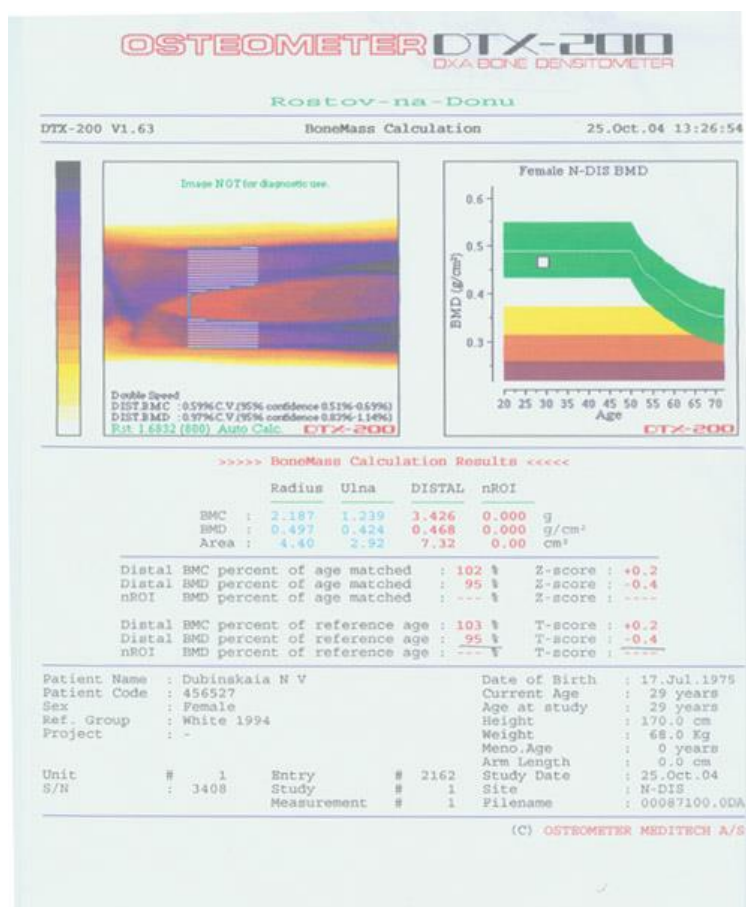


Рисунок 2.1 – Данные рентгеновской денситометрии лучевой кости предплечья здорового человека.

Эти данные соответствуют нормальным показателям при рентгеновской денситометрии лучевой кости по T-критерию ($T=0,4$) и косвенно свидетельствуют о нормальном костном метаболизме у обследуемого из контрольной группы. Поскольку костная ткань является депо для многих важных элементов, в частности для кальция, ее участие в метаболизме неоспоримо.

Костная ткань обладает высокой метаболической активностью, а значит, существенно влияет на уровень кальция, фосфора и других элементов в сыворотке крови.

Это и явилось основанием для использования денситометрии для оценки кальциевого метаболизма у больных с сенсоневральной тугоухостью.

Лабораторные исследования. Дополнительные лабораторные исследования включали определение общего и ионизированного кальция, фосфора, магния, натрия, калия, хлоридов сыворотки крови больных с сенсоневральной тугоухостью и лиц контрольной группы.

Исследование общего кальция. Забор крови из локтевой вены осуществлялся натощак. Кровь помещали в вакуумную пробирку с соответствующей маркировкой системы Vacuette, содержащую гель (олефинолигомер). Далее кровь центрифугировали в течение 10 минут со скоростью 3000 оборотов в минуту для разделения форменных элементов и сыворотки. Для исследования общего (неорганического) кальция сыворотки крови использован колориметрический метод. Принцип метода основан на взаимодействии кальция с комплексообразующими веществами, которые дают окрашенные соединения с известным спектром поглощения. Ионы кальция образуют сильноокрашенное соединение с красителем Арсеназо III при нейтральном pH (6,75). Концентрация образовавшегося комплекса определяется по характерному спектру поглощения при длине волны, равной 660 нм [129]. Используемый аппарат: биохимический автоматический анализатор Konelab prim 60 (Финляндия). Набор реагентов: Арсеназо III (0,2 ммоль/л), имидазольный буфер (100 ммоль/л), ПАВ, стабилизаторы (Thermo Fisher Scientific Oy Clinical

Diagnostics, Финляндия). Референтные значения содержания общего кальция в сыворотке крови: 2,2 – 2,65 ммоль/л.

Исследование фосфора. Используется колориметрический метод, принцип которого основан на взаимодействии фосфора с комплексообразующими веществами, которые дают окрашенные соединения с известным спектром поглощения. Фосфат-ионы образуют сильноокрашенное соединение с молибдатом аммония желтого цвета при pH 1,2. Интенсивность окраски соединения прямопропорциональна концентрации неорганических фосфатов в образце, измеряется при длине волны 340 нм [166]. Используемый аппарат: биохимический автоматический анализатор Konelab prim 60 (Финляндия). Набор реагентов: серная кислота (665 ммоль/л), молибдат аммония (2.3 моль/л) (Thermo Fisher, Финляндия). Референтные значения содержания фосфора в сыворотке крови: 0,78 – 1,42 ммоль/л.

Исследование магния. Используется колориметрический метод, принцип которого основан на взаимодействии магния с комплексообразующими веществами, которые дают окрашенные соединения с известным спектром поглощения. Используется биохимический автоматический анализатор Konelab prim 60 (Финляндия). Набор реагентов: Ксилидиловый синий I (0,14 ммоль/л), ЭГТФ (0,05 ммоль/л), K_2CO_3 (Бикарбонат калия) (77 ммоль/л), ТРИС буфер (200 моль/л) (Thermo Fisher, Финляндия). Референтные значения содержания магния в сыворотке крови: 0,65 – 1,06 ммоль/л.

Исследование ионизированного кальция, натрия, калия, хлоридов. Принцип метода – потенциометрический, который основан на точном измерении величины электродного потенциала того или иного элемента в растворе. Используемый аппарат – биохимический анализатор газов крови и электролитов «Rapidlab-1265» (США). Забор капиллярной крови из пальца осуществляли утром натощак объемом около 120 мкл в гепаринизированный капилляр, который устанавливался в прибор. Референтные значения: калий 3,5 – 5,1 ммоль/л; натрий

135 – 149 ммоль/л; хлориды 97 – 115 ммоль/л; кальций ионизированный 1,05 – 1,23 ммоль/л.

Исследование маркеров костного метаболизма. Кровь из локтевой вены берут натощак в объеме 5 мл в вакуумную пробирку с соответствующей маркировкой системы Vacuette, центрифугируют при 2000 оборотах в течение 10 мин. Образцы сыворотки помещают в автоматический анализатор с последующей оценкой данных.

Референтные значения *Beta-Cross Laps* в сыворотке крови: женщины 14 – 55 лет – менее 0,573 нг/мл, старше 55 лет – менее 1,008 нг/мл; мужчины 14 – 55 лет – менее 0,58 нг/мл; старше 55 лет – менее 0,85 нг/мл.

Остеокальцин. Референтные значения содержания остеокальцина в сыворотке крови: 0 – 43 нг/мл. Использовался электрохемилюминесцентный анализ (ЭХЛА) на автоматическом анализаторе Cobas 601 фирмы Хоффманн–Ла Рош (диагностический набор N–Mid osteocalcin кат. № 12149133 122).

Кальцитонин. Метод определения – иммуноанализ. Референтные значения содержания кальцитонина в сыворотке крови – 0–11,5 пг/мл.

Костная щелочная фосфатаза (остаза, ВАР). Проводили иммуноферментный анализ на автоматическом анализаторе Cobas 601 с помощью тест системы SEB09 1 Ни. Референтные значения содержания КЩФ в сыворотке крови: мужчины – до 20,1 мкг/л, женщины – пременопауза до 14,3 мкг/л, постменопауза – до 22,4 мкг/л. *Паратгормон* или паратиреоидный гормон (ПТГ). Метод определения – иммуноанализ. Референтные значения содержания паратгормона в сыворотке крови: нормальным считается усредненный уровень 10–65 пг/мл.

2.5 Методы статистической обработки материала

Статистическую обработку данных проводили с расчетом средней величины исследуемых показателей (M), ошибки средней (m), стандартного отклонения (δ), медианы (Me), моды (Mo). Для статистической оценки уровня

достоверности (p) различий значений параметров в группах в работе использовали t -критерий Стьюдента и критерий Chi-square (χ^2). Критический уровень значимости (p) при проверке статистических гипотез в данном исследовании принимали равным 0,05. Определение тесноты корреляционной взаимосвязи между результатами исследований проводили путём расчёта линейного коэффициента корреляции Пирсона (r), критерия Манна–Уитни (U).

В клинических исследованиях при изучении факторов риска, влияющих на исход, чаще всего используется три метода: множественная линейная регрессия, множественная логистическая регрессия и модель пропорциональных интенсивностей Кокса. В таблице 2.3 представлены наиболее существенные характеристики этих методов.

Таблица 2.3 – Основные модели многомерного анализа

Вид анализа	Тип данных	Особенности
Множественная линейная регрессия	Диапазон значений исхода	Коэффициенты при переменной линейно связаны с результатом
Множественная логистическая регрессия	Дихотомические результаты (Да/Нет)	Модель ограничивает вероятность исхода от 0 до 1
Модель пропорциональных интенсивностей Кокса	Период времени до события (время до выздоровления / рецидива/смерти)	Применяется для продолжительных исследований, в которых объекты могут быть потеряны во время наблюдения

В нашей работе для оценки влияния пола, возраста, МПКТ костной ткани, уровня костной щелочной фосфатазы, содержания ионизированного кальция в сыворотке крови у больных с сенсоневральной тугоухостью использовали множественный регрессионный анализ. Этот вид статистической обработки по β -стандартизированному коэффициенту регрессии позволил выделить наиболее весомые и значимые факторы, сопряженные с высокой степенью тугоухости. Далее для расчета прогностического коэффициента риска высоких степеней СНТ был использован метод логистической регрессии. Логистическая регрессия используется, когда значение переменной результата являлось бинарным (да/нет или 1/0) и включает одну или более независимых переменных. Логистическая

регрессия – это разновидность множественной регрессии, назначение которой состоит в анализе связи между несколькими независимыми переменными (предикторами) и зависимой переменной. С помощью бинарной логистической регрессии можно оценивать вероятность того, что событие наступит для конкретного испытуемого (например, больной/здоровый, высокого класса/низкого класса).

Далее, исходя из значений чувствительности и специфичности, нами было использовано построение характеристической кривой (ROC–кривая или Receiver Operator Characteristic curve) с помощью ROC анализа для расчета дифференциальных точек разделения или порогов отсечения (cut-off). ROC–кривая показывает зависимость количества верно диагностированных положительных случаев от количества неверно диагностированных положительных случаев. В терминологии ROC–анализа первые называются истинно положительным, вторые – ложно отрицательным множеством. ROC–кривая получается следующим образом. Для каждого значения порога отсечения, которое меняется от 0 до 1 с шагом 0,01 рассчитываются значения чувствительности Se и специфичности Sp. Строится график зависимости: по оси Y откладывается чувствительность Se, по оси X – $100\% - Sp$ (доля ложно положительных случаев). Для идеального классификатора график ROC–кривой проходит через верхний левый угол, где доля истинно положительных случаев составляет 100% или 1.0 (идеальная чувствительность), а доля ложно положительных примеров равна нулю. Поэтому чем ближе кривая к верхнему левому углу, тем выше предсказательная способность модели. Наоборот, чем меньше изгиб кривой и чем ближе она расположена к диагональной прямой, тем менее эффективна модель. Диагональная линия соответствует "бесполезному" классификатору, т.е. полной неразличимости двух классов. Ключевым моментом ROC анализа является нахождения дифференциальной точки разделения (cut-off). Порог отсечения нужен для того, чтобы применять модель на практике: относить новые примеры к одному из двух классов в зависимости от

соотношения величины показателя с точкой cut-off. Порог отсечения соответствует максимальной диагностической чувствительности и специфичности метода. Кроме того, с помощью анализа ROC-кривых проводили оценку диагностической эффективности модели путем определения площади под ROC-кривой (AUC или Area Under Curve). Площадь под ROC-кривой – полезный обобщенный показатель качества диагностического теста, рассчитывается автоматически методом трапеций. Чем больше значение AUC, тем «лучше» способность диагностического теста распознавать наличие и отсутствие заболевания. Кроме того, данный показатель удобно использовать для сравнительного анализа нескольких методов диагностики. В зависимости от величины AUC оценивали способность модели распознавать наличие или отсутствие определенного состояния (Таблица 2.4)

Таблица 2.4 – интерпретация величины Area Under Curve (AUC)

Интервал AUC	Способность диагностического теста распознавать наличие или отсутствие состояния
1,0 – 0,9	Отличная
0,8 – 0,9	Хорошая
0,7 – 0,8	Удовлетворительная
0,6 – 0,7	Посредственная
0,5 – 0,6	Неудовлетворительная
< 0,5	Абсурдная («вредная»)

Статистический анализ результатов исследования проводился с помощью программы STATISTICA 10.0 (StatSoft Inc., США).

ГЛАВА 3

ОСОБЕННОСТИ ОБМЕНА КАЛЬЦИЯ И ЕГО РЕГУЛЯЦИИ У БОЛЬНЫХ С СЕНСОНЕВРАЛЬНОЙ ТУГОУХОСТЬЮ. СОБСТВЕННЫЕ ДАННЫЕ

3.1. Изучение динамики заболеваемости сенсоневральной тугоухостью по материалам оториноларингологического стационара

Статистический анализ историй болезней пациентов с диагнозом сенсоневральная тугоухость, пролеченных в оториноларингологических отделениях МБУЗ «Городская больница №1 им. Н.А. Семашко» г. Ростова–на–Дону, проводится на протяжении 40 лет [31, 40,41]. Проведенный анализ показывает сохранение объёма стационарной помощи больным с сенсоневральной тугоухостью на протяжении 10–летнего периода (таблица 3.1.)

Таблица 3.1. – Показатели (абсолютные) числа больных с сенсоневральной тугоухостью за 10 лет, г. Ростов–на–Дону

Год	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
Число больных с сенсоневральной тугоухостью (n_1)	268	266	227	320	326	282	231	260	346	339
Число госпитализированных больных с заболеваниями ЛОР органов (n_1)	896	166	4390	4328	4475	4432	4091	3736	5766	4292

На рисунке 3.1 наглядно представлено процентное соотношение числа больных с сенсоневральной тугоухостью к общему числу госпитализированных больных в оториноларингологические отделения МБУЗ «Городская больница №1

им. Н.А. Семашко» г. Ростова–на–Дону за период 2006 – 2015 гг. Относительный показатель доли больных с сенсоневральной тугоухостью от общего числа госпитализированных в оториноларингологический стационар остаётся стабильно высоким на протяжении десятилетия, составляя от 5,65% до 7,9%.

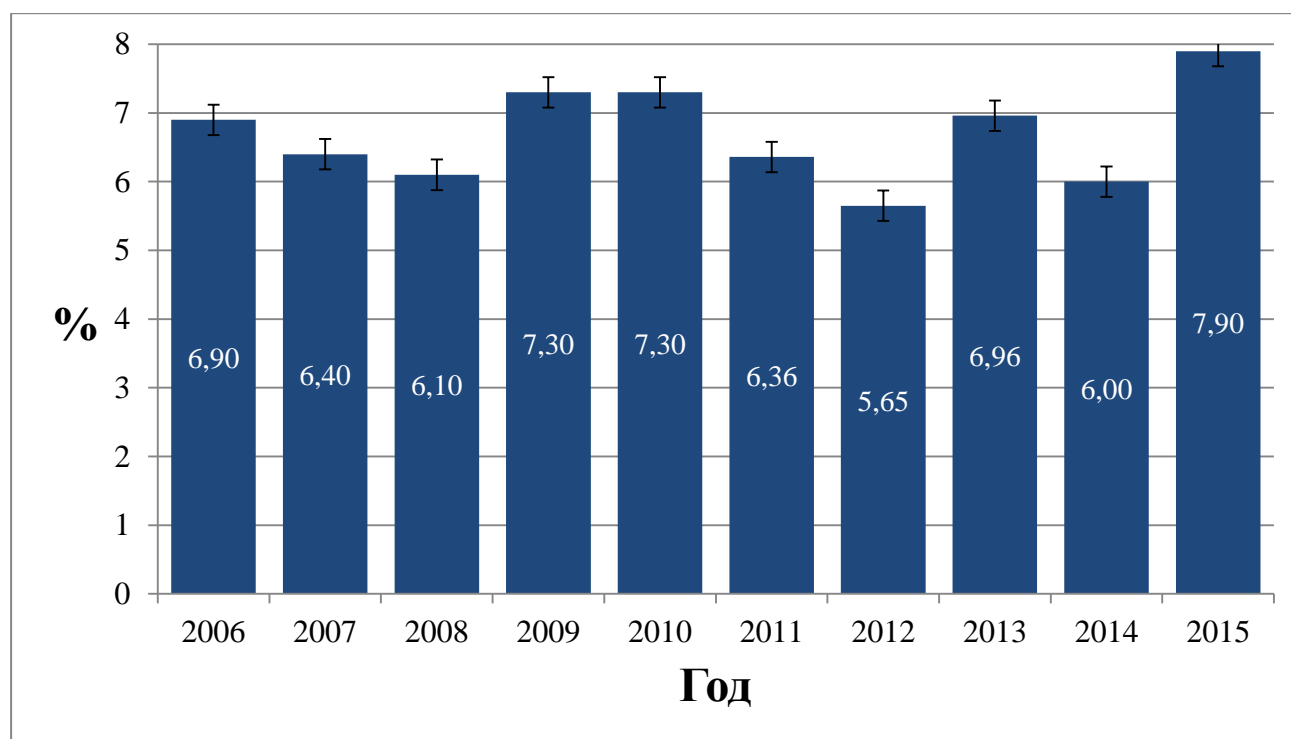


Рисунок 3.1 – Доля больных с сенсоневральной тугоухостью (%) относительно общего числа госпитализированных в оториноларингологический стационар в динамике за 10 лет.

3.2. Состояние кальциевого метаболизма у больных с сенсоневральной тугоухостью по показателям остеоденситометрии

У 80 (45,7%) больных клинической группы наблюдали острую и у 95 (54,3%) – хроническую СНТ, всего обследовано 175 больных, методом остеоденситометрии 113 (52 больных с острой СНТ, 61– с хронической).

При остеоденситометрическом исследовании у больных с СНТ определяли минеральную плотность костной ткани (МПКТ), отклонения МПКТ от нормы по Т– и Z–критерию. Результаты денситометрии участков костной ткани у пациентов с СНТ представлены в таблице 3.2.

Таблица 3.2 – Остеоденситометрические показатели у больных с сенсоневральной тугоухостью

Показатель	Область	Показатели
МПКТ, г/см ² (M±m)	Лучевая кость n=	0,953±0,07
T-критерий Me [25,75]		-2,3 [-2,5; -0,5]
Z-критерий Me [25,75]		-0,4 [-1,7; 0,1]

Примечание: Me – медиана, [25,75] – межквартильный диапазон

В среднем, по группе больных с СНТ МПКТ была сниженной. Остеоденситометрические показатели с учетом стадии СНТ представлены в таблице 3.3.

Таблица 3.3 – Остеоденситометрические показатели у больных с сенсоневральной тугоухостью по группам (в зависимости от формы заболевания)

Показатель	Область	Острая СНТ (n=52)	Хроническая СНТ (n=61)	p
МПКТ, г/см ² (M±m)	Лучевая кость	1,128±0,07	0,814±0,06	0,04
T-критерий Me [25,75]		-1,4 [-2,5; -0,5]	-2,6 [-2,2; -1,1]	
Z-критерий Me [25,75]		-0,4 [-1,7; 0,1]	-0,3 [-2,2; -0,4]	

У больных с хронической СНТ по сравнению с больными с острой формой заболевания МПКТ статистически значимо была снижена в области лучевой кости на 33,5% (p=0,02), 15,3% (p=0,04), 17,2% (p=0,03) и 27,8% (p=0,04), соответственно.

Медиана T-критерия, отражающего отличие МПКТ больного от величины МПКТ в норме, была смещена в отрицательную сторону от критической

величины «-1SD», что свидетельствовало о патологическом костном ремоделировании.

Индивидуальная оценка отклонения МПКТ от нормального значения с помощью Т-критерия у больных 2 группы позволила установить, что среди больных с острой СНТ остеоденситометрическое заключение, соответствующее норме, встречалось в преобладающей доле случаев – 85%, остеопения – в 8,8% и остеопороз – в 6,2% (Таблица 3.4).

У пациентов с хронической СНТ нормальные параметры остеоденситограммы встречались статистически значимо в меньшем числе случаев (25,3%), а остеопатия (74,7%), а именно, остеопения (41,1%) и остеопороз (33,6%) – в большей (Таблица 3.4).

Таблица 3.4 – Распределение больных с остеопенией и остеопорозом среди больных с острой и хронической СНТ

Изменение	Острая СНТ (n=52)		Хроническая СНТ (n=61)		p
	Абс.	%	Абс.	%	
Норма	44	85,0	15	25,3	$\chi^2_{M-L}=62,2$ p<0,0001
Остеопения	5	8,8	25	41,1	
Остеопороз	3	6,2	21	33,6	

Примечание: χ^2_{M-L} – критерий согласия с поправкой Мантеля–Хензеля на непрерывность

Распределение больных с денситометрическими показателями, характерными для остеопатии (osteopения, остеопороз) среди больных с СНТ разной степени тяжести (по степеням тугоухости) представлено в таблице 3.5.

У больных с 1 степенью СНТ у подавляющей части больных (91%) отсутствовали изменения при остеоденситометрии, лишь у 1 больного были признаки остеопатии (9%).

При 2 степени тугоухости у больных с СНТ в 72,7% случаев наблюдались нормальные остеоденситометрические параметры, а в 27,3% случаев параметры, характерные для остеопатии.

При 3 степени тугоухости доля больных с нормальными показателями денситометрии составила 16%, с остеопатией – 84%, а при 4 степени и глухоте доля больных с денситометрическими признаками остеопатии составила 83,3%.

Таблица 3.5 – Распределение больных с показателями остеоденситометрии, характерными для остеопатии и нормы, среди больных с СНТ разной степени тяжести

Изменение	Степень тугоухости				p
	I (n=11)	II (n=35)	III (n=9)	IV и глухота (n=6)	
Норма	10(91%)	25 (72,7)	1 (16%)	1 (16,7%)	$\chi^2_{M-L} = 16,9$ $p < 0,01$
Остеопатия	1 (9%):	10 (27,3%):	8 (84%):	5 (83,3%):	

Примечание: χ^2_{M-L} – критерий согласия с поправкой Мантеля–Хензеля на непрерывность

Итак, при хронической СНТ и при повышении степени тяжести СНТ доля больных с остеопатиями (остеопения, остеопороз) возрастала.

Снижение МПКТ по результатам остеоденситометрии свидетельствовало об ассоциации двух состояний – СНТ и патологического ремоделирования костной ткани. Длительное протекание заболевания и повышение степени тяжести СНТ было сопряжено с повышением доли больных с остеопатиями.

3.3. Содержание кальция и его регуляторов в сыворотке крови у больных с сенсоневральной тугоухостью

В таблице 3.6 представлены средние величины содержания кальция и фосфора в крови у больных с сенсоневральной тугоухостью в целом по всей клинической группе и у отологически здоровых лиц (группа контроля).

Средние величины показателей кальциево–фосфорного обмена крови у больных с СНТ и у отологически здоровых лиц контрольной группы находились в пределах референтного диапазона.

Таблица 3.6 – Показатели кальциево–фосфорного обмена крови у больных сенсоневральной тугоухостью и у отологически здоровых лиц, $M \pm m$

Показатель	Референтные значения	Больные СНТ n=175	Контрольная группа n=42	p
Са общий, ммоль/л	2,2–2,65	2,21±0,04	2,43±0,18	0,12
Са иониз., ммоль/л	1,05–1,23	1,13±0,03	1,16±0,09	0,89
Фосфор, ммоль/л	0,78–1,42	1,13±0,04	1,05±0,07	0,74
Са _о /Р	–	1,97±0,05	2,27±0,06	0,15

Примечание: Уровень достигаемой значимости p рассчитан по наблюдаемому критерию Манна–Уитни.

Сравнительный анализ изучаемых параметров между клинической и контрольной группами статистически значимых различий не выявил ($p > 0,05$), вместе с тем, среди больных с СНТ число пациентов с пониженным содержанием общего кальция в крови составило 92 (52,6%), с нормальным содержанием – 47 (26,8%) и с повышенным содержанием – 36 (20,6%), что указывает на тенденцию к дисбалансу. Число больных с СНТ с пониженным содержанием ионизированного кальция сыворотки было 41 (23,4%), с нормальным содержанием – 72 (41,1%) и с повышенным уровнем – 62 (35,5%).

Подробное изучение параметров минерального обмена крови (Рисунок 3.2) показало, что медиана содержания общего кальция в крови у больных с СНТ

составила 2,3 ммоль/л. Изучаемый параметр колебался в крови больных СНТ от 1,1 ммоль/л до 2,9 ммоль/л. Межквартильный диапазон или диапазон от нижнего до верхнего квартиля, где распределены 50% величин вокруг медианы, соответствовал 2,1 – 2,4 ммоль/л.

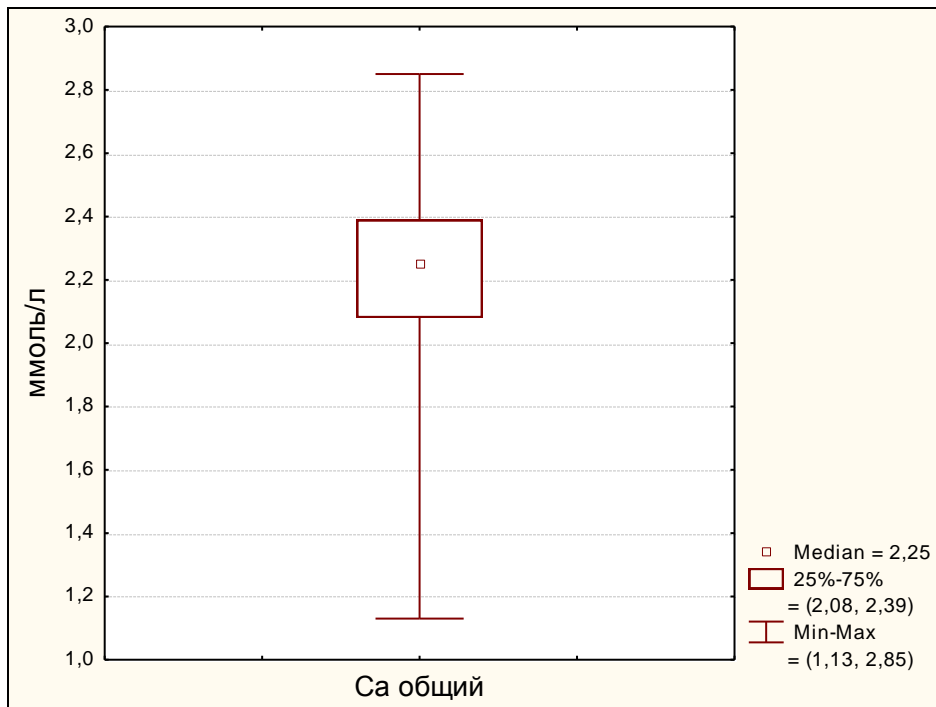


Рисунок 3.2 – Медиана, межквартильный диапазон и размах (Min–Max) содержания общего кальция в крови у больных с сенсоневральной тугоухостью.

Около половины общего кальция сыворотки связаны с белком, – в основном, альбумином. Остальное количество кальция находится в свободной ионизированной форме. Именно эта доля кальция является физиологически активной. Медиана содержания ионизированного кальция в сыворотке крови у больных СНТ составила 1,1 ммоль/л, межквартильный диапазон 1,06 – 1,18 ммоль/л, а размах колебаний 0,8 – 2,5 ммоль/л (Рисунок 3.3).

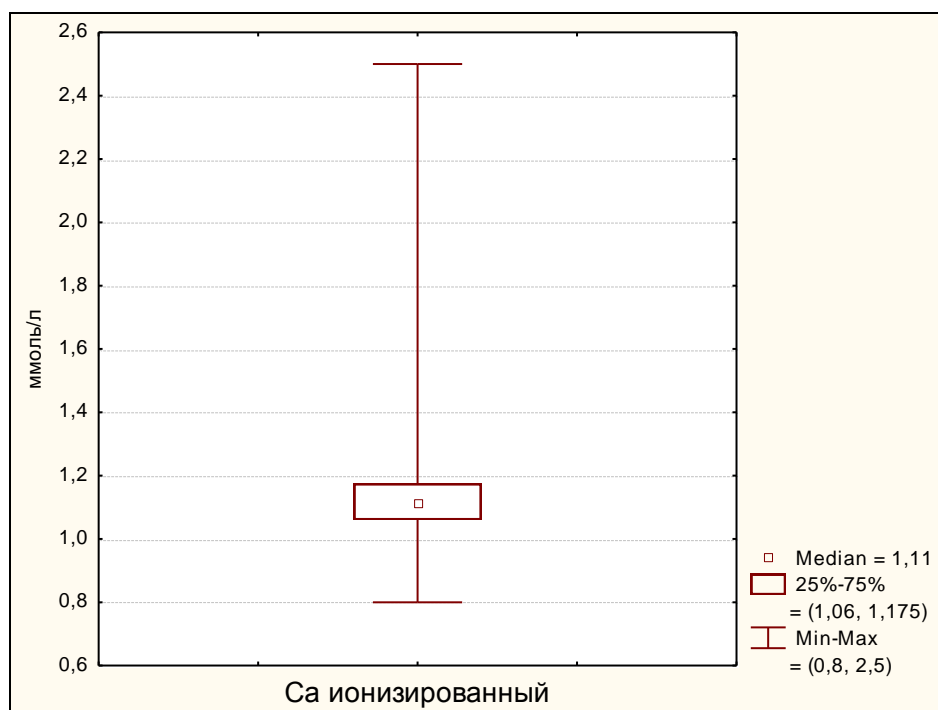


Рисунок 3.3 – Медиана, межквартильный диапазон и размах (Min–Max) содержания ионизированного кальция в крови у больных с сенсоневральной тугоухостью.

Фосфор необходим не только для нормального костеобразования, но и для нормального энергетического обмена в организме. Его колебание в крови больных СНТ происходило в диапазоне 0,79 – 1,5 ммоль/л, то есть с верхней границей, несколько превышающей референтные значения, но медиана ряда составила 1,2 ммоль/л при межквартильном диапазоне 1,02 – 1,3 ммоль/л (Рисунок 3.4).

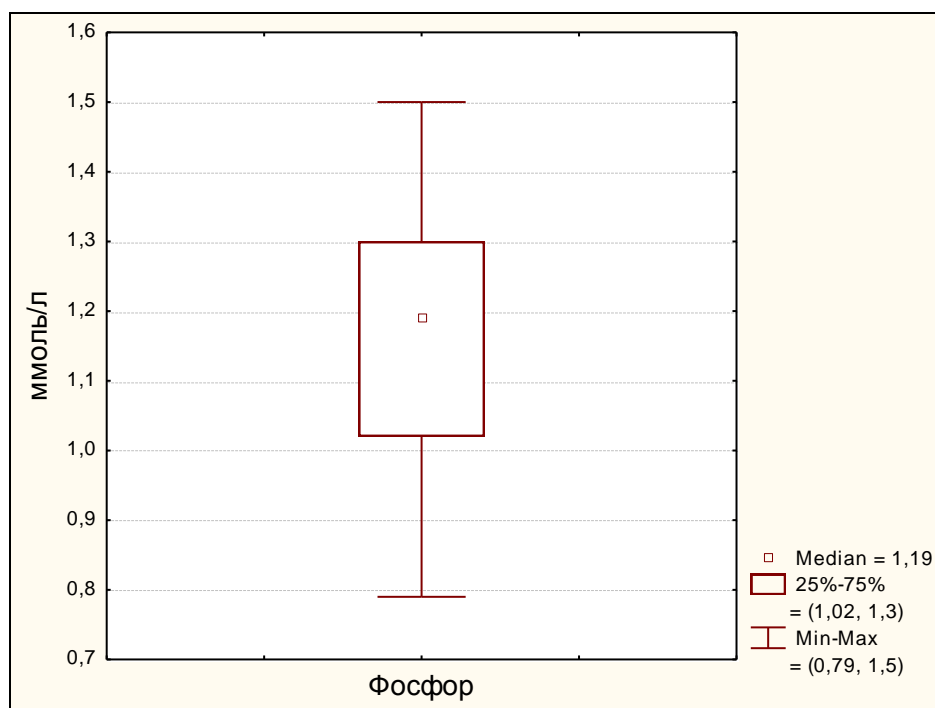


Рисунок 3.4 – Медиана, межквартильный диапазон и размах (Min–Max) содержания фосфора в крови у больных с сенсоневральной тугоухостью.

Практически у всех больных с СНТ уровень фосфора крови не выходил за пределы нормального диапазона. Только у 2 (1,1%) – уровень фосфора крови был повышенным.

Другие показатели ионограммы крови (натрий, калий, хлориды, магний) у больных с СНТ и у отолотически здоровых лиц не отличались от нормы и не имели межгрупповых различий (Таблица 3.7).

Таблица 3.7 – Показатели минерального обмена крови у больных с сенсоневральной тугоухостью и у отолотически здоровых лиц, $M \pm m$

Показатель	Референтные значения	Больные с СНТ, n=175	Контрольная группа, n=42	p
Натрий, ммоль/л	123–140	139,5±1,89	132,8±5,63	0,12
Калий, ммоль/л	3,5–5,5	4,3±0,12	4,5±0,46	0,85
Хлориды, ммоль/л	95–107	105,2±1,3	101,3±2,8	0,45
Магний, ммоль/л	0,8–1,2	0,85±0,02	0,88±0,08	0,92

Примечание: Уровень достигаемой значимости p рассчитан по наблюдаемому критерию Манна–Уитни.

Результаты исследования регуляторов уровня кальция крови у больных СНТ и у отологически здоровых лиц отражены в таблице 3.8. Средние величины уровня кальцитонина, остеокальцина и паратгормона у больных СНТ и у отологически здоровых лиц контрольной группы находились в пределах нормального диапазона. Сравнительный анализ уровня кальцитонина у пациентов клинической и контрольной групп статистически значимых различий не выявил ($p>0,05$). Напротив, концентрация остеокальцина – белка, синтезируемого остеобластами, у больных СНТ была на 69% ниже ($p=0,0003$) по сравнению с аналогичным показателем контрольной группы.

Уровень костной фракции щелочной фосфатазы ($40,6\pm 3,12$ мкг/л) у пациентов с СНТ был выше, чем контрольный уровень у отологически здоровых лиц ($28,7\pm 2,94$ мкг/л) на 41,5% ($p=0,02$), а также выше верхней границы нормы. Щелочная фосфатаза присутствует в высокой концентрации в клетках костной ткани. Активность костной фракции щелочной фосфатазы увеличивается при стимулировании процессов образования костной ткани.

Среднее значение маркера остеорезорбции β Cross-Laps у больных с СНТ ($0,69\pm 0,05$ нг/мл) превышало верхнюю границу референтного диапазона ($0,573$ нг/мл) и было выше аналогичного значения в контрольной группе ($0,51\pm 0,09$ нг/мл) на 35,3% ($p=0,04$).

Таблица 3.8 – Показатели регуляторов кальциево–фосфорного обмена крови у больных сенсоневральной тугоухостью и у отологически здоровых лиц, $M\pm m$

Показатель	Референтные значения	Больные с СНТ, n=175	Контрольная группа, n=42	p
Кальцитонин, пг/мл	0 – 11,5	$2,82\pm 0,51$	$3,45\pm 0,74$	0,46
Остеокальцин, нг/мл	0–43	$5,65\pm 1,55$	$18,21\pm 2,56$	0,0003
КЩФ, мкг/л	Муж. до 20,1 Жен. до 14,3 (менопауза), до 22,4 (постменопауза)	$40,6\pm 3,12$	$28,7\pm 2,94$	0,02
β Cross-Laps, нг/мл	0,2099–0,573	$0,69\pm 0,05$	$0,51\pm 0,09$	0,04
Паратгормон, пг/мл	9,5–75	$47,4\pm 3,38$	$54,6\pm 3,72$	0,08

Примечание: Уровень достигаемой значимости p рассчитан по наблюдаемому критерию Манна–Уитни.

Таким образом, регуляторы кальциевого обмена крови у больных с СНТ изменяли свою активность, наиболее статистически значимо по содержанию остеокальцина ($p = 0,0003$) и КЩФ ($p = 0,02$).

На следующем этапе анализировали параметры кальциево–фосфорного обмена и его регуляторов в зависимости от фазы заболевания. Показатели ионного обмена крови у больных сенсоневральной тугоухостью в зависимости от острой или хронической формы заболевания представлены в таблице 3.9.

Таблица 3.9 – Показатели ионного обмена крови у больных с острой и хронической сенсоневральной тугоухостью ($M \pm m$)

Показатель	Острая тугоухость, $n=80$	Хроническая тугоухость, $n=95$	p
Са общий, ммоль/л	$2,27 \pm 0,04$	$2,15 \pm 0,06$	0,85
Са иониз., ммоль/л	$1,17 \pm 0,04$	$1,08 \pm 0,02$	0,92
Фосфор, ммоль/л	$1,12 \pm 0,05$	$1,15 \pm 0,06$	0,95
Натрий, ммоль/л	$138,1 \pm 1,92$	$140,6 \pm 1,75$	0,87
Калий, ммоль/л	$4,1 \pm 0,13$	$4,5 \pm 0,14$	0,94
Хлориды, ммоль/л	$103,1 \pm 1,4$	$106,4 \pm 1,1$	0,90
Магний, ммоль/л	$0,83 \pm 0,05$	$0,86 \pm 0,03$	0,95

Примечание: Уровень достигаемой значимости p рассчитан по наблюдаемому критерию Манна–Уитни.

У пациентов с острой и хронической СНТ показатели кальциево–фосфорного обмена крови по этим группам не различались ($p > 0,05$). Однако, при сравнительном анализе регуляторов минерального обмена были выявлены изменения (Таблица 3.10).

Таблица 3.10 – Показатели регуляторов кальциево–фосфорного обмена крови у больных с острой и хронической сенсоневральной тугоухостью ($M \pm m$)

Показатель	Острая тугоухость, n=80	Хроническая тугоухость, n=95	p
Кальцитонин, пг/мл	2,95±0,64	2,62±0,94	0,68
Остеокальцин нг/мл	5,39±1,97	6,0±2,64	0,95
КЩФ, мкг/л	35,9±1,44	43,7±1,32	0,02
β Cross–Laps, нг/мл	0,66±0,08	0,70±0,09	0,92
Паратгормон, пг/мл	48,2±3,12	50,6±3,95	0,94

Примечание: Уровень достигаемой значимости p рассчитан по наблюдаемому критерию Манна–Уитни.

Так, уровень костной щелочной фосфатазы крови при хронической стадии заболевания ($43,7 \pm 1,32$ мкг/л) был выше на 21,7% ($p=0,02$) по сравнению с пациентами с острой СНТ ($35,9 \pm 1,44$ мкг/л). Данное обстоятельство свидетельствовало об усилении костного метаболизма в сторону повышения интенсивности остеосинтеза при хронизации заболевания. Содержание остальных регуляторов кальциевого обмена не зависело от формы заболевания – острой или хронической.

Распределение больных с СНТ в зависимости от степени тугоухости было следующим: I – 34 (19,4%), II – 99 (56,9%), III – 25 (14,4%), IV – 10 (5,7%) и полная глухота – 6 (3,4%). Показатели минерального обмена крови у больных СНТ не зависели от степени тугоухости (Таблица 3.11).

Таблица 3.11 – показатели кальциево–фосфорного обмена крови у больных сенсоневральной тугоухостью в зависимости от степени тугоухости ($M \pm m$)

Показатель	Степень тугоухости				p
	I	II	III	IV и глухота	
Са общий, ммоль/л	2,34±0,06	2,18±0,07	2,23±0,18	2,33±0,08	0,96
Саиониз., ммоль/л	1,14±0,01	1,13±0,03	1,11±0,02	1,13±0,05	0,99
Фосфор, ммоль/л	1,2±0,04	1,08±0,1	1,02±0,11	1,06±0,04	0,66
Натрий, ммоль/л	139,1±1,45	138,7±1,32	139,0±1,56	135,8±1,48	0,87
Калий, ммоль/л	4,4±0,23	4,2±0,11	4,3±0,15	4,5±0,13	0,93
Хлориды, ммоль/л	102,4±1,2	105,1±1,3	103,7±1,4	104,6±1,0	0,88
Магний, ммоль/л	0,86±0,02	0,85±0,02	0,87±0,02	0,87±0,02	0,94

Примечание: Уровень достигаемой значимости p рассчитан по наблюдаемому критерию Крускала–Уоллиса (Kruskal–Wallis).

Содержание общего, ионизированного кальция, фосфора не различалось у пациентов с разной степенью тугоухости, о чем свидетельствовали результаты дисперсионного анализа (по критерию Крускала–Уоллиса): $p=0,96$ при сравнении общего кальция, $p=0,99$ при сравнении ионизированного кальция, $p=0,66$ при сравнении фосфора.

Использование дисперсионного анализа при оценке различий параметров минерального обмена крови в подгруппах не выявило межгрупповых отличий ($p>0,05$).

Показатели регуляторов кальциево–фосфорного обмена крови у больных с СНТ в зависимости от степени тугоухости представлены в таблице 3.12.

У больных с 1 степенью СНТ содержание кальцитонина, остеокальцина и КЩФ было выше по сравнению с пациентами с более высокой степенью тугоухости.

Таблица 3.12 – показатели регуляторов кальциево–фосфорного обмена крови у больных сенсоневральной тугоухостью в зависимости от степени тугоухости ($M\pm m$)

Показатель	Степень тугоухости			
	1	2	3	4 и глухота
Кальцитонин, пг/мл	$5,68\pm 0,74$	$2,4\pm 0,24^*$	$2,68\pm 0,42^*$	$1,45\pm 0,08^*$
Остеокальцин нг/мл	$9,2\pm 1,83$	$4,6\pm 1,95^*$	$6,1\pm 0,77^*$	$2,0\pm 0,12^*$
КЩФ, мкг/л	$45,3\pm 1,83$	$37,9\pm 1,80^*$	$34,2\pm 1,75^*$	$34,4\pm 1,93^*$
β Cross–Laps, нг/мл	$0,63\pm 0,02$	$0,66\pm 0,03$	$0,65\pm 0,04$	$0,75\pm 0,03^*$
Паратгормон, пг/мл	$45,2\pm 2,21$	$46,0\pm 3,01$	$45,9\pm 2,73$	$47,0\pm 2,74$

Примечание: * – статистически значимое отличие показателей по сравнению с больными с 1 степенью тугоухости при $p<0,05$ (по критерию Манна–Уитни).

Следовательно, при 1 степени СНТ происходила активация костного метаболизма с усилением остеобразования. При 4 степени тугоухости и глухоте

повышался уровень маркера остеорезорбции β Cross-Laps по сравнению с начальной степенью заболевания.

Итак, у больных СНТ, вне зависимости от стадии и степени заболевания наблюдаются незначительные колебания, приближающиеся к нормальным показатели уровня общего и ионизированного кальция, фосфора в сыворотке крови. При хронической СНТ отличительной особенностью являлось повышение уровня костной щелочной фосфатазы в отличие от острой формы заболевания, что свидетельствовало об активации костного метаболизма.

При 1 степени СНТ наблюдалось повышение концентрации кальцитонина, остеокальцина и костной щелочной фосфатазы, что отражало интенсивно протекающие процессы остеобразования как компенсаторного механизма в начале заболевания. С повышением стадии заболевания повышался маркер остеорезорбции β Cross-Laps.

3.4. Связь характеристик сенсоневральной тугоухости и состояния костного метаболизма, минерального обмена и минеральной плотности костной ткани

Для изучения взаимосвязи между клиническим течением СНТ и минеральной плотностью костной ткани, параметрами костного метаболизма и минерального обмена был предпринят корреляционный анализ с определением рангового коэффициента корреляции Спирмена, результаты которого отражены в таблице 3.13.

По результатам корреляционного анализа было установлено, что повышение степени тугоухости было статистически значимо сопряжено со снижением в крови уровня костной фракции щелочной фосфатазы ($R = -0,35$, $p = 0,013$) и минеральной плотности костной ткани ($R = -0,31$, $p = 0,004$). С хронизацией СНТ коррелировало повышение уровня в крови костной фракции щелочной фосфатазы ($R = 0,39$, $p = 0,027$) и минеральной плотности костной ткани ($R = -0,44$, $p = 0,029$). Практически корреляционная связь была установлена между

возрастом и снижением МПКТ ($R = -0,95$, $p = 0,0003$). С повышением длительности заболевания в крови происходило снижение ионизированного кальция ($R = -0,36$, $p = 0,01$) и повышение остеокальцина ($R = 0,46$, $p = 0,05$).

Факторы, влияющие на исход, принято называть факторами риска, независимыми переменными. А сам исход – зависимой переменной или эффектом. Важным моментом, обуславливающим необходимость многомерного анализа, является установление связи между амплитудой эффекта и многообразием потенциальных факторов риска, возможно связанных с исходом.

С помощью метода множественной регрессии была получена математическая модель, связывающая степень СНТ и такие параметры пациентов как пол, возраст, МПКТ поясничного отдела позвоночника, уровень костной щелочной фосфатазы крови и содержание ионизированного кальция крови.

Таблица 3.13 – Результаты корреляционного анализа взаимосвязи характеристик сенсоневральной тугоухости и параметров костного метаболизма, минерального обмена

Показатель 1	Показатель 2	Spearman R	p
Степень тугоухости	Са общий	-0,20	0,301
Степень тугоухости	Са иониз	0,02	0,915
Степень тугоухости	Фосфор	-0,34	0,21
Степень тугоухости	Кальцитонин	-0,35	0,194
Степень тугоухости	Остеокальцин	-0,08	0,852
Степень тугоухости	КЩФ	-0,35	0,013
Степень тугоухости	МПКТ	-0,31	0,004
Стадия заболевания	Са общий	-0,13	0,283
Стадия заболевания	Са иониз	-0,16	0,194
Стадия заболевания	Фосфор	-0,01	0,957
Стадия заболевания	Кальцитонин	-0,12	0,56
Стадия заболевания	Остеокальцин	0,05	0,842
Стадия заболевания	КЩФ	0,39	0,027
Стадия заболевания	МПКТ	-0,44	0,029

Возраст	Са общий	0,14	0,27
Возраст	Са иониз	0,03	0,82
Возраст	Фосфор	–0,23	0,24
Возраст	Кальцитонин	0,19	0,35
Возраст	Остеокальцин	0,24	0,32
Возраст	КЩФ	–0,22	0,15
Возраст	МПКТ	–0,95	0,0003
Длительность заболевания	Са общий	0,02	0,90
Длительность заболевания	Са иониз	–0,36	0,01
Длительность заболевания	Фосфор	0,22	0,32
Длительность заболевания	Кальцитонин	0,04	0,86
Длительность заболевания	Остеокальцин	0,46	0,050
Длительность заболевания	КЩФ	0,12	0,83
Длительность заболевания	МПКТ	0,18	0,57

Математическое выражение имело следующий вид:

$СТ = 9,92 + 0,26 * П + 0,001 * В - 3,96 * МПКТ - 0,09 * КЩФ - 0,48 * Са \text{ иониз}$, где

СТ – степень тугоухости,

П – пол: 0 – мужской, 1 балл – женский,

МПКТ – минеральная плотность костной ткани поясничного отдела позвоночника, г/см²,

КЩФ – уровень костной щелочной фосфатазы в крови, мкг/л,

Са иониз – содержание ионизированного кальция в крови, ммоль/л.

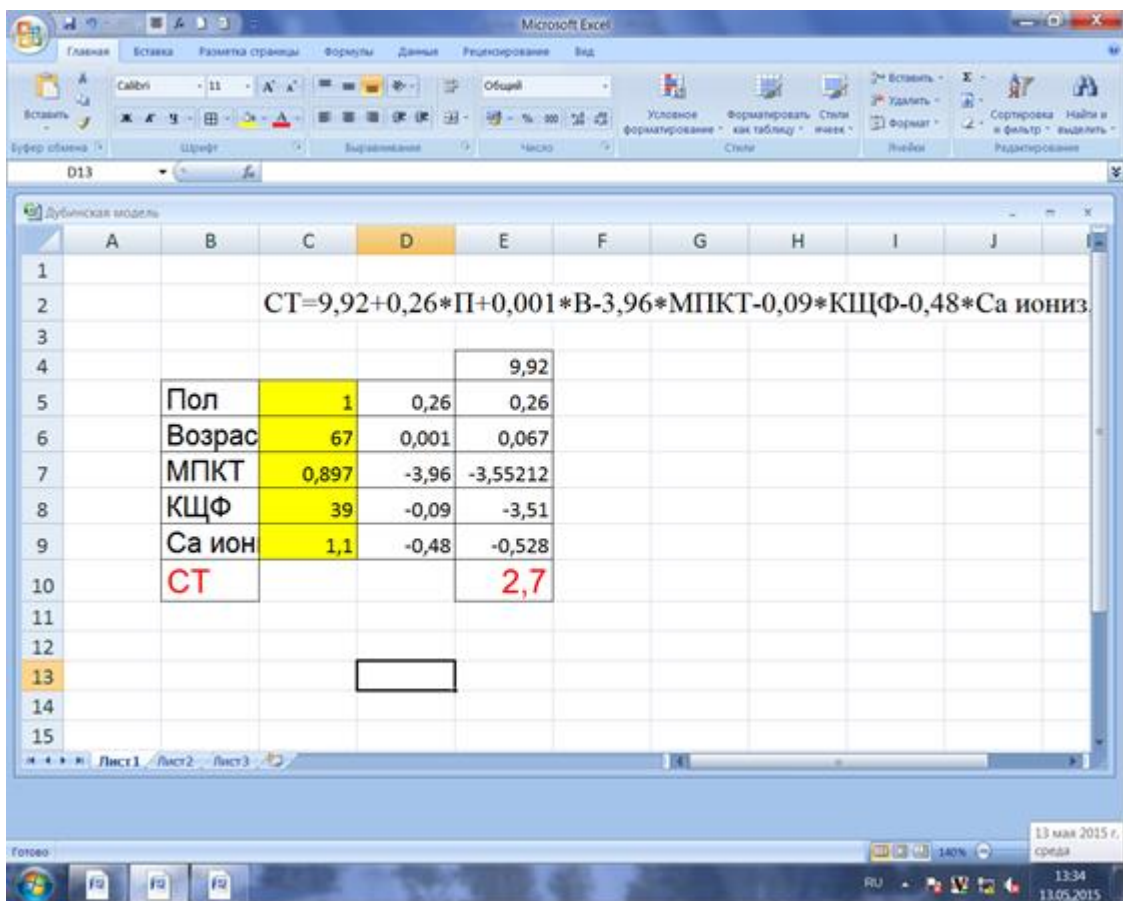
Используя полученную модель, высокую степень тугоухости (III–IV) можно прогнозировать с учетом пола и возраста, содержания ионизированного кальция в крови, уровня костной щелочной фосфатазы в крови и минеральной плотности костной ткани поясничного отдела позвоночника.

Например, пациентка П., 67 лет. При исследовании минерального обмена и его регуляторов было обнаружено, что уровень в крови ионизированного кальция крови составил 1,1 ммоль/л, КЩФ – 39 мкг/л. При остеоденситометрии МПКТ имел величину 0,897 г/см². Для удобства расчетов на основе табличного процессора MS Excel был создан файл для автоматического определения степени

СНТ по параметрам модели. Вводим индивидуальные показатели пациентки в цифровую зону и рассчитываем степень СНТ (Рисунок 3.5).

$$СТ = 9,92 + 0,26*П + 0,001*В - 3,96*МПКТ - 0,09*КЩФ - 0,48*Са_{иониз} = 9,92 + 0,26*1 + 0,001*67 - 3,96*0,897 - 0,09*39 - 0,48*1,1 = 2,7.$$

Прогнозируемая степень тугоухости 3, то есть высокого класса. Последующее аудиологическое исследование позволило подтвердить 3 степень СНТ у больной П.



	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1										
2				СТ=9,92+0,26*П+0,001*В-3,96*МПКТ-0,09*КЩФ-0,48*Са иониз.						
3										
4					9,92					
5		Пол	1	0,26	0,26					
6		Возрас	67	0,001	0,067					
7		МПКТ	0,897	-3,96	-3,55212					
8		КЩФ	39	-0,09	-3,51					
9		Са ион	1,1	-0,48	-0,528					
10		СТ			2,7					
11										
12										
13										
14										
15										

Рисунок 3.5 – окно для автоматических расчетов по математической модели с данными больной П.

У больного К. 45 лет при лабораторно–инструментальном исследовании было обнаружено, что МПКТ поясничного отдела позвоночника составила 1,13 г/см², уровень ионизированного кальция – 1,1 ммоль/л, КЩФ – 45 мкг/л.

Автоматизированный расчет с помощью математической модели позволил определить ранг степени СНТ (рисунок 3.6):

$$\text{СТ} = 9,92 + 0,26 \cdot \text{П} + 0,001 \cdot \text{В} - 3,96 \cdot \text{МПКТ} - 0,09 \cdot \text{КЩФ} - 0,48 \cdot \text{Са иониз} = 9,92 + 0,26 \cdot 0 + 0,001 \cdot 45 - 3,96 \cdot 1,13 - 0,09 \cdot 45 - 0,48 \cdot 1,2 = 0,9.$$

По результатам расчёта математической модели пациент К. склонен к формированию СНТ низкой степени. Последующее аудиологическое исследование позволило выявить у пациента 1 степень СНТ.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1												
2			СТ=9,92+0,26*П+0,001*В-3,96*МПКТ-0,09*КЩФ-0,48*Са иониз,									
3												
4						9,92						
5		Пол	0	0,26	0							
6		Возраст	45	0,001	0,045							
7		МПКТ	1,13	-3,96	-4,4748							
8		КЩФ	45	-0,09	-4,05							
9		Са ион	1,2	-0,48	-0,576							
10		СТ			0,9							
11												
12												
13												
14												
15												
16												
17												
18												
19												
20												
21												
22												

Рисунок 3.6 – окно для автоматических расчетов по математической модели с данными больного К.

Множественный коэффициент взаимосвязи между факторами и степенью СНТ составил 0,85, коэффициент детерминации – 0,73, критерий Фишера F

составил 14,6 при $p < 0,05$, что по совокупности свидетельствовало о статистической значимости модели.

Значимость влияния каждого из факторов модели на признак (степень СНТ) оценивали по β -стандартизированному коэффициенту регрессии, показателю чувствительности и коэффициенту детерминации, а также уровню доверительной вероятности p (Таблица 3.14). Чем выше коэффициент регрессии по модулю, тем выше значимость фактора. Наибольшие значения коэффициента регрессии сложились для МПКТ ($\beta = -0,45$, $p = 0,03$), КЩФ ($\beta = -0,44$, $p = 0,02$) и пола больного ($\beta = 0,12$, $p = 0,023$). Этим же факторам соответствовали наибольшие величины чувствительности и коэффициентов детерминации. Следовательно, от изменения МПКТ, КЩФ и пола больного в большей мере зависело формирование СНТ высоких классов.

Таблица 3.14 – значимость влияния факторов математической модели на степень СНТ

Фактор	β -стандартизированный коэффициент регрессии	Чувствительность	Коэффициент детерминации	p
Пол	0,12	0,62	0,61	0,023
Возраст	0,014	0,38	0,22	0,09
МПКТ	-0,45	0,74	0,74	0,03
КЩФ	-0,44	0,70	0,70	0,02
Са иониз.	-0,11	0,37	0,03	0,27

На следующем этапе была разработана нелинейная модель прогнозирования СНТ высокой степени (3–4) по наиболее значимым факторам – T -критерию по результатам денситометрии и уровню КЩФ крови. Высоким степеням СНТ (3–4) и при глухоте присваивали ранг 1, а низким классам СНТ (1–2) – 0. Логистическая регрессия используется, когда значение переменной результата является бинарным (да/нет или 1/0) и включает одну или более независимых переменных. Логистическая регрессия – это разновидность множественной регрессии,

назначение которой состоит в анализе связи между несколькими независимыми переменными (называемыми также предикторами) и зависимой переменной. С помощью метода логистической регрессии, была получена следующая модель:

$$K = \frac{\exp(z)}{1 + \exp(z)}, \text{ где}$$

K – коэффициент прогноза СНТ высоких классов

z – коэффициент регрессии, рассчитываемый по формуле:

$$z = \exp[(-64,4) + (-12,8)*x + (1,3)*y] / [(1 + \exp(-64,4 + (-12,8)*x + (1,3)*y))]$$

X – отличие МПКТ от нормы по Т–критерию по результатам остеоденситометрии,

Y – уровень костной щелочной фосфатазы в крови, мкг/л.

Если $K \geq 0,6$, то прогноз СНТ 3–4 степени тяжести у больного высокий, при $K < 0,6$ – низкий.

Прогностическая значимость модели оценивалась с помощью критерия χ^2 и его доверительной вероятности. Высокое значение наблюдаемого критерия $\chi^2 = 39,4$ при $p < 0,0001$ свидетельствовало о статистической значимости модели.

Графическая аппроксимация связи между прогрессированием СНТ и отличием МПКТ в различных отделах опорно–двигательного аппарата от нормы по Т–критерию, уровнем КЩФ в крови отражена на рисунке 3.7.

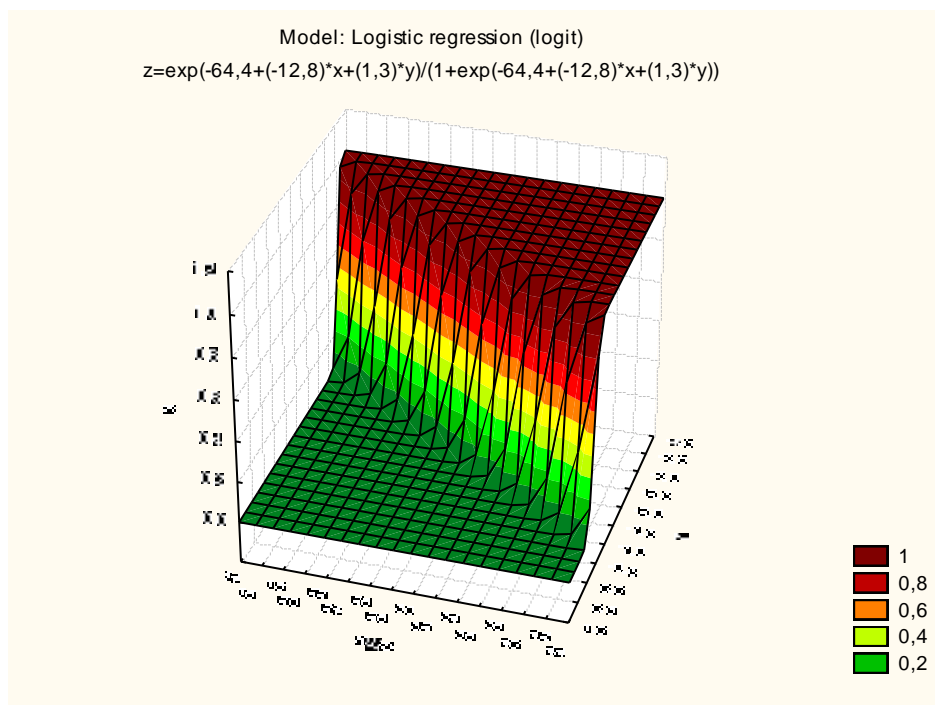


Рисунок 3.7 – График зависимости между прогрессированием сенсоневральной тугоухости и отличием МПКТ от нормы по Т–критерию и уровнем КЩФ в крови.

С повышением КЩФ и снижением Т-критерия как параметра остеоденситометрии прогноз развития высоких классов СНТ повышался.

Полученное уравнение логистической регрессии позволяет рассчитать риск развития СНТ высоких классов по результатам лабораторно–инструментального обследования больного.

Например, у больного Ж. при проведении остеоденситометрии лучевой кости Т-критерий составил $-2,1$ SD, а уровень КЩФ крови 25 мкг/л. Подставляем параметры в модель

$$K = \frac{\exp(z)}{1 + \exp(z)} = \frac{\exp(1,8)}{1 + \exp(1,8)} = 0,86$$

так как $z = \exp[(-41,4) + (-18,8) * (-2,1) + (0,12) * 31] / [(1 + \exp(-41,4 + (-18,8) * (-2,1) + (0,12) * 31))] = 1,8$

С помощью полученной математической модели было определено, что $K = 0,86$. Поскольку полученное значение более критического $0,6$, то риск развития СНТ 3–4 степени тяжести – высокий.

У пациента Р. при проведении остеоденситометрии лучевой кости Т-критерий составил $-1,6$ SD, а уровень КЩФ крови 21 мкг/л. Подставляем параметры в модель

$$K = \frac{\exp(z)}{1 + \exp(z)} = \frac{\exp(8,8)}{1 + \exp(8,8)} = 0,00015$$

так как $z = \exp[(-41,4) + (-18,8) * (-1,8) + (0,12) * 32] / \{(1 + \exp[(-41,4) + (-18,8) * (-2,1) + (0,12) * 31])\} = -8,8$

С помощью полученной математической модели было определено, что $K = 0,00015$. Поскольку полученное значение менее критического $0,6$, то риск развития СНТ высоких классов – низкий.

На следующем этапе при использовании нелинейного анализа был изучен отдельно вклад отклонений МПКТ костей при остеоденситометрии в прогноз развития у больного СНТ высоких классов.

Математическое выражение, описывающее зависимость имело вид:

$$K = -0,025 - 0,116 * x + 0,08 * x^2,$$

где K – коэффициент прогноза СНТ высоких классов,
 X – отличие МПКТ от нормы по Т–критерию по результатам остеоденситометрии.

Зависимость между показателями иллюстрирована на рисунке 3.8.

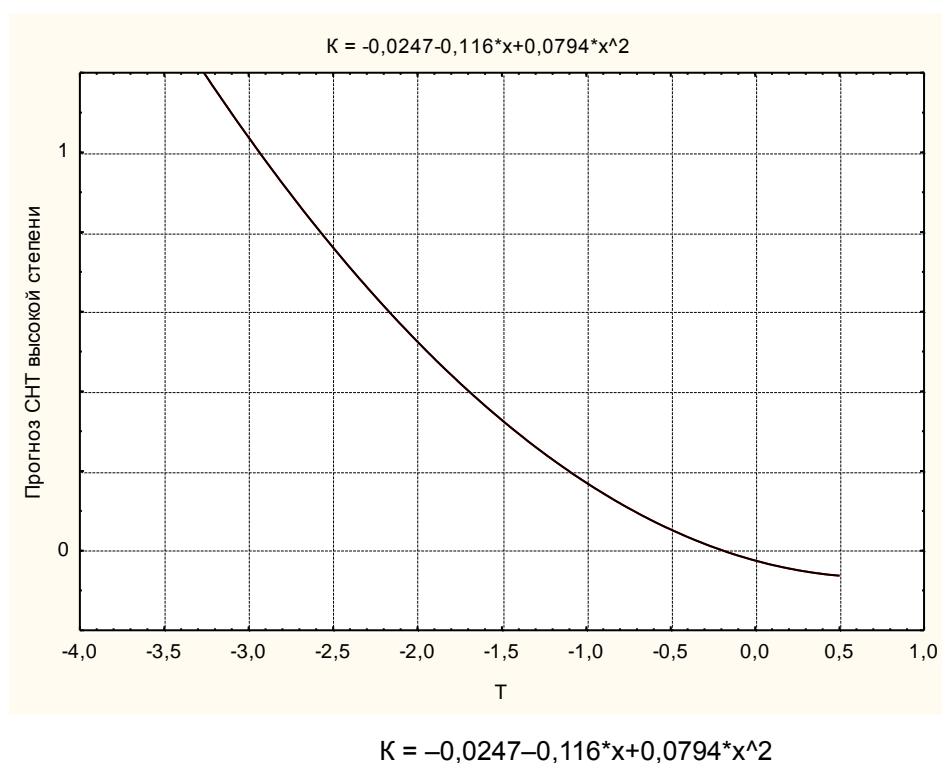


Рисунок 3.8 – График зависимости между прогнозом развития СНТ высоких классов и отличием МПКТ от нормы по Т–критерию.

Согласно установленной зависимости при $T = -0,5$ риск развития СНТ высоких классов составлял 5%, при уровне $T = -1$ – 17,1% и уровне $T = -2$ – 52,7% и $T = -2,5$ – 76,5% (Таблица 3.15).

Таблица 3.15 – Стратификация риска развития СНТ высоких классов от изменений на остеоденситограмме

Риск события	Т–критерий отклонения МПКТ при остеоденситометрии			
	–0,5	–1	–2	–2,5
Риск развития СНТ высоких классов, %	5	17,1	52,7	76,5

Для оценки чувствительности и специфичности прогностического значения отличия МПКТ от нормы по Т–критерию по результатам остеоденситометрии для развития СНТ высоких классов был проведен ROC–анализ. На рисунке 3.9 отражена ROC–кривая, характеризующая зависимость количества верно классифицированных положительных примеров от количества неверно классифицированных отрицательных примеров либо чувствительности и специфичности для различных уровней Т–критерия в отношении развития СНТ высоких классов.

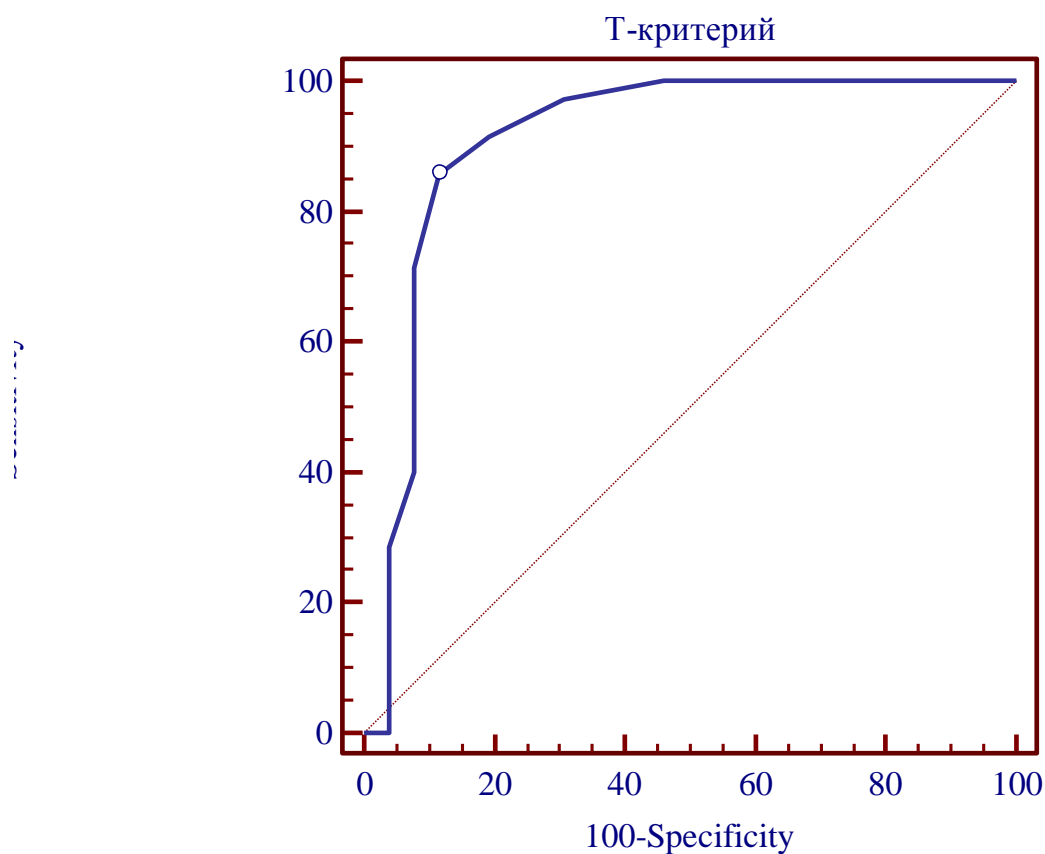


Рисунок 3.9 – ROC–кривая остеоденситометрического уровня Т для выявления больных с высоким риском развития СНТ высоких классов.

Дифференциальной точкой разделения для Т–критерия или точкой «cut–off» было значение 2,2 (Таблица 3.16). При снижении Т–критерия ниже 2,2 больные

входили в группу высокого риска по развитию СНТ высоких классов с диагностической чувствительностью 94,4% и специфичностью 47,8%.

Таблица 3.16 – Соотношение чувствительности и специфичности Т-уровня с определением диагностической точки разделения для выделения больных с высоким риском развития СНТ 3–4 степени тяжести

Т-кр	ДЧ	ДИ ДЧ	ДС	ДИ ДС
<-1	100,00	81,5 – 100,0	0,00	0,0 – 4,0
<-1,5	100,00	81,5 – 100,0	7,78	3,2 – 15,4
<-2,2*	94,44	72,7 – 99,9	47,78	33,2 – 55,4
<-2,5	94,44	72,7 – 99,9	44,44	34,0 – 55,3
<-3	88,89	65,3 – 98,6	45,56	35,0 – 56,4

Примечание: ДЧ – диагностическая чувствительность, ДС – диагностическая специфичность, ДИ – доверительный интервал

Площадь под ROC-кривой (AUC, AreaUnderCurve) имела высокое значение (AUC=0,774±0,063) со статистической значимостью $p=0,0001$ ($z=4,36$), что подтверждало прогностическую значимость Т-критерия для оценки риска развития СНТ.

Таким образом, к предикторам развития СНТ высокой степени тяжести можно отнести снижение минеральной плотности костной ткани с повышением костного метаболизма. Разработанная модель с учетом пола, возраста, уровня МПКТ по результатам остеоденситометрии и величин остеомаркеров позволяет индивидуализировать отологический риск в отношении развития СНТ

ГЛАВА 4

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ КОРРЕКЦИИ ОБМЕНА КАЛЬЦИЯ ПРИ СЕНСОНЕВРАЛЬНОЙ ТУГОУХОСТИ. СОБСТВЕННЫЕ ДАННЫЕ

4.1. Моделирование сенсоневральной тугоухости у лабораторных животных

В экспериментальном исследовании по моделированию сенсоневральной тугоухости участвовало 42 белых половозрелых беспородных крысы, возраст животных 2,5 – 3,5 месяцев, масса тела 190 – 210 г. Всего выделено 6 групп, из которых одна – контрольная и 5 экспериментальных, в которых животные подвергались звуковому воздействию в определённых условиях.

Характеристика животных по группам, условия эксперимента, виды последующего гистологического исследования и количество образцов отражены в Таблице 4.1.

Все отобранные белые, беспородные крысы при первичном осмотре были здоровы, с обычным поведением, имели густую, гладкую шерсть. При отомикроскопии признаков острого гнойного среднего отита не было. У всех животных рефлекс Прейера при звуковом воздействии был положительным («животное слышит»). При исследовании слуховой функции путём определения отоакустической эмиссии на частоте продуктов искажения (ОАЭЧПИ) и задержанной вызванной отоакустической эмиссии (ЗВОАЭ) на базе прибора «OtoRead» фирмы Interacoustics (Дания) у всех 42, участвующих в эксперименте животных (68 ушей), был получен результат «тест пройден». Следовательно, по данным двух вариантов исследования слуха (рефлекс Прейера и исследование ОАЭ по результатам ОАЭЧПИ и ЗВОАЭ) слуховая функция у всех 42 лабораторных животных (68 ушей) соответствовала норме.

Акустическое воздействие широкополосным шумом выполняли в частотном диапазоне 355–5000 Гц при уровне звука 85 дБ с помощью звукоакустотеста модели ЗРТ–01 (производство – «Ритм», г. Москва) в свободном звуковом поле. Уровень звука измеряли с помощью цифрового измерителя уровня звука типа AR 824, производства НТУ «АРК Энергосервис» (г. Санкт–Петербург, Россия).

Таблица 4.1 –Характеристика групп животных и условия эксперимента

Группа животных	Характеристика групп, условия эксперимента	Гистологи– ческое исследование: количество крыс (височных костей)	Гистоло– гическое исследование: количество исследованных срезов	Сканирующая электронная микроскопия и рентгеноспектральный микроанализ/ количество крыс (височных костей)	Всего крыс
1 – контрольная	Интактные крысы	4(8)	40	4 (8)	4
2	Воздействие шума (озвучивание) 2 недели	5(10)	100	–	5
3	Воздействие шума (озвучивание) и иммобилизационное стрессирование (модель тугоухости), 2 недели	9 (9)	90	9 (9)	9
4	Воздействие шума (озвучивание) и иммобилизационное стрессирование (модель тугоухости) 2 недели, без лечения, оценка через 2 нед	3 (6)	60	–	3
5	Воздействие шума (озвучивание) и иммобилизационное стрессирование, одновременное лечение (нимодипин), 2 недели	9 (9)	90	9(9)	9
6	Воздействие шума (озвучивание) и иммобилизационное стрессирование – 2 недели, последующее лечение 2 недели (нимодипин)	8 (8)	80	8 (8)	8
Итого	Крысы (височные кости)	38(50)	500	30 (34)	42

Результаты оценки слуха у подопытных крыс по группам были следующими. В группе 1 – контрольной у животных вызывался живой,

устойчивый рефлекс Прейера, при исследовании отоакустической эмиссии (ОАЭЧПИ, ЗВОАЭ) результат «тест прошел» имел место у всех 4 крыс (8 ушей).

В группе 2 из 5 подопытных крыс (10 ушей), которых по 120 минут ежедневно 2 недели подвергали акустическому воздействию широкополосным шумом («озвучивание»), угасание рефлекса Прейера и результат «тест не прошел» при исследовании отоакустической эмиссии (ОАЭ) имел место у 4 крыс (8 ушей), и у 1 (2 уха) – соответствовал контролю, то есть воспроизведение «модели тугоухости» наблюдалось в 80% случаев.

В группе 3 – 9 крыс (18 ушей) подвергали воздействию шума («озвучивание») и иммобилизации («стресс»). Каждое из подопытных животных группы в течение 2 недель ежедневно 1 раз в день до кормления подвергали внешнему воздействию: сначала каждое животное обездвигивали, помещая его в односторонний «крысиный домик». Через 30 минут после начала обездвигивания, не удаляя подопытное животное из клетки, в течение 120 минут подвергали акустическому воздействию широкополосным шумом с параметрами: частотный диапазон 355 – 5000 Гц, интенсивность звука – 90 дБ. После окончания акустического воздействия, иммобилизацию подопытного животного прекращали, и крысу пересаживали в общую просторную клетку. В этой группе подопытных животных угасание рефлекса Прейера было у 9, и результат «тест не прошел» при исследовании ОАЭ – у 9 крыс, то есть у всех 9 животных (18 ушей) была сформирована «модель тугоухости» – 100%. На разработанный нами (с соавт.) способ моделирования получен Патент РФ на изобретение (№ 2627155).

В группе 4 – 3 крысы (6 ушей) по такой же схеме подвергали воздействию шума («озвучивание») и иммобилизации («стресс»), формируя этим «модель тугоухости», угасание рефлекса Прейера после окончания воздействия было у 3, и результат «тест не прошел» при исследовании ОАЭ – у 3 крыс (6 ушей), при обследовании через 2 недели результаты исследования слуха не изменились, то есть у всех 3 животных (6 ушей) сохранялись функциональные признаки «модели тугоухости».

В группе 5 одновременно с моделированием тугоухости по описанному оригинальному способу животным проводили превентивное лечение. В суточную дозу питьевой воды лабораторных крыс добавляли препарат из группы блокаторов кальциевых каналов – раствор нимодипина из расчёта 1 мл (200 мкг)/кг (60–70 мкг на одну крысу) в течение 2 недель. Из 9 крыс, которые получали лечение одновременно со звуковым воздействием и иммобилизацией («модель тугоухости»): угасание рефлекса Прейера после окончания воздействия было у 2 (4 уха), и результат «тест не прошел» при исследовании ОАЭ – у 2 крыс (22,2%), а у 7 животных (77,8%) данные исследования слуха (14 ушей) свидетельствовали о положительных результатах «раннего лечения» и соответствовали контролю.

В группе 6 – 8 крыс получали лечение через 2 недели от начала эксперимента, то есть начинали принимать нимодипин с питьевой водой по окончании моделирования тугоухости (воздействие шума и иммобилизационного стрессирования). Угасание рефлекса Прейера после окончания воздействия было отмечено у 7 крыс, и ответ «тест не прошел» при исследовании ОАЭ – у 7 крыс (14 ушей), то есть результаты исследования слуха свидетельствовали об отрицательных результатах «позднего лечения» у большинства подопытных животных – 7 крыс (14 ушей), то есть в 87,5% случаев, лишь у 1 крысы (2 уха) слух улучшился до уровня контроля (12,5 %).

На рисунке 4.1 представлен фрагмент эксперимента при исследовании отоакустической эмиссии с помощью прибора «OtoRead» у здоровой белой беспородной крысы контрольной группы (группа 1).



Рисунок 4.1 – Фрагмент эксперимента во время исследования отоакустической эмиссии у здоровой белой беспородной крысы контрольной группы

На рисунке 2 представлен фрагмент эксперимента при исследовании отоакустической эмиссии левого уха белой беспородной крысы из группы животных, которым формировали «модель тугоухости» (Группа 3): на экране прибора «OtoRead» – результат: «НЕТ», что свидетельствовало о том, что «тест не пройден», а, значит, о нарушении слуховой функции крысы.



Рисунок 4.2 – Фрагмент эксперимента при исследовании отоакустической эмиссии белой беспородной крысы из группы 3 животных, которых подвергали

звуковому воздействию и иммобилизационному стрессированию («модель тугоухости»): на экране прибора «OtoRead» – результат «НЕТ».

На 11 день эксперимента сначала проводили оценку слуховой функции (каждого уха) подопытного животного путём регистрации ЗВОАЭ и ОАЭЧПИ, которую выполняли с помощью портативной системы регистрации ОАЭ «OtoRead» фирмы Interacoustics (Дания). Подбирали ушной вкладыш соответствующего диаметра для обеспечения герметической obturation наружного слухового прохода, затем в наружный слуховой проход подопытного животного вводили зонд прибора, на кончике которого установлен подобранный вкладыш, и проводили исследование. Имел место следующий результат при исследовании ЗВОАЭ: «НЕТ» или «Тест не прошёл», что свидетельствовало о развитии у подопытного животного СНТ. После окончания эксперимента по группам животных под наркозом производили умерщвление крыс в строгом соответствии с Хельсинской декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации. В последующем после ряда этапов подготовки («проводки») готовили гистологические препараты и проводили морфологическое исследование срезов улитки, изучая их методом световой микроскопии. Наличие в гистологических препаратах улиток височных костей белых крыс признаков альтераций элементов спирального органа свидетельствовало о развитии СНТ у подопытного животного.

Таким образом, результаты двух достоверных, объективных методов исследования: функционального – исследование отоакустической эмиссии и морфологического – изучение нарушений гистологических структур слухового аппарата улитки подопытных животных, свидетельствовали о развитии СНТ у всех 20 подопытных животных основной группы, т.е. о 100%ой реализации модели.

На рисунке 4.3 представлена микрофотография гистологического препарата спирального органа улитки одной из крыс контрольной группы, где представлены

нейроэпителиальные – волосковые клетки спирального органа; поддерживающие клетки спирального органа; базилярная мембрана; вестибулярная мембрана; спиральная связка; сосудистая полоска; покровная мембрана.

Как видно из рисунка 4.3 все перечисленные структуры спирального органа сохраняют свою целостность и упорядоченность, соответствуя нормальному строению спирального органа улитки, что подтверждает отсутствие нарушений слуха у крысы контрольной группы.

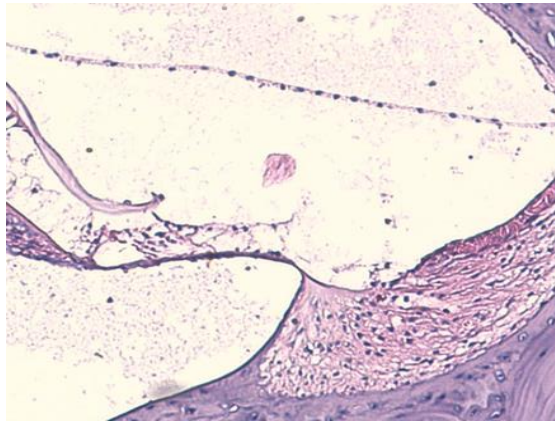


Рисунок 4.3 – Микрофотография гистологического препарата спирального органа улитки одной из крыс контрольной группы (К).

На рисунке 4.4 представлена микрофотография гистологического препарата спирального органа улитки одной из крыс основной группы. Как видно из рисунка 4.4, нейроэпителиальные клетки спирального органа дистрофически изменены, разрушены, клеточные ряды не прослеживаются; поддерживающие клетки спирального органа дислоцированы, отсутствуют в наружной части спирального органа – гибель клеток; базилярная мембрана деформирована, разорвана; вестибулярная мембрана деформирована и разорвана; в спиральной связке – нарушение архитектоники и отёк; в сосудистой полоске – признаки отёка; покровная мембрана отсутствует. Все перечисленные дистрофические и деструктивные изменения структур спирального органа, определяемые на гистологическом препарате, свидетельствуют о развитии СНТ у подопытного животного.

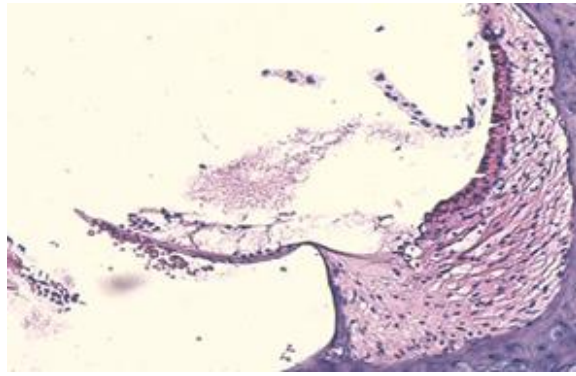


Рисунок 4.4 – Микрофотография гистологического препарата спирального органа улитки одной из крыс основной группы – «модель сенсоневральной тугоухости».

Таким образом, нами (Патент РФ № 2627155) предложен способ моделирования сенсоневральной тугоухости. Способ включает акустическое воздействие широкополосным шумом на подопытное животное, отличающееся тем, что в качестве подопытного животного используют белую беспородную крысу, обездвиживают и подвергают акустическому воздействию широкополосным шумом с описанными выше параметрами. Данный способ прост в исполнении, позволяет сократить время реализации модели СНТ и обеспечивает адекватное воспроизведение сенсоневральной тугоухости, вызванной акустическим воздействием широкополосного шума на слуховой аппарат экспериментального животного [42].

4.2. Результаты морфологических исследований спирального органа при моделировании сенсоневральной тугоухости у животных

Результаты морфологических исследований в **группе 1** (контрольной) экспериментальных животных (крыс) показали, что спиральный орган представлен рецепторными (сенсоэпителиальными) наружными (НВК) и внутренними волосковыми клетками (ВВК) и пятью видами опорных клеток,

расположенными в улитковом канале перепончатого лабиринта, заключённого в костный лабиринт височной кости.

На гистологическом срезе улитковый канал имеет треугольную форму, занимает центральное положение, заполнен эндолимфой и граничит с двумя другими каналами, заполненными перилимфой: сверху – вестибулярной лестницей, снизу – барабанной лестницей.

Верхняя стенка улиткового канала, ограничивающая его от вестибулярной лестницы, образована вестибулярной мембраной, выстланной однослойным плоским эпителием с большим количеством микропиноцитозных пузырьков в цитоплазме, что связано с участием в транспорте воды и электролитов между пери – и эндолимфой.

Боковая стенка улиткового канала образована сосудистой полоской, расположенной на спиральной связке, но нижняя треть последней покрыта однослойным эпителием. Сосудистая полоска сформирована многослойным эпителием с густой сетью капилляров, в котором различают 3 слоя эпителиоцитов: первый слой краевых клеток с апикально расположенными микроворсинками (Рисунок 4.5) и базальной исчерченностью за счет митохондрий, обеспечивающих работу мембранных ионных $Na^+ - K^+$ насосов, что приводит к высокой концентрации K^+ в эндолимфе, второй слой – промежуточных клеток, третий слой – базальных клеток. Сосудистая полоска участвует в образовании эндолимфы, транспорте питательных веществ, кислорода, поддержке ионного состава эндолимфы. Встречаются в ней и клетки диффузной эндокринной системы. Спиральная связка богата фибробластами – источниками различных цито– и хемокинов.

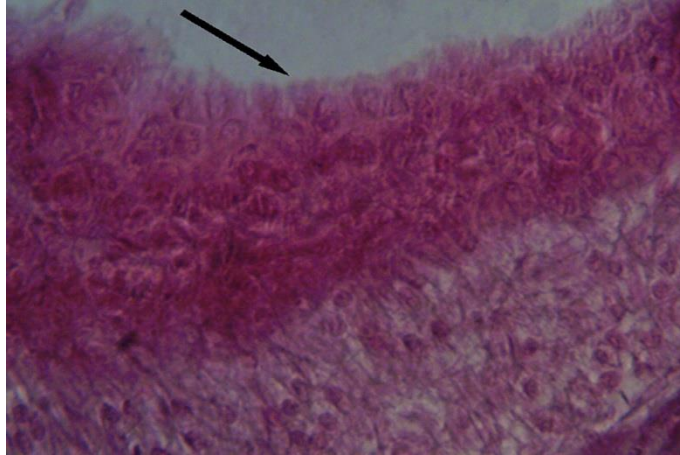


Рисунок 4.5 – Микроворсинки краевых клеток сосудистой полосы. Контроль. Окраска гематоксилин–эозином. Увеличение в 1000 раз.

Дно улиткового канала образует базилярная пластинка, на которой расположен орган слуха с его рецепторными внутренними и наружными волосковыми клетками и различными опорными клетками.

ВВК грушевидной формы, расположены в один ряд, со всех сторон окружены внутренними фаланговыми клетками.

НВК призматической формы расположены в 3–5 рядов, лежат в чашевидных вдавлениях наружных фаланговых клеток и соприкасаются с наружными фаланговыми клетками только в зоне апикальной и базальной поверхности. Средняя часть НВК омывается эндолимфой, что, вероятно, обуславливает их большую чувствительность к токсическим веществам.

На поверхности волосковых клеток имеются стереоцилии, контактирующие с покровной мембраной, нависающей над всем органом слуха. Ядра волосковых клеток меньше ядер опорных клеток. В них хорошо различимы мелкозернистый хроматин и ядрышки.

Опорные (поддерживающие) клетки органа слуха включают 5 типов:

1) клетки–столбы – внутренние и наружные, ограничивают треугольное пространство – внутренний туннель, по разные стороны которого располагаются

внутренние и наружные волосковые и опорные клетки органа слуха. Через туннель проходят нервные волокна.

2) фаланговые клетки Дейтерса (внутренние и наружные) высокие, призматические, лежат на базальной мембране, являются опорными для волосковых клеток (соответственно внутренних и наружных), отличаются разной площадью контакта соответственно с наружными и внутренними волосковыми клетками.

3) пограничные клетки (внутренние и наружные) Гензена прилежат соответственно к внутренним или наружным фаланговым клеткам. Значительная высота этих клеток снижается латерально и клетки граничат с наружными поддерживающими клетками Клаудиуса или с другой стороны – с клетками внутренней бороздки, выстилающими спиральный лимб.

4) наружные поддерживающие клетки Клаудиуса кубической формы лежат между наружными Гензеновскими клетками и эпителиоцитами наружной бороздки.

5) клетки Беттхера лежат между базилярной пластинкой и клетками Клаудиуса, возможно, имеют отношение к всасыванию и секреции.

Угол между базилярной и вестибулярной мембранами занят спиральным лимбом, состоящим из рыхлой волокнистой соединительной ткани с большим количеством клеток и вертикально ориентированными коллагеновыми волокнами (слуховые зубы). Покровный эпителий спирального лимба вырабатывает матрикс для покровной мембраны. Просвет вестибулярной, барабанной лестниц и улиткового канала свободны.

Спиральный ганглий имеет типичное строение (Рисунок 4.6) с характерным светлым ядром нейроцитов с глыбками хроматина.

Таким образом, в контрольной группе животных отмечается типичное строение всех клеток и структурных образований органа слуха с сохранностью их эпителиальной выстилки, свободным просветом улиткового канала,

вестибулярной и барабанной лестниц, что соответствует общепринятой норме и может быть группой сравнения.

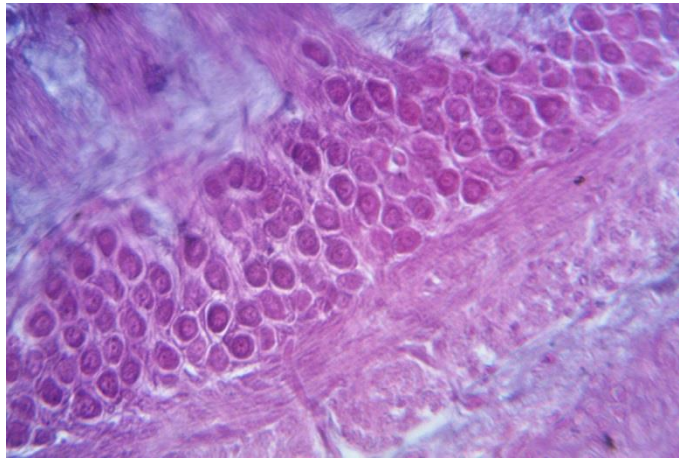
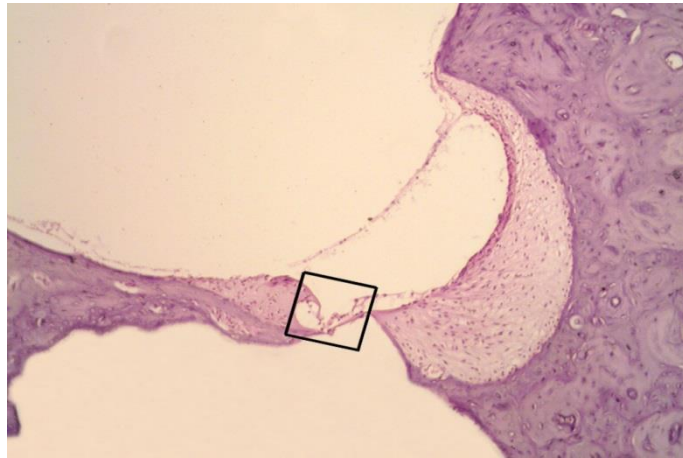


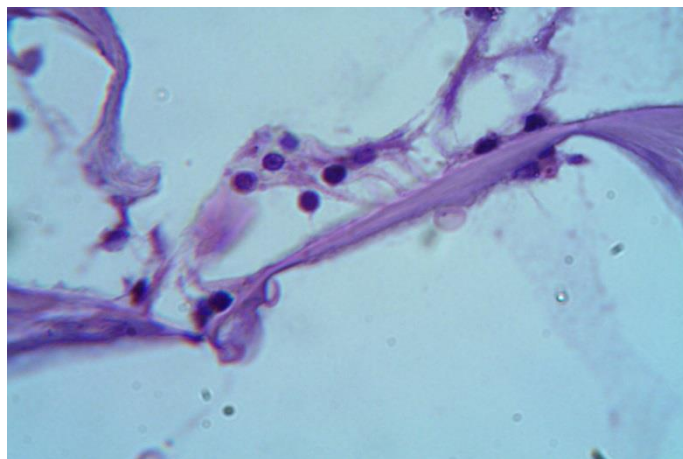
Рисунок 4.6 – Светлые ядра, глыбки хроматина, ядрышки нейроцитов спирального ганглия. Контроль. Окраска гематоксилин–эозином. Увеличение в 400 раз.

В **группе 2** экспериментальных животных сразу после моделированием СНТ путем воздействия («озвучивания») белым шумом интенсивностью 90 Дб на протяжении 2 часов ежедневно в течение 7 дней – ВВК не изменены.

В туннеле нечетко определяются несколько набухшие нервные волокна. НВК сохранены на всем протяжении улиткового канала, имеет хорошо структурированный мелкоглыбчатый хроматин. В отдельных клетках отмечаются несколько подчеркнутый рельеф гиперхромной кариолеммы и тенденция к маргинации хроматина. (Рисунок 4.7 а, б).



а



б

Рисунок 4.7 а, б – Ранние апоптотические изменения в отдельных наружных волосковых клетках и фаланговых клетках спирального органа. «Озвучивание». Окраска гематоксилин–эозином. Увеличение: а – в 100 раз, б – 1000 раз.

Покровная мембрана отечна. Отмечается межклеточный отек в зоне фаланговых клеток. Наружные клетки Гензена и клетки Клаудиуса, эпителиоциты, выстилающие спиральный выступ и спиральную связку, слущены, с признаками деструкции, глыбчатого распада, цитолиза и формирования эозинофильных масс в виде шаров (Рисунок 4.8).

Сосудистая полоска несколько отечна, иногда с наложениями мелких эозинофильных шаровидных масс на апикальной поверхности краевых клеток. В сосудах – сладж.

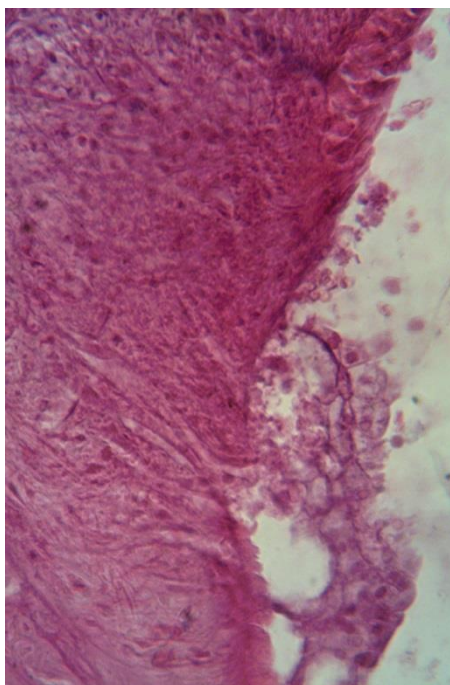


Рисунок 4.8 – Случивание, цитоллиз эпителиоцитов спиральной связки и формирование оксифильных масс в виде шаров. «Озвучивание». Окраска гематоксилин–эозином. Увеличение в 400 раз.

Спиральная связка отечна с очаговым уменьшением клеточности. Отдельные клетки дистрофически изменены. Сосуды расширены, вокруг некоторых – периваскулярный отек (Рисунок 4.9).

Вестибулярная мембрана в некоторых случаях с крошковатыми наложениями со стороны улиткового канала. Просвет последнего и вестибулярной лестницы свободны.

В барабанной лестнице отмечается небольшое скопление форменных элементов крови (кровоизлияние).

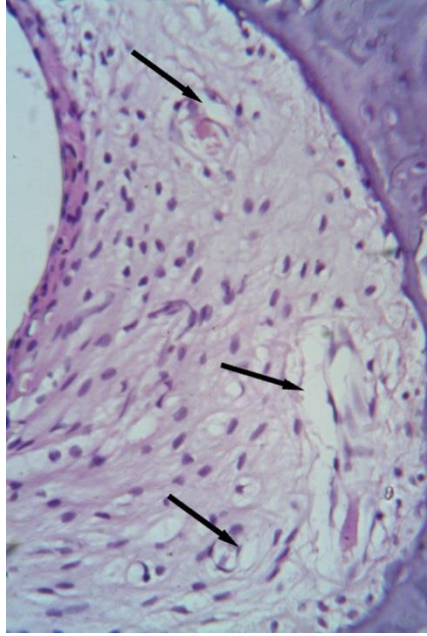


Рисунок 4.9 – Очаговое уменьшение клеточности и периваскулярный отек в спиральной связке. «Озвучивание». Окраска гематоксилин–эозином. Увеличение в 400 раз.

В спиральном ганглии на фоне выраженного перичеселлюлярного отека мутное набухание отдельных нейронов отмечается с гиперхромией ядер или вакуолизацией ядер и цитоплазмы (Рисунок 4.10).

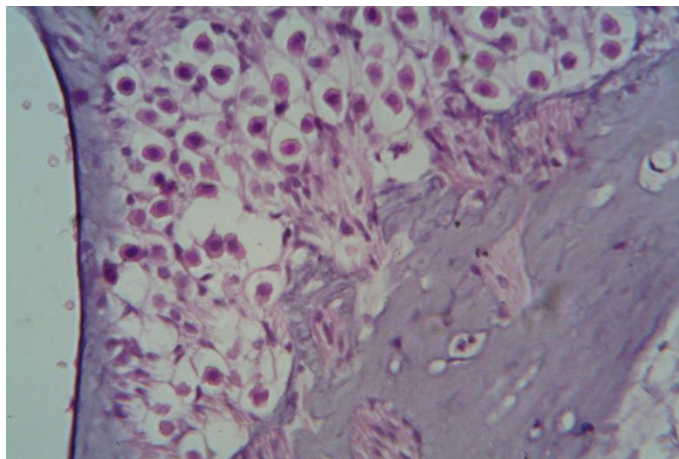


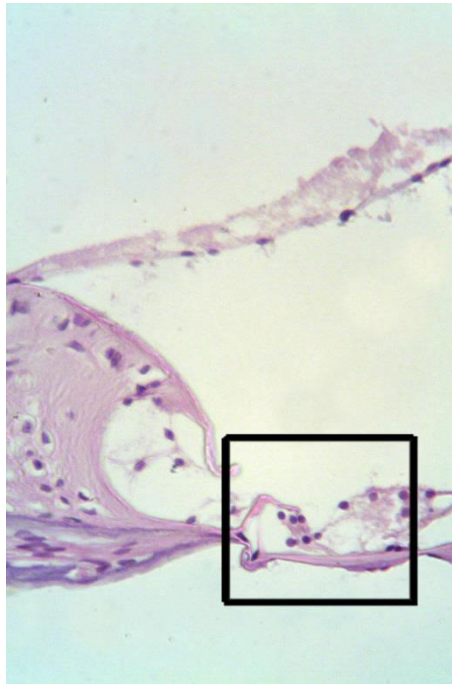
Рисунок 4.10 – Перичеселлюлярный отек, вакуолизация цитоплазмы, гиперхроматоз ядер отдельных нейроцитов спирального ганглия. «Озвучивание». Окраска гематоксилин–эозином. Увеличение в 400 раз.

Отдельные нейроны отличаются пикноморфными или уменьшенными в размере резко гиперхромными ядрами, что следует отнести к проапоптотическим изменениям.

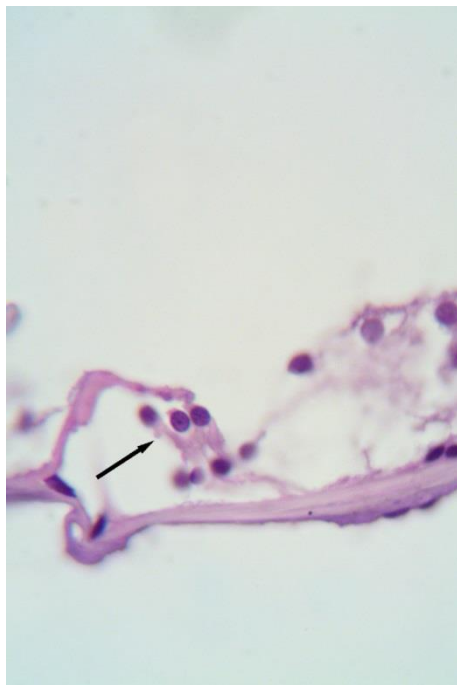
Таким образом, приведенные гистологические исследования во 2 группе экспериментальных животных показали, что звуковая травма сопровождается:

- 1) резко выраженным перицеллюлярным отеком с дистрофическими изменениями, вплоть до апоптоза отдельных нейронов спирального ганглия;
- 2) слущиванием и гибелью (глыбчатый распад и цитолиз) эпителиоцитов спирального выступа, спиральной связки, клеток Клаудиуса с формированием шарообразных эозинофильных структур;
- 3) отеком сосудистой полоски с нарушением микроциркуляции, сладжем, появлением иногда шарообразных масс на ее поверхности;
- 4) очаговым отеком спиральной связки с дистрофическими изменениями отдельных клеток в ней, расширенными сосудами с периваскулярным отеком;
- 5) наличием мелкозернистых масс в вестбулярной лестнице в некоторых случаях и небольшими кровоизлияниями в просвете барабанной лестницы, как результат механической травмы;
- 6) сохранностью волосковых клеток.

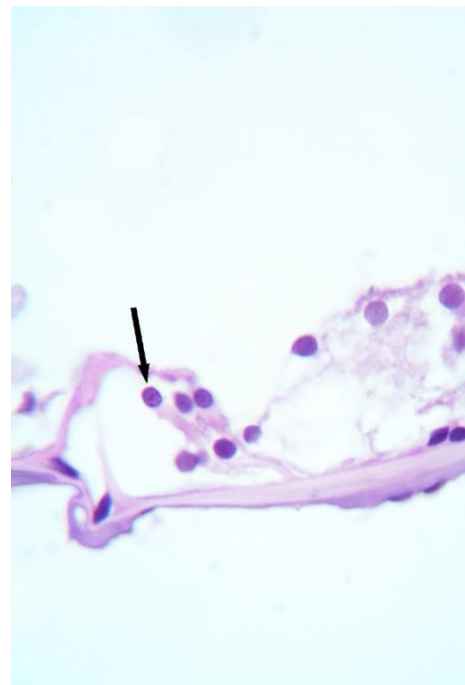
В **группе 3** экспериментальных животных сразу после моделирования СНТ путем озвучивания и стрессирования ВВК и НВК сохранены, но ядра отдельных клеток гиперхромны или отличаются подчеркнутой четкостью несколько утолщенной кариолеммы с признаками маргинации хроматина и блеббингом цитоплазмы (Рисунок 4.11 а, б, в).



а



б



в

Рисунок 4.11 а, б, в – Отдельные наружные волосковые клетки с признаками апоптоза: б – blebbing-феномен, в – маргинация хроматина. «Озвучивание и стресс». Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение: а – в 400 раз, б, в – в 1000 раз.

На уровне дистрофически измененных фаланговых клеток формируется межклеточный отек. Покровная мембрана отечна.

В просвете туннеля определяются нервные волокна (Рисунок 4.12) с нечетким контуром.

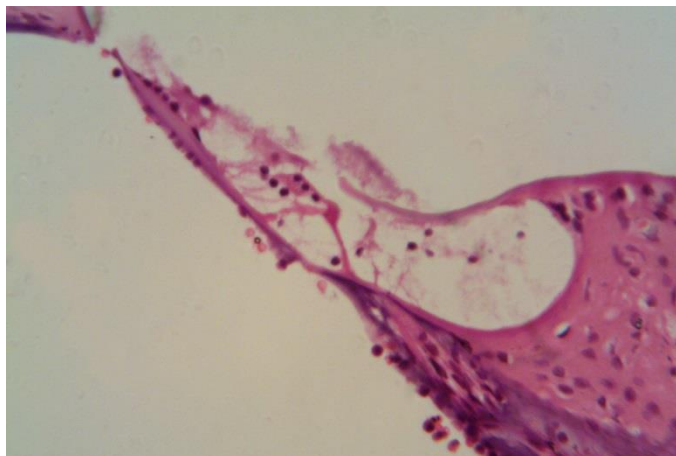


Рисунок 4.12 – Нервные волокна в просвете туннеля. «Озвучивание и стресс». Окраска гематоксилин–эозином. Увеличение в 400 раз.

Наружные пограничные клетки Гензена, наружные поддерживающие клетки Клаудиуса, эпителиоциты спирального выступа и спиральной связки отслоены, в состоянии цитолиза. Спиральная связка резко отечна с очаговым уменьшением клеточности (Рисунок 4.13). Ядра фибробластов спиральной связки дистрофически изменены, набухшие, вакуолизированы. Ближе к костной стенке встречаются одиночные мононуклеарные лейкоциты. Сосуды расширены с резко выраженным периваскулярным отеком и сладжированием крови.

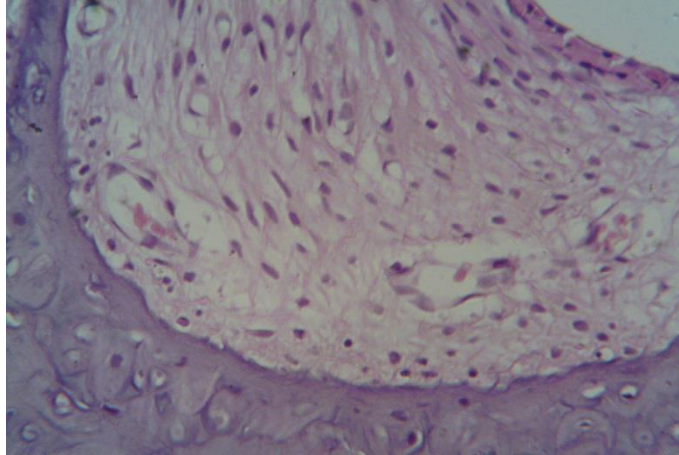


Рисунок 4.13 – Очаговое уменьшение клеточности, отек, периваскулярный отек спиральной связки. Одиночные мононуклеары. «Озвучивание и стресс». Окраска гематоксилин–эозином. Увеличение в 400 раз.

Сосудистая полоска отечна. В сосудах сладж. Вестибулярная мембрана утолщена отечна. В спиральном ганглии резко выражен перицеллюлярный отек (Рисунок 4.14). Нейроциты с признаком мутного набухания. Ядра многих нейронов уменьшены в размере, гиперхромны. В некоторых нервных клетках – вакуолизация ядра и цитоплазмы. Отмечается отек периневрия, признаки деструкции отдельных миелиновых волокон в прилежащих отделах слухового нерва (Рисунок 4.15).

В вестибулярной лестнице иногда определяются сетчатые или гомогенные эозинофильные массы, в улитковом канале редко формируются шаровидные массы возле сосудистой полоски спиральной связки или так же эозинофильные, но сетчатые локализуются возле вестибулярной мембраны.

В барабанной лестнице чаще небольшие скопления форменных элементов крови.

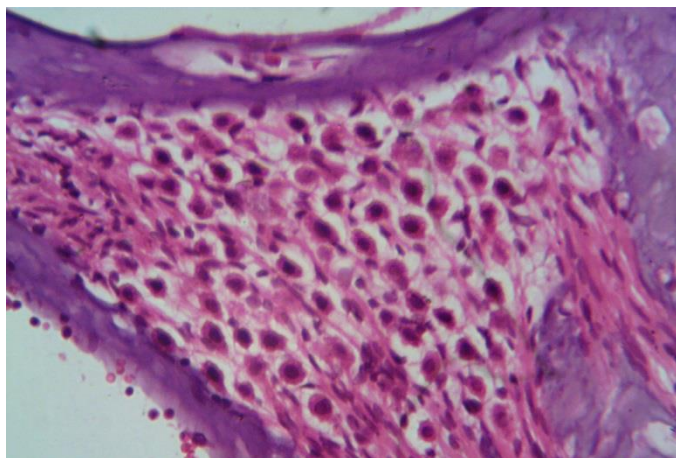


Рисунок 4.14 – Перичеселлюлярный отек, гиперхроматоз ядер нейроцитов спирального ганглия. «Озвучивание и стресс». Окраска гематоксилин–эозином. Увеличение в 400 раз.

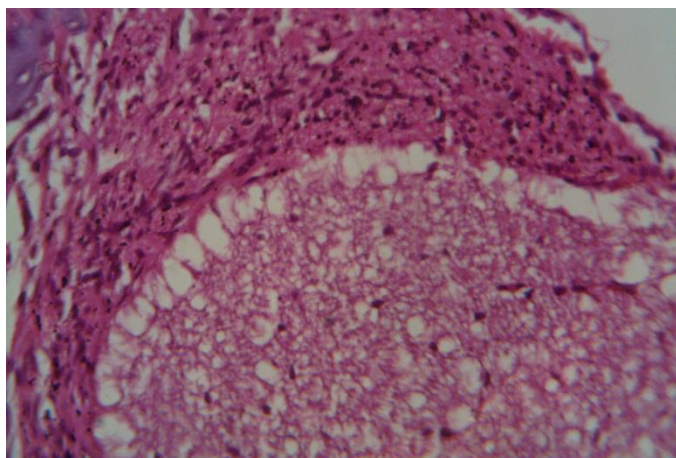


Рисунок 4.15 – Отек периневрия, деструкция отдельных миелиновых волокон слухового нерва. «Озвучивание + стресс». Окраска гематоксилин–эозином. Увеличение в 100 раз.

Таким образом, проведенные гистологические исследования в группе 3 экспериментальных животных с моделированием СНТ путем воздействия шумом («озвучивания») и стрессирования показали нарастание выраженности, распространенности и частоты встречаемости патологических изменений с наличием:

1) микроциркуляторных нарушений (периваскулярные отеки, сладж-синдром);

2) апоптозных проявлений (нейроцитов спирального ганглия и волосковых клеток);

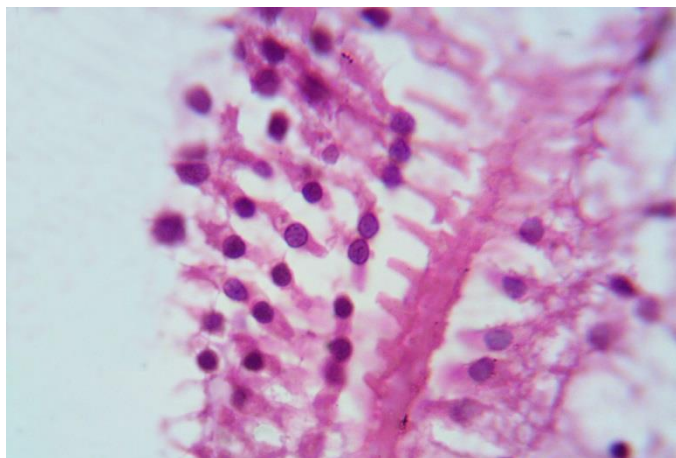
3) дистрофических изменений и очагов отсутствия фибробластов спиральной связки на фоне тотального слущивания и лизиса эпителиоцитов спирального выступа и спиральной связки с появлением пристеночной инфильтрации спиральной связки единичными моноклеарными лейкоцитами.

Особо следует подчеркнуть наличие выраженных дегенеративных изменений нейронов спирального ганглия и отдельных нервных волокон слухового нерва при апоптозоморфных или слабовыраженных апоптотических изменениях волосковых клеток. Эти изменения, с учетом данных о гибели синапсов при СНТ, вероятно, связаны с вторичной транссинаптической нейродегенерацией (дегенерация нервных клеток).

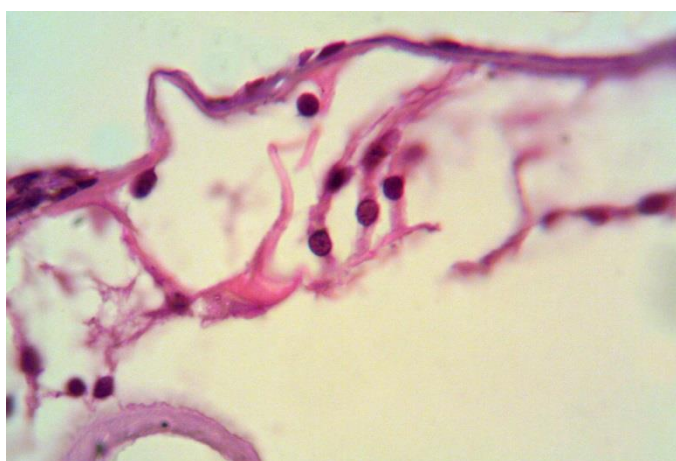
Проведенные гистологические исследования в **группе 4** экспериментальных животных через 2 недели после моделирования СНТ путем «озвучивания» на фоне стрессирования показали, что ВВК чаще не изменены, однако, в некоторых случаях отмечается гиперхроматоз ядер, некоторые НВК отличаются подчеркнутым рельефом кариолеммы с небольшими участками маргинации хроматина (Рисунок 4.16 а, б), но многие имеют четкую структуру ядра хроматина и ядрышка.

Межклеточные пространства на уровне фаланговых клеток расширены, а сами клетки с признаками дистрофических изменений. В просвете туннеля в некоторых случаях определяются небольшие эозинофильные массы и нервные волокна с нечетким контуром.

Покровная мембрана разволокнена, отечна. Опорные клетки Гензена, Клаудиуса, эпителиоциты спирального выступа и спиральной связки слущены, в состоянии лизиса.



а



б

Рисунок 4.16 а, б – Наружные волосковые клетки – неизмененные и с признаками апоптоза. Две недели после воздействия «озвучивание и стресс». Окраска гематоксилин–эозином. Увеличение в 1000 раз.

Сосудистая полоска с признаками отека. Сосуды полнокровны, расширены. В некоторых случаях на апикальной поверхности краевых клеток сосудистой полоски определяются шарообразные или неправильной формы эозинофильные массы. Спиральная связка резко отечна, с выраженным уменьшением клеточности вплоть до отсутствия клеток на значительном протяжении (Рисунок 4.17), но чаще в зоне спиральной вырезки. Сохранившиеся клетки спиральной связки дистрофически изменены с набухшими вакуолизированными, слабо окрашивающимися ядрами (Рисунок 4.18). Сосуды расширены с набухшими,

слабо окрашивающимися ядрами эндотелиоцитов, иногда – с пристеночным стоянием эритроцитов или признаками сладжа, но чаще не содержат («запустевание сосудов»)» или содержат единичные эритроциты.

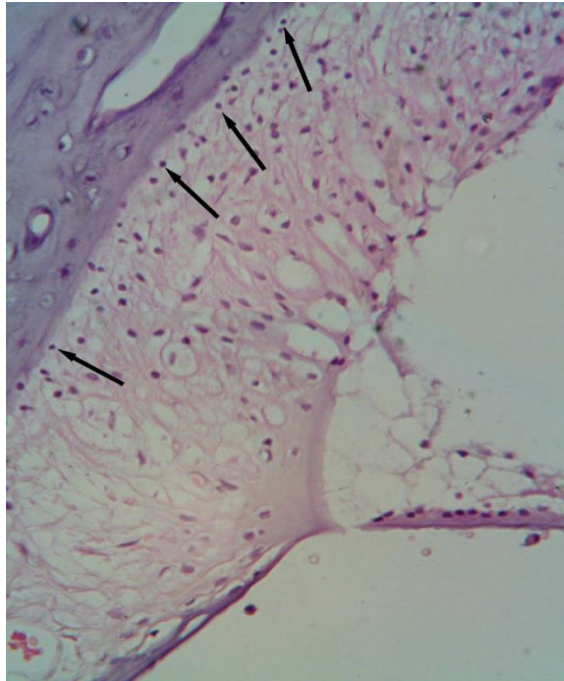


Рисунок 4.17 – Уменьшение клеточности, очагово – отсутствие клеток, дистрофические изменения ядер клеток спиральной связки. Мононуклеарные лейкоциты. 2 недели после воздействия «озвучивание и стресс». Окраска гематоксилин–эозином. Увеличение в 400 раз.

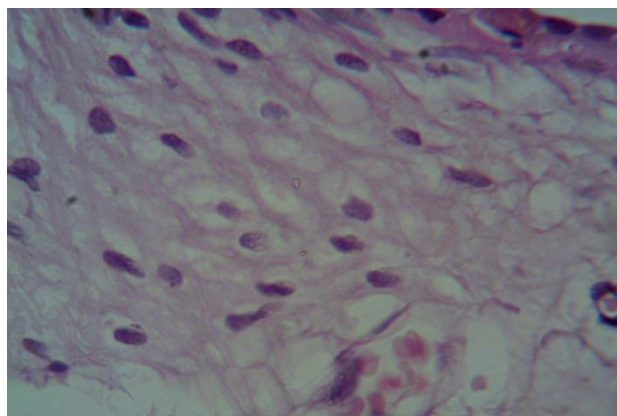


Рисунок 4.18 –Набухшие, дистрофически измененные, вакуолизированные ядра клеток спиральной связки. 2 недели после воздействия «озвучивание и стресс». Окраска гематоксилин–эозином. Увеличение в 1000 раз.

Вестибулярная мембрана очагово истончена, иногда с наложением мелкоглыбчатых эозинофильных масс. Просвет вестибулярной лестницы перепончатого лабиринта и барабанной лестницы свободны, однако в последней на стороне спиральной связки всегда отмечаются небольшие или более выраженные скопления форменных элементов крови (кровоизлияния).

В спиральном ганглии резко выражены дегенеративные изменения. Нейроциты дистрофически изменены, цитоплазма вакуолизирована, имеет нечеткий, извилистый край, признаки цитолиза. Ядра некоторых нейронов уменьшены в размере, резко гиперхромны. Отдельные нейроциты в состоянии выраженного апоптоза. Ядра глиозных клеток светлые с небольшим количеством глыбчатого хроматина, увеличены в размере с подчеркнутым рельефом кариолеммы (реактивные изменения) (Рисунок 4.19). Отходящие от спирального ганглия нервные пучки с признаками отека периневрия и деструкции отдельных миелиновых волокон.

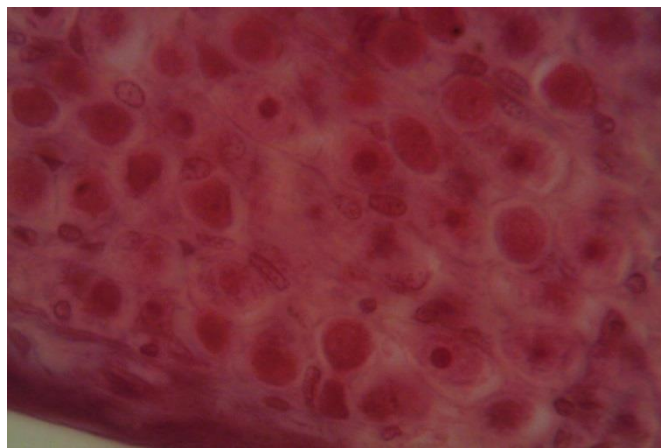


Рисунок 4.19 Гиперхроматоз ядер нейроцитов. Апоптоз. Реактивные изменения глиоцитов. 2 недели после воздействия «озвучивание и стресс». Окраска гематоксилин–эозином. Увеличение в 1000 раз.

Таким образом, проведенные гистологические исследования показали, что моделирование СНТ путем озвучивания на фоне стрессирования экспериментальных животных сопровождается:

- 1) гибелью путем цитолиза эпителиоцитов, выстилающих спиральную связку и наружных опорных клеток;
- 2) тяжелыми дистрофическими изменениями нейроцитов спирального ганглия, апоптозом некоторых из них, реактивными изменениями глии, отечно – дегенеративными изменениями отдельных нервных волокон слухового нерва;
- 3) дистрофическими изменениями клеток спиральной связки, ее отеком, уменьшением клеточности (вне связи с отеком);
- 4) сохранностью большинства ВК, единичные из которых имели ранние признаки апоптоза;
- 5) нарушением реологических свойств крови.

Указанные изменения приводят к нарушению гомеостаза, микроциркуляции, накоплению активных форм кислорода (АФК), развитию окислительного стресса.

Наблюдаемое при этом резкое увеличение кальция на разных уровнях и в разных структурах спирального органа (по нашим и литературным данным) отражает его двойную причинно–следственную значимость, когда он является триггером или следствием при развитии этой патологии.

4.3. Изучение эффективности блокатора кальциевых каналов (нимодипина) в профилактике и лечении сенсоневральной тугоухости в эксперименте

В группе 5 экспериментальных животных с моделированием СНТ путем «озвучивания» на фоне стрессирования и одновременном применении блокатора кальциевых каналов (БКК) нимодипина при гистологическом исследовании ВВК

и большинство НВК (Рисунок 4.20) не изменены. В отдельных НВК клетках отмечается тенденция к маргинации хроматина, иногда подчеркнутый рельеф кариолеммы. Покровная мембрана не изменена. Фаланговые клетки сохранены, в одном случае – с признаками нерезко выраженного межклеточного отека. В просвете туннеля определяются нервные волокна. Опорные клетки – внутренние и наружные (Гензена) пограничные клетки, наружные поддерживающие клетки Клаудиуса имеют типичное строение.

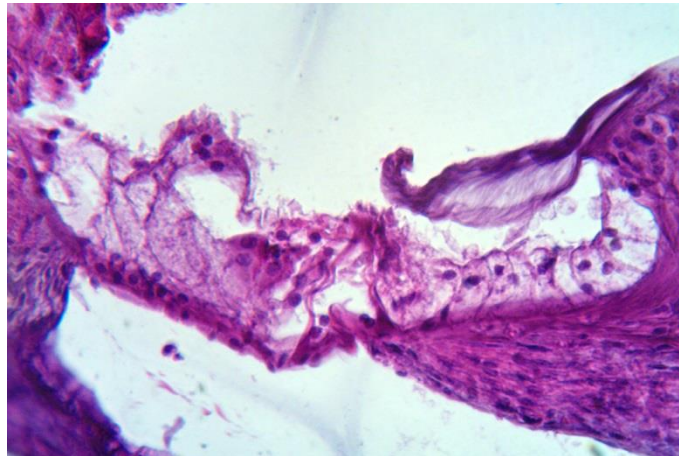


Рисунок 4.20 – Сохранность клеток спирального органа. «Озвучивание и стресс» и одновременное применение блокаторов кальциевых каналов. Окраска гематоксилин–эозином. Увеличение в 100 раз.

Эпителиоциты, выстилающие спиральный выступ и спиральную связку с признаками дистрофических изменений, очагово слущены, некоторые лизированы (Рисунок 4.21).

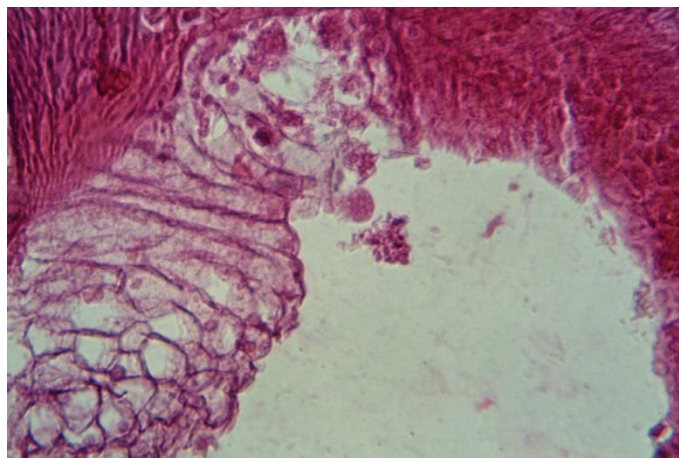


Рисунок 4.21 – Цитолиз эпителиоцитов спиральной связки с формированием оксифильных шаровидных масс. «Озвучивание и стресс» и

одновременное применение блокаторов кальциевых каналов. Окраска гематоксилин–эозином. Увеличение в 400 раз.

В сосудистой полоске сосуды расширены. Спиральная связка очагово отечна, отличается слабовыраженными дистрофическими изменениями отдельных фибробластов. Просвет перепончатого канала, вестибулярной лестницы свободен, в барабанной лестнице – небольшое количество форменных элементов крови.

В спиральном ганглии определяется небольшой перицеллюлярный отек, вакуолизация цитоплазмы и ядер отдельных нейронов. Редко встречаются нервные клетки с гиперхромными ядрами. Однако большинство нейроцитов характеризуются наличием типичных для нервной ткани светлых ядер с глыбками хроматина и 1 – 2 ядрышками (Рисунок 4.22).

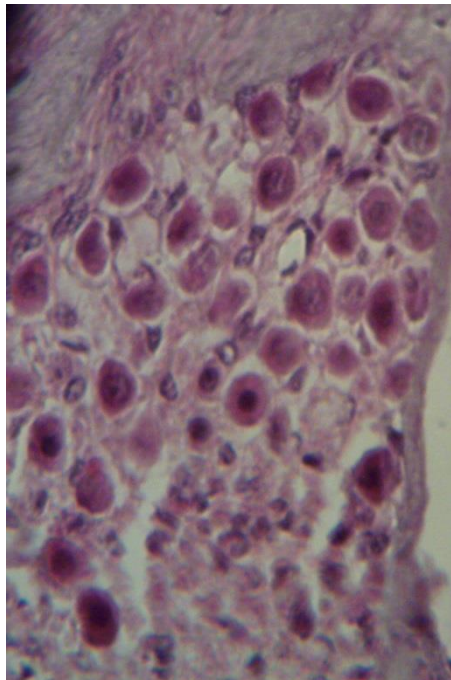


Рисунок 4.22 – Нейроциты спирального ганглия с типичными светлыми и измененными гиперхромными ядрами. «Озвучивание и стресс» и одновременное

применение блокаторов кальциевых каналов. Окраска гематоксилин–эозином. Увеличение в 400 раз.

Таким образом, проведенные гистологические исследования показали, что одновременное с моделированием СНТ использование нимодипина существенно снижает выраженность патологических изменений в органе слуха. На первый план выступает состояние спирального ганглия, в котором отмечается слабовыраженный перицеллюлярный отек и дистрофические изменения отдельных нейроцитов, а так же деструкция эпителиоцитов спиральной связки и спирального выступа с формированием разнокалиберных шарообразных эозинофильных масс и их частичным лизисом при удовлетворительной сохранности прочих компонентов органов слуха.

Эти изменения отражают:

1) патогенетическую и первоочередную значимость состояния спирального ганглия и зоны спиральной связки, их большую уязвимость при развитии СНТ;

2) профилактический эффект нимодипина, который, блокируя кальциевые каналы, уменьшает, или предотвращает гибель (повреждение) соответствующих структур органа слуха, выступая в роли протектора. В связи с этим следует особо подчеркнуть выраженное уменьшение количества апоптозноизмененных нейроцитов в спиральном ганглии и преобладание в последнем нервных клеток с типичным светлым ядром, с хорошо выраженными глыбками хроматина и ядрышками.

В **группе 6** экспериментальных животных после завершения моделирования СНТ путем озвучивания на фоне стрессирования проводили «отсроченное» лечение нимодипином: при гистологических исследованиях ВВК и большинство НВК не изменены. Однако в некоторых НВК редко определяется некоторая гиперхромность или тенденция к маргинации хроматина и подчеркнутая четкость кариолеммы отдельных клеток, что относится к ранним апоптотическим изменениям (Рисунок 4.23). Фаланговые внутренние пограничные клетки,

покровная мембрана не изменены. Наружные пограничные клетки Гензена, наружные поддерживающие клетки Клаудиуса в некоторых случаях дистрофически изменены, иногда с признаками цитолиза. Эпителий спирального выступа и спиральной связки отслоен, некоторые клетки лизированы. (Рисунок 4.24).

Спиральная связка очагово отечна, с очаговым уменьшением клеточности не связанным с отеком. Некоторые фибробласты спиральной связки дистрофически изменены. Периваскулярный отек слабо выражен. Сосудистая полоска с признаками слабовыраженного межклеточного отека. Сосуды полнокровны. Вестибулярная мембрана не изменена.

В спиральном ганглии при неравномерно выраженном перицеллюлярном отеке одни нейроны имеют обычное строение (Рисунок 4.25), другие – их небольшое количество – дистрофически изменены, с гиперхромными ядрами, вакуолизированной цитоплазмой. На фоне этих ранних апоптозоморфных (с возможностью обратного развития) патологических изменений отдельные нейроны находятся в состоянии выраженного апоптоза.

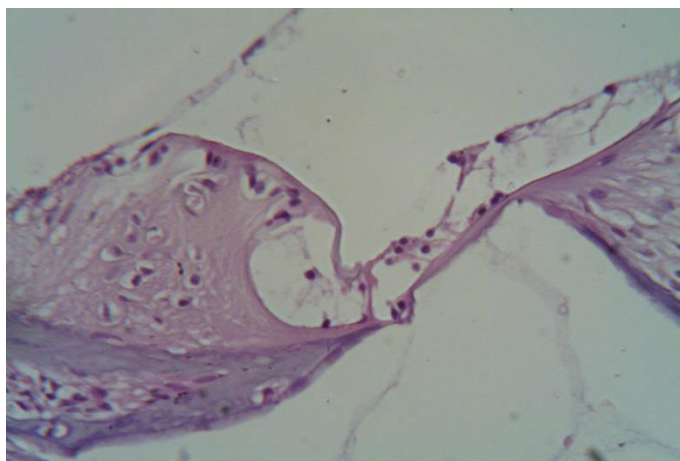


Рисунок 4.23 – Дистрофические изменения клеток спирального органа. «Озвучивание и стресс» и отсроченное применение блокаторов кальциевых каналов. Окраска гематоксилин–эозином. Увеличение в 1000 раз.

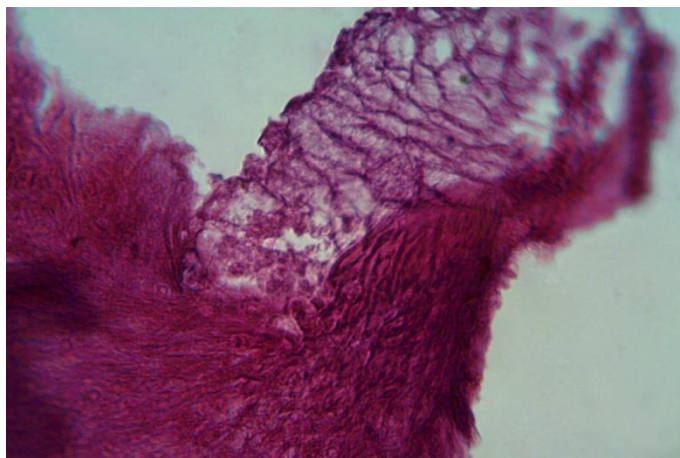


Рисунок 4.24 – Цитоллиз эпителиоцитов спиральной связки. «Озвучивание и стресс» и отсроченное применение блокаторов кальциевых каналов. Окраска гематоксилин–эозином. Увеличение в 400 раз.

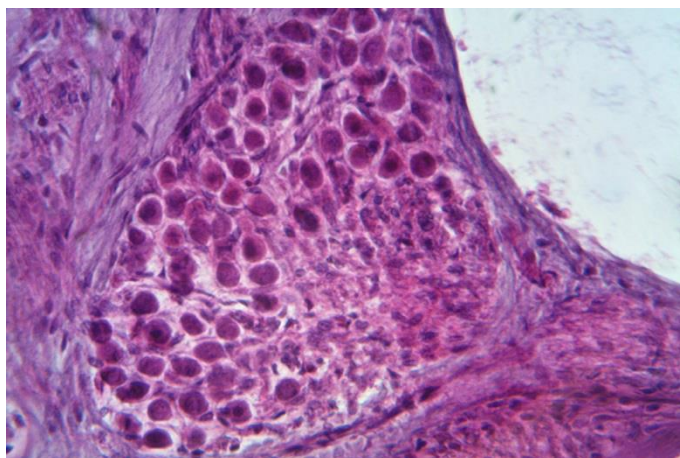


Рисунок 4.25 – Светлые и гидрохромные ядра нейроцитов. «Озвучивание + стресс» отсроченное применение блокаторов кальциевых каналов. Окраска гематоксилин–эозином. Увеличение в 400 раз.

В вестибулярной лестнице иногда определяются небольшие скопления сетчатых эозинофильных масс, а в барабанной лестнице – единичные эритроциты. Просвет улиткового канала свободен.

Таким образом, проведенные гистологические исследования показали, что отсроченное лечение нимодипином тугоухости, вызванной стрессированием и

озвучиванием крыс, оказывает лечебное воздействие и уменьшает выраженность некоторых гистологических изменений.

При этом отмечается:

- 1) выраженное уменьшение отеков, как показатель улучшения микроциркуляции и снижения гипоксии;
- 2) редко встречаемые слабовыраженные начальные признаки апоптоза НВК с возможностью обратного развития.
- 3) реже встречающийся апоптоз отдельных нейроцитов в спиральном ганглии (в сравнении с 2, 3, 6 группами);
- 4) с уменьшением дистрофических изменений нормализация морфофункционального состояния опорных, поддерживающих клеток и фибробластов спиральной связки;
- 5) выраженный цитолиз эпителиоцитов спирального выступа и спиральной связки в зоне наружной спиральной вырезки не исключает «жертвенность» этих клеток с целью стабилизации гомеостаза.

Электронный микроэлементный анализ. У 9 животных из группы «модель тугоухости» – 9 улиток, и у животных после одновременного лечения во время эксперимента нимодипином – 9 улиток, а так же 8 улиток от крыс контрольной группы, выделенных после декапитации методом «прижизненной изоляции», под контролем сканирующей электронной микроскопии исследовали элементный состав волосковых клеток. Полученные результаты представлены в таблице 4.2.

Таблица 4.2 - Содержание микроэлементов в улитке (масс%) у экспериментальных животных в различных сериях

Элементы	1 серия «модель тугоухости»	2 серия «раннее лечение» на «модели тугоухости»	3 серия (контроль)
Na	5,93±0,28	5,37±0,24	5,51±0,35
P	24,63±3,19*	27,39±3,72*	15,74±1,28
S	16,98±1,39*	5,52±0,95°	7,09±1,46
Cl	2,08±0,27*	0,31±0,01°	0,58±0,02
K	1,66±0,38	0,85±0,05°	1,29±0,3
Ca	59,62±2,48*	51,22±2,05*	47,76±3,75

Примечание: * - достоверные отличия по сравнению с контрольной группой при $p < 0,05$;

° - достоверные отличия по сравнению со 1-й серией при $p < 0,05$.

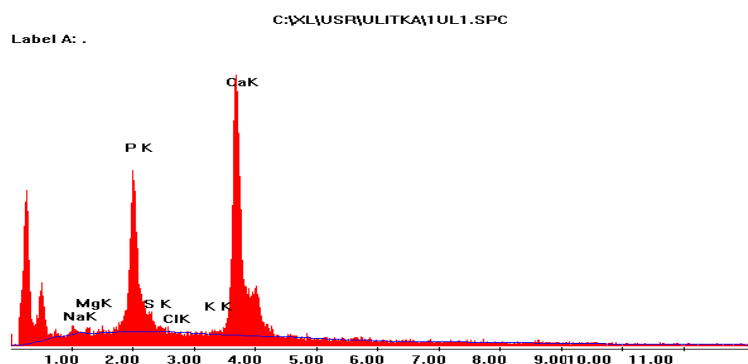


Рисунок 4.26 – Микроэлементный состав клеток спирального органа «модель тугоухости» до лечения

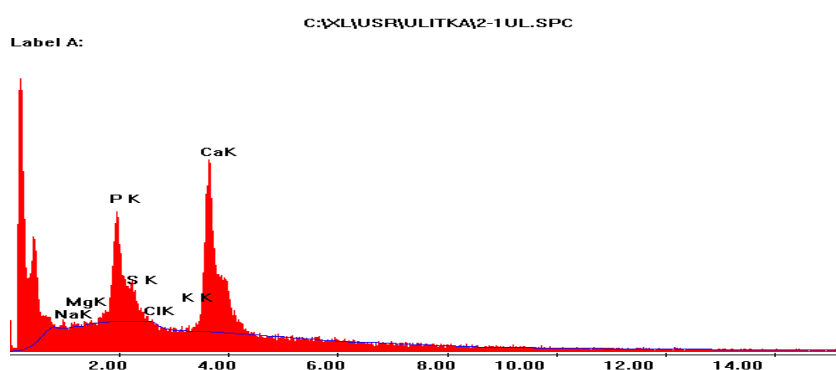


Рисунок 4.27. Микроэлементный состав клеток спирального органа «модель тугоухости» после лечения

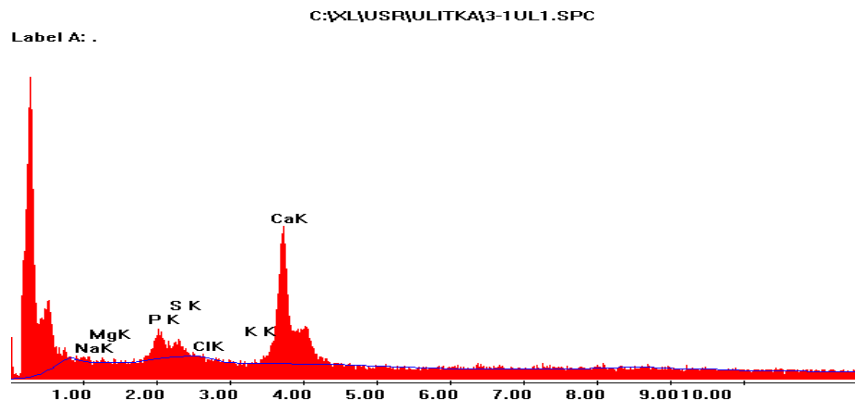


Рисунок 4.28. Микроэлементный состав клеток спирального органа контрольной группы крыс

Отмечены сдвиги в элементном составе клеток спирального органа в группе крыс «модель тугоухости» по сравнению с контролем, так, в частности, имеет место повышение доли кальция в составе нейроэпителиальных клеток. В группе животных, получавших «раннее лечение» БКК – нимодипином, имеется тенденция к уменьшению доли кальция, приближающейся к контрольному показателю, что можно считать обоснованием назначения БКК.

РЕЗЮМЕ. Проведенные гистологические исследования органа слуха показали:

1. «Озвучивание» животных (90 дБ по 2 часа в день в течение 7 суток) вызывает выраженные патологические изменения в органе слуха (НВК, спиральной связке и др., но особенно в спиральном ганглии), которые сочетаются с положительными функциональными пробами на тугоухость и, следовательно, документируют возможность моделирования СНТ указанным способом при таких параметрах.
2. Эти изменения усиливаются сразу после «озвучивания» на фоне стрессирования животных и ещё более в отдаленные (2 недели) сроки после окончания воздействия после моделирования СНТ, отражая динамику прогрессирующих патологических изменений в спиральном органе. При этом более тяжелые изменения отмечаются в спиральном ганглии при выраженном перицеллюлярном отеке и апоптозе нейроцитов. Патология НВК чаще соответствует ранним стадиям

апоптоза (маргинация хроматина, подчеркнутый рельеф кариолеммы, реже гиперхромность ядра). В сосудистой полоске, спиральной связки, спиральном ганглии отмечаются признаки нарушения микроциркуляции (сладж, отек, изменение просвета сосудов). Свой вклад в изменение состояния спирального органа вносят лизирующие наружные поддерживающие (Гензена) и пограничные (Клаудиуса) клетки, и эпителиоциты спирального выступа и спиральной связки.

Анализ полученных результатов позволяет особо подчеркнуть:

- более тяжелое (при данных условиях моделирования) повреждение нейроцитов спирального ганглия при удовлетворительной сохранности НВК с элементами раннего апоптоза;
 - выраженные изменения клеточного и сосудистого компонентов спиральной связки (сладж, гибель фибробластов, моноклеарная реакция в поздние сроки);
 - чрезвычайную реактивность эпителиоцитов спиральной связки в ранние и поздние сроки при всех условиях эксперимента с их деструкцией и формированием лизирующихся шаровидных эозинофильных масс.
3. Применение лабораторным животным блокатора кальциевых каналов нимодипина одновременно с моделированием СНТ резко уменьшает выраженность описанных патогистологических признаков СНТ (улучшается микроциркуляция, уменьшаются отек, дистрофические изменения, выраженность апоптоза), что свидетельствует о протективных свойствах нимодипина при СНТ и о возможности его использования в качестве профилактического средства.
 4. В результате применения нимодипина лабораторным животным после завершения моделирования СНТ указанным способом уменьшается выраженность гистологических признаков повреждения спирального органа, улучшается микроциркуляция, несколько нормализуются

морфофункциональные показатели нейроцитов, НВК, фибробластов, спиральной связки, наружных поддерживающих (Гензена) и пограничных (Клаудиуса) клеток, что также отражает протективные свойства нимодипина и возможность его использования при лечении СНТ.

5. При электронном микроэлементном анализе выявлены сдвиги в элементном составе клеток спирального органа в группе крыс «модель тугоухости» по сравнению с контролем в виде повышения доли кальция в составе нейроэпителиальных клеток и снижение его в результате проведенного лечения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Регуляция обмена кальция и его метаболизм в организме человека и животных сложный, многогранный процесс с вовлечением различных органов и систем, тонкости взаимодействия между которыми не до конца изучены. Современные данные свидетельствуют о том, что полноценное функционирование внутреннего уха связано с работой потенциал-зависимых кальциевых каналов, которые присутствуют в опорных, волосковых клетках спирального органа, спиральной связке, нейронах спирального ганглия.

Многолетние наблюдения и анализ материалов, полученных при обследовании больных с сенсоневральной тугоухостью (СНТ) на кафедре болезней уха, горла носа ФГБОУ ВО РостГМУ МЗ РФ с клинической базой в оториноларингологических отделениях МБУЗ «Городская больница им. Н.А. Семашко» г. Ростова-на-Дону, свидетельствуют о неуклонном росте числа больных со сниженным слухом: от 4,14% больных с СНТ от общего числа госпитализированных в ЛОР стационар в 1994 г. [40] до 6,4–6,9% в 2014–2015 годах, с пиковым значением 7,3% в 2010 г. – по результатам анализа, проведенного нами, за последнее десятилетие. У многих больных с СНТ имело место нарушение показателей минерального обмена [43].

Поскольку кальций играет важнейшую роль в многочисленных биохимических реакциях в организме человека, процессах передачи нервного импульса, участвует в каскаде реакций запуска клеточной гибели, как некроза, так и апоптоза, и других процессов, нами было проведено клиническое исследование по изучению кальциевого метаболизма у больных с сенсоневральной тугоухостью. Обследовано 175 больных с сенсоневральной тугоухостью в возрасте от 18 до 55 лет, 52 мужчины и 123 женщины, из них – 80 с острой и 95 – с хронической формой заболевания. При аудиометрическом исследовании подтверждено нарушение звуковосприятия у всех обследованных больных от I

до IV степени тугоухости по Международной классификации тугоухости и тимпанограмма «тип А» при тимпанометрии.

Нарушения минерального обмена по состоянию минеральной плотности костной ткани (МПКТ) определяли методом остеоденситометрии на костном рентгеновском денситометре DTX-200. Выявлено, что при хронической СНТ и при повышении степени тугоухости число нарушений МПКТ, соответствующих по T-критерию остеопатиям (вплоть до остеопении и остеопороза), возрастало, что свидетельствует в пользу патологического ремоделирования костной ткани. Так, при III степени тугоухости доля больных с нормальными показателями денситометрии составила 16% случаев, с остеопенией – половину (48%), а при 4 степени и глухоте, доля нарушений, соответствующих остеопатиям, составила 93,75% случаев. Длительное течение заболевания и повышение степени СНТ было сопряжено с повышением доли больных с остеопатиями, что подтверждало нарушения кальциевого обмена.

Эти нарушения были подтверждены и при лабораторных исследованиях сыворотки крови у больных с СНТ. Так, при тугоухости, вне зависимости от стадии и степени заболевания, наблюдаются незначительные колебания показателей уровня общего и ионизированного кальция, фосфора в сыворотке крови, при этом регуляторы кальциевого обмена изменяются в большей степени. При более детальном рассмотрении в подгруппах выявлены отличия в показателях. Так, при хронической СНТ отличительной особенностью явилось повышение уровня костной щелочной фосфатазы ($p < 0,05$) в отличие от острой формы заболевания, свидетельствующее об активации костного метаболизма. При I степени СНТ наблюдалось повышение ($p < 0,05$) концентрации кальцитонина, остеокальцина и костной щелочной фосфатазы, что отражает интенсивно протекающие процессы остеобразования как компенсаторную реакцию организма в начале заболевания. С повышением степени тугоухости повышался маркер остеорезорбции β Cross-Laps.

Таким образом, к предикторам развития тугоухости высокой степени можно отнести снижение минеральной плотности костной ткани с повышением костного метаболизма, которые позволяют индивидуализировать отологический риск в отношении развития СНТ. Кроме того, эти признаки позволяют прогнозировать прогрессирующее течение СНТ, что имеет значение в определении показаний к профилактической терапии тугоухости.

Анализ результатов исследования, проведенный по критерию Манна Уитни с $p < 0,05$, позволил определить статистически достоверные значения величин показателей Т-критерия и кальциевого обмена в сыворотке крови больных с прогрессирующим течением СНТ. Таким образом, на основании проведенных исследований был сделан вывод о том, что учёт значений, показателей кальциевого обмена позволяет с высокой достоверностью прогнозировать прогрессирующее течение СНТ.

Как известно, транспорт ионов кальция в клетку происходит через специальные каналы – макромолекулярные белки (L, T, N, P, Q, R), содержащие специфические участки (рецепторы), распознающие ионы. Ионы кальция удаляются из клетки с помощью кальций–натриевого ко–транспортера [25]. По данным К.Н. Мельникова [66] концентрация ионов кальция в клетках регулируется саркоплазматической и сарколеммной Ca^{2+} –АТФ–азой, митохондриальным унипортом Ca^{2+} . Кальций–транспортная АТФ–аза поддерживает низкую концентрацию этих ионов в клетке (10^{-7}) по сравнению с окружающей средой и внутриклеточным депо – пузырьками саркоплазматического ретикулума ($3 \cdot 10^{-3}$). Перенос ионов кальция через мембрану может быть обусловлен градиентом концентраций и активным транспортом с затратами энергии: N– и P/Q–типы кальциевых каналов активируются высокоамплитудным потенциалом действия, располагаются на пресинаптической терминали, играют роль в модуляции высвобождения медиаторов в синаптическую щель [66]. Такие процессы происходят во всех клетках организма человека, а, следовательно, и во внутреннем ухе.

Наши данные об изменении кальциевого метаболизма у больных с сенсоневральной тугоухостью, а также данные из литературных источников о роли кальциевых каналов и кальций–зависимых K–Na каналов в жизнедеятельности клеток головного мозга и участии ионов кальция в процессах возбуждения мембран нейронов и последующих внутриклеточных молекулярных каскадах [79,115] позволили предположить возможное положительное влияние препаратов блокаторов кальциевых каналов на функцию улитки, что потребовало клинического и экспериментального подтверждения.

Наш выбор дизайна исследования по моделированию тугоухости и применению препаратов из группы блокаторов кальциевых каналов базировался на нескольких основополагающих исследованиях, преимущественно зарубежных авторов: J. Maurer [149] о меньшей степени потери слуха в экспериментальных группах животных, получавших дилтиазем, и подвергнутых шуму в 90 дБ, W.Mann [148], который при морфометрическом анализе улиток морских свинок показал менее выраженные повреждения внутренних и наружных волосковых клеток у тех животных, которые получали препараты антагонистов кальция до акутравмы и в ранний посттравматический период, предполагая, что влияние препаратов распространяется именно на клеточную мембрану сенсорных клеток и на кохлеарную сосудистую сеть, H.Shen [157], доказавшего иммуноцитохимическими методами прямое протективное действие блокаторов кальциевых каналов T–типа – trimethadione и ethosuximide на наружные волосковые клетки спирального органа мышей в эксперименте, Bracco D., Chiolerio R. [115], показавших, что нимодипин хорошо проникает через гематоэнцефалический барьер, имеет высокое сродство с рецепторами кальциевых каналов нервных клеток, препятствует развитию клеточного апоптоза. Описанные преимущества и эффекты нимодипина позволили предполагать его эффективность при лечении СНТ.

Результаты наших клинических наблюдений, свидетельствующие о нарушении кальциевого метаболизма по данным остеоденситометрии, о

дисбалансе уровня кальция и его регуляторов в сыворотке крови больных с СНТ и, в тоже время, неоднозначные данные различных авторов о действии блокаторов кальциевых каналов [82, 157] при патологии внутреннего уха вызвали необходимость уточнения их эффективности при сенсоневральной тугоухости в условиях эксперимента на животных.

В эксперименте участвовало 42 белых беспородных крысы. В процессе исследования был разработан новый «Способ моделирования сенсоневральной тугоухости» (Патент РФ №2627155, 2017) на основе акустического воздействия на белых беспородных крыс («озвучивания») на фоне иммобилизационного стрессирования животных. Эффективность модели подтверждали исследованием слуха у животных по оценке рефлекса Прейера и по результатам исследования отоакустической эмиссии, а также по данным морфологических исследований структур внутреннего уха после забоя животных по окончании эксперимента.

Проведенные гистологические исследования показали, что моделирование СНТ путем «озвучивания» на фоне иммобилизационного стрессирования экспериментальных животных сопровождается: 1) гибелью путем цитолиза эпителиоцитов, выстилающих спиральную связку и наружных опорных клеток; 2) тяжелыми дистрофическими изменениями нейроцитов спирального ганглия, апоптозом некоторых из них, реактивными изменениями глии, отечно – дегенеративными изменениями отдельных нервных волокон слухового нерва; 3) дистрофическими изменениями клеток спиральной связки, ее отеком, уменьшением клеточности; 4) сохранностью большинства волосковых клеток, единичные из которых имели ранние признаки апоптоза; 5) нарушением реологических свойств крови.

Таким образом, проведенные гистологические исследования органа слуха показали что «озвучивание» животных (интенсивность 90 дБ по 2 часа в день, ежедневно, в течение 14 суток) вызывает выраженные патологические изменения в органе слуха – в наружных волосковых клетках, спиральной связке, но особенно в спиральном ганглии, которые соотносятся с результатами

прижизненных функциональных проб, свидетельствующих о тугоухости и, следовательно, документируют возможность моделирования СНТ указанным способом при таких параметрах.

Анализ полученных результатов позволяет особо подчеркнуть: 1) более тяжелое (при данных условиях моделирования) повреждение нейроцитов спирального ганглия, при удовлетворительной сохранности (с элементами раннего апоптоза) наружных волосковых клеток; 2) выраженные изменения клеточного и сосудистого компонентов спиральной связки в виде сладжа эритроцитов, гибели фибробластов, моноклеарной реакции в поздние сроки; 3) чрезвычайную реактивность эпителиоцитов спиральной связки в ранние и поздние сроки при всех условиях эксперимента с деструкцией их и формированием лизирующихся шаровидных эозинофильных масс.

Эти изменения регистрируются сразу после двухнедельного «озвучивания» на фоне стрессирования животных и усиливаются в отдаленные (через 2 недели) сроки после моделирования СНТ, отражая динамику прогрессирующих патологических изменений в спиральном органе. Более тяжелые изменения отмечаются в спиральном ганглии в виде выраженного перичеселлюлярного отека и апоптоза нейроцитов. Патология наружных волосковых клеток чаще соответствует ранним стадиям апоптоза.

Наблюдаемое при этом увеличение доли кальция на разных уровнях и в разных структурах спирального органа по нашим и литературным данным [40,41] отражает неоднозначность его действия, когда он является триггером или следствием при развитии патологии внутреннего уха.

Группу животных, участвующих в эксперименте, подвергали действию блокатора кальциевых каналов нимодипина (нимотоп), обладающего свойством проникать через гематоэнцефалический барьер и оказывать действие на метаболические и сосудистые процессы в головном мозге [115]. Нимодипин препятствует поступлению ионов кальция внутрь клеток через медленные кальциевые каналы в начале фазы реполяризации клеточной мембраны [56, 150],

оказывая влияние на процессы апоптоза [115]. В результате эксперимента с последующим изучением гистологических препаратов выявлено, что *одновременное* с моделированием СНТ использование нимодипина существенно снижает выраженность патологических изменений в органе слуха, причем на первый план выступает состояние спирального ганглия, в котором отмечается слабо выраженный перичеселлюлярный отек и дистрофические изменения отдельных нейроцитов, а так же деструкция эпителиоцитов спиральной связки и спирального выступа с формированием разнокалиберных шарообразных эозинофильных масс и их частичным лизисом при удовлетворительной сохранности прочих компонентов органов слуха. Эти изменения отражают: 1) патогенетическую и первоочередную значимость состояния спирального ганглия и зоны спиральной связки, их большую уязвимость при развитии СНТ; 2) профилактический эффект нимодипина, который, блокируя кальциевые каналы, уменьшает, или предотвращает гибель или повреждение соответствующих структур органа слуха, выступая в роли протектора. В связи с этим следует особо подчеркнуть выраженное уменьшение на фоне одновременного применения нимодипина количества апоптозно измененных нейроцитов в спиральном ганглии и преобладание в последнем нервных клеток с типичным светлым ядром, с хорошо выраженными глыбками хроматина и ядрышками.

Кроме того, на другой группе животных показано, что *отсроченное* лечение нимодипином СНТ, вызванной стрессированием и озвучиванием крыс, оказывает не столь выраженное положительное воздействие, но всё же уменьшает интенсивность некоторых гистологических признаков повреждения спирального органа, определяемых при световой микроскопии, улучшается микроциркуляция, несколько нормализуются морфофункциональные показатели нейроцитов, наружных волосковых клеток, наружных поддерживающих и пограничных клеток. Выраженный цитолиз эпителиоцитов спирального выступа и спиральной связки в зоне наружной спиральной вырезки не исключает «жертвенность» этих клеток с целью стабилизации гомеостаза. Указанные изменения также отражают

протективные свойства нимодипина и возможность его использования при лечении ранних форм СНТ.

Гистологические исследования, проведенные нами с визуальной оценкой серийных срезов методом световой микроскопии, дополнялись специальным изучением 18 улиток внутреннего уха подопытных крыс (12 улиток из группы «модель СНТ», 6 – после «одновременного» с моделированием лечения нимодипином) и 6 – интактных (контроль), выделенных после декапитации животных и «изолированных» по Я.А.Винникову и Л.К. Титовой [14, 40]. Под контролем сканирующей электронной микроскопии с помощью рентгеноспектрального метода исследовали элементный спектр и значения весовых процентов элементов (масс%) (доли натрия, фосфора, серы, хлора, калия, кальция) наружных волосковых клеток. Отмечены сдвиги в элементном составе клеток спирального органа в группе крыс с СНТ – «модель тугоухости» по сравнению с контролем. Но особую значимость в настоящем исследовании имели данные о достоверном повышении доли кальция (масс%) в составе нейроэпителиальных клеток спирального органа крыс с СНТ ($p < 0,05$) относительно контроля. В группе животных, получавших «одновременное» лечение блокатором кальциевых каналов нимодипином, выявлено достоверное уменьшение доли кальция ($p < 0,05$) относительно группы животных со сниженным слухом – «модель СНТ», приближающейся к контрольному показателю, что можно отнести к факторам, предотвращающим повреждение или гибель клетки и ещё одним из обоснований для назначения нимодипина при СНТ.

Таким образом, роль обмена кальция в патогенезе поражения внутреннего уха сложна и многогранна, как по данным отечественных и зарубежных источников, так и по данным настоящего исследования. Нарушения метаболизма кальция могут приводить к различным патологическим состояниям слухового анализатора. Полученные нами в эксперименте на животных данные позволили обосновать использование блокатора кальциевых каналов нимодипина (нимотоп) в клинической практике у больных, страдающих сенсоневральной тугоухостью.

Эти результаты согласуются с рекомендациями зарубежных учёных, которые на основании многочисленных клинических наблюдений больных с СНТ пришли к выводу, что блокаторы кальциевых каналов должны быть включены в схему лечения, особенно в тех случаях, когда наиболее вероятен сосудистый генез заболевания, а так же при идиопатической СНТ [112, 152]. В результате нами разработаны практические рекомендации для врачей, обосновывающие назначение данной группы препаратов с определением показаний введения нимодипина при сенсоневральной тугоухости.

Приведенные собственные данные клинического и экспериментального исследований свидетельствуют о нарушении метаболизма кальция у больных с СНТ и его важной роли в патогенезе заболевания, о тонких структурных изменениях во внутреннем ухе при экспериментальной СНТ у животных, включая дисбаланс кальция в клетках спирального органа, апоптоз различных клеточных структур, но в большей степени – нарушения клеток спирального ганглия, вплоть до гибели. Кроме того, подтверждены особые свойства блокаторов кальциевых каналов, в частности нимодипина, благоприятное действие которого продемонстрировано при патологии внутреннего уха и явилось обоснованием для рекомендаций его использования в лечении больных, страдающих сенсоневральной тугоухостью.

ВЫВОДЫ

1. К предикторам развития прогрессирующего течения сенсоневральной тугоухости относится снижение минеральной плотности костной ткани с относительно стабильными показателями кальциевого метаболизма в сыворотке крови, что подтверждается сравнительным анализом показателей.
2. Акустическое воздействие на фоне иммобилизационного стресса вызывает в эксперименте развитие сенсоневральной тугоухости у всех лабораторных животных опытной группы, что подтверждается электрофизиологическими и морфологическими методиками.

3. При экспериментальной сенсоневральной тугоухости у белых крыс сдвиги в элементном составе волосковых клеток спирального органа, определяемые рентгеноспектральным методом, сопровождаются увеличением доли кальция (по значению весовых процентов), что свидетельствует о нарушении кальциевого метаболизма внутреннего уха.
4. Применение блокаторов кальциевых каналов (нимодипина) у подопытных животных с экспериментальной сенсоневральной тугоухостью патогенетически обосновано и эффективно.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Разработанный «Способ моделирования сенсоневральной тугоухости» у животных может быть использован в научно–практических исследованиях по изучению действия и эффективности различных лекарственных препаратов.
2. В схему лечения больных с прогрессирующей сенсоневральной тугоухостью, наряду с традиционными средствами, целесообразно включать блокатор кальциевых каналов нимодипин (нимотоп) по общетерапевтической схеме: внутрь 30–60 мг (1–2 таблетки) 3 раза в день 1–2 мес.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андрианов, М.Ю. Кальций крови и его фракции / М.Ю. Андрианов // Анестезиология и реаниматология. – 1995. – №1. – С. 61–65.
2. Александрова, Е.А. Кальцийтранспортирующие системы и регуляция концентрации кальция в кардиомиоцитах / Е.А. Александрова // Успехи физиолог. наук. – 2001. – Т. 32, № 3. – С. 40–48.
3. Альтман, Я.А. Тенденции развития физиологии слуха: аналитический обзор / Я.А. Альтман, И.А. Вартанян // Вестн. Рос. фонда фундаментальных исследований. – 2005. – №1. – С. 38–62.
4. Альтман, Я.А. Руководство по аудиологии / Я.А. Альтман, Г.А. Таварткиладзе – М.:ДМК Пресс, 2003. – 360 с.
5. Акарачкова, Е.С. Блокаторы кальциевых каналов в неврологической практике / Е. Акарачкова // Врач. – 2009. – № 9. – С. 35–37.
6. Бобошко, М.Ю. Слуховая труба / М.Ю. Бобошко, А.И. Лопотко. – СПб.: СпецЛит, 2003. – 360 с.
7. Бобошко, М.Ю. К вопросу об оценке степени тугоухости / М.Ю. Бобошко, Л.Е. Голованова, О.Н. Владимирова // Рос. оторинолар. – 2015. – №5. – С. 24–27.
8. Богданец, С.А. Этиологические и патогенетические аспекты острой нейросенсорной тугоухости сосудистого генеза: (клинические, инструментальные и биохимические исследования) : дис. ... канд. мед. наук: 14.00.04 / Богданец Светлана Анатольевна.– М., 2005. – 166 с.
9. Болезни уха, горла и носа / Ханс Бербом, Оливер Кашке, Тадеус Навка, Эндрю Свифт; пер. с англ. – М.: МЕДпресс–информ, 2012. – 776 с.
10. Бурд, Г.С. Применение препарата нимотоп в процессе нейрореабилитации больных с нарушениями мозгового кровообращения / Г.С. Бурд. – Киев, 1996. – 15 с.

11. Бурцев, Е.М. Вопросы классификации, клинического течения и патогенетического лечения дисциркуляторной энцефалопатии / Е.М. Бурцев // Неврология и психиатрия. – 1991. – № 7. – С. 19–22.
12. Безпрозванный, И.Б. Нейрональная кальциевая сигнализация и нейродегенеративные заболевания: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.03.04 / Безпрозванный Илья Борисович. — СПб., 2010. — 44.
13. Волков, М.М. Фосфорно–кальциевый метаболизм и его регуляция / М.М. Волков, И.Г. Каюков, А.В. Смирнов // Нефрология. – 2010. – Т. 14, № 1. – С. 91–103.
14. Винников, Я.А. Кортиев орган: гистофизиология и гистохимия / Я.А. Винников, Л.К. Титова. – М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1961. – 260с.
15. Выхованец, Е.П. Показатели минерального обмена в сыворотке крови пациентов с врожденным ложным суставом голени на этапах лечения по методу индуцирующей мембраны / Е.П. Выхованец, С.Н. Лунева, А.И. Митрофанов // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – №3
16. Ганьшина, Т.С. Влияние блокаторов кальциевых каналов на активность в симпатических нервах, вазомоторный рефлекс и мозговое кровообращение / Т.С. Ганьшина, Н.Р. Мирзоян // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 1996. – Т. 59, № 5. – С. 12–17.
17. Гаудинь, З.П. Модуляторы внутриклеточного метаболизма в лечении заболеваний внутреннего уха / З.П. Гаудинь, ЛЯ. Кисе // Вестн. оторинолар. – 1992. – № 2. – С. 25–27.
18. Горн Мима, М. Водно–электролитный и кислотно–основной баланс / М.М. Горн Мима, У.И. Хейтс. – М.; СПб.: Бином; Невский диалект, 2000. – 46 с.
19. Гофман, В.Р. Особенности кальциевого обмена при сенсоневральной тугоухости с точки зрения метода гомеопатии / В.Р. Гофман, О.Н. Райская–Качесова // Актуальные вопросы диагностики и лечения в многопрофильном

- лечебном учреждении: V Всерос. научно–практ. конф. – СПб., 2001. – С. 182–183.
20. Дамулин, И.В. Умеренные когнитивные расстройства: некоторые патогенетические, клинические и терапевтические аспекты / И.В. Дамулин // *Consillium medicum. Прил. Неврология.* – 2008. – № 2. – С. 19–24.
 21. Доброкачественное пароксизмальное позиционное головокружение: современные представления об этиологии и патогенезе / Н.Л. Кунельская, Н.Г. Мокрышева, А.Л. Гусева [и др.] // *Вестн. оторинолар.* – 2017. – №3. – Т. 82. – С. 75–79.
 22. Долгих, В.Т. Использование неотона и фенотина для коррекции метаболических нарушений в головном мозге при ЧМТ / В.Т. Долгих, И.В. Захаров, С.Р. Иванов // *Анестезиол. и реаниматол.* – 1999. – № 1. – С. 54–56.
 23. Драпкина, О.М. Блокатор кальциевых каналов нимодипин (Нимотоп) в лечении мягких когнитивных нарушений / О.М. Драпкина, Я.И. Ашихмин // *Фарматека.* – 2009. – № 7. – С. 44–46.
 24. Еремина, Н.В. Нейросенсорная тугоухость профессионального генеза (оптимизация диагностических, лечебных и экспертных мероприятий): метод. рекомендации / Н.В. Еремина, Т.А. Азовскова, М.Н. Попов. – Самара, 2014. – 110 с.
 25. Ермоленко, В.М. Фосфорно–кальциевый обмен и почки. / под ред. И.Е. Тареева // *Нефрология: рук–во для врачей.* – 2–е изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 2000. – С. 62–75.
 26. Журавский, С.Г. Сенсоневральная тугоухость: молекулярно–генетические, структурные и лечебно–профилактические аспекты (клинико–экспериментальное исследование) : автореф. дис. ... д–ра мед. наук : 14.00.04 / Журавский Сергей Григорьевич. – Л., 2006. – 30 с.
 27. Журавский, С.Г. Ухо и метаболизм (патобиохимические аспекты). Слухоулучшающий эффект цитофлавина в сурдологической практике:

- пособие для врачей / С.Г. Журавский ; [Федер. агентство по здравоохранению и соц. развитию РФ, С.–Петерб. гос. мед. ун–т им. И. П. Павлова]. – СПб.: [Тактик–Студио], 2009. – 71 с.
28. Загорянская, М.Е. Эпидемиологический подход к профилактике и лечению нарушений слуха у детей / М.Е. Загорянская, М.Г. Румянцева // Рос. оторинолар. – 2011. – № 2. – С. 82–87.
 29. Золотова, Т.В. Диагностика и лечение нейросенсорной тугоухости: автореф. дис. ...канд. мед. наук : 14.00.04 / Золотова Татьяна Викторовна. – М., 1988. – 22 с.
 30. Золотова, Т.В. Диагностика и лечение нейросенсорной тугоухости: дис. ... канд. мед. наук : 14.00.04 / Золотова Татьяна Викторовна. – М., 1988. – 243 с.
 31. Золотова, Т.В. Новые подходы к лечению и профилактике сенсоневральной тугоухости по материалам Ростовской ЛОР клиники / Т.В. Золотова // I Межрег. научно–практич. конф. оторинолар. ЮФО: тез. докл. – Ростов н/Д, 2004. – С. 49–53.
 32. Золотова, Т.В. Способ моделирования сенсоневральной тугоухости: пат. 2222054 РФ / Т.В. Золотова, С.Н. Панченко. – №202133845. – Оpubл. 2004. Бюл. №18; Приоритет от 15.12.02.
 33. Золотова, Т.В. Способ лечения сенсоневральной тугоухости: пат. 2232014 РФ / Т.В. Золотова, А.Г. Волков, Е.А. Костенко. – №2003115986; Приоритет от 28.05.03. – Оpubл. 1.07.2004. Бюл. №19.
 34. Золотова, Т.В. Дифференцированный подход к лечению сенсоневральной тугоухости : автореф. дис. ... д–ра мед. наук : 14.00.04 / Золотова Татьяна Викторовна. – М., 2004. – 42 с.
 35. Золотова, Т.В. Дифференцированный подход к лечению сенсоневральной тугоухости: дис. ... д–ра мед. наук : 14.00.04 / Золотова Татьяна Викторовна / Т.В. Золотова. – М., 2004. – 301 с.

36. Золотова, Т.В. Сенсоневральная тугоухость: принципы диагностики и лечения / Т.В. Золотова – Ростов н/Д: РостГМУ, 2010. – 80 с.
37. Золотова, Т.В. Содержание антител к нейронам и активность протеолитических ферментов в сыворотке крови у больных с сенсоневральной тугоухостью / Т.В. Золотова, И.Э. Гребенюк // Вестн. оторинолар. – 2010. – № 4. – С. 25–28.
38. Золотова, Т.В. Изменение окислительных и антиокислительных свойств крови под воздействием перфторана у больных острой сенсоневральной тугоухостью / Т.В. Золотова, Е.А. Анохина // Вестн. оторинолар. – 2010. – № 4. – С. 20–24.
39. Золотова, Т.В. Экспериментальная сенсоневральная тугоухость ототоксического генеза у животных: апоптотический путь гибели клеток спирального органа / Т.В. Золотова, С.Н. Панченко // Вестн. оторинолар. – 2010. – № 4. – С. 29–31.
40. Золотова, Т.В. Сенсоневральная тугоухость / Т.В. Золотова. – Ростов н/Д : ЗАО «Книга», 2013. – 544 с.
41. Золотова, Т.В. Состояние кальциевого метаболизма у больных с сенсоневральной тугоухостью по результатам остеоденситометрии / Т.В. Золотова, Н.В. Дубинская // Сб. матер. XIX съезда оториноларингологов России. – Казань, 2016. – С. 300–301.
42. Золотова, Т.В. Пат. 2627155 РФ, МКП G09B 23/28 (2006.01) Способ моделирования сенсоневральной тугоухости. Т.В. Золотова, Н.В. Дубинская, Е.В. Лобзина; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России. – № 2016133837; заявл. 17.08.2016; опубл. 03.08.2017, Бюл. №22. – 11с.
43. Золотова, Т.В. Пат. 2648534 РФ, МКП G01N 33/49 (2006.01) Значение исследования кальциевого обмена для диагностики и лечения сенсоневральной тугоухости. Т.В. Золотова, Н.В. Дубинская; заявитель и

- патентообладатель ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России. – № 2017129009; заявл. 14.08.2017; опубл. 26.03.2018, Бюл. №9. –9с.
44. Иевлева, А.А. Справочник основных лекарственных средств / А.А. Иевлева, В.А. Плисов, Е.Ю. Храмова. – М.: РИПОЛ классик, 2012. – 640 с.
 45. Ильяева, Е.Н. Медико–социальная значимость потери слуха в трудоспособном возрасте и научное обоснование методов профилактики : автореф. дис. ... д–ра мед. наук : 14.00.50 / Ильяева Екатерина Николаевна. – М., 2009. – 48 с.
 46. Ильяева, Е.Н. Современное состояние проблемы профессионального нарушения слуха в Российской Федерации / Е.Н. Ильяева // Медицина труда и промышленная экология. – 2008. – №6. – С. 180–182.
 47. Калюжный, В.П. Электролиты в норме и патологии и методы их исследования / В.П. Калюжный // Terra Medica. – 2003. – № 1. – С. 30–32.
 48. Казакова, А. В. Оценка кальций–фосфорного обмена и маркеров метаболизма костной ткани в комплексном лечении пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом тяжелой степени / А.В. Казакова, М.Н. Гуртовая // Проблемы стоматологии. – 2016. – Т.12. – № 2. – С. 25–29. doi: 10.18481/2077–7566–2016–12–2–25–29.
 49. Кирпикова, М.Н. Дифференцированный подход к диагностике и лечению постменопаузального остеопороза: автореф. дис. ...д–ра мед. наук : 14.00.04 / Кирпикова Марина Николаевна. – Иркутск, 2012. – 42 с.
 50. Кирпикова, М.Н. Дифференцированный подход к диагностике и лечению постменопаузального остеопороза : дис. ...д–ра мед. наук : 14.00.04 / Кирпикова Марина Николаевна. – Иркутск, 2012. – 222 с.
 51. Королёва, И.В. Реабилитация глухих детей и взрослых после кохлеарной и стволомозговой имплантации / И.В. Королёва. – СПб.: КАРО, 2016. – 872 с.

52. Косяков, С.А. Сенсоневральная тугоухость. Современные возможности терапии с позиции доказательной медицины / С.А. Косяков, А.Г. Атанесян. – М.: МЦФЭР, 2008. – 80 с.
53. Косяков, С.Я., Кирдеева, А.И. Этиопатогенетические аспекты идиопатической нейросенсорной тугоухости / С.Я. Косяков, А.И. Кирдеева // Вестн. оторинолар. – 2017. – №2 (Т.82). – С. 95–101.
54. Кукес, В.Г. Клиническая фармакология / В.Г. Кукес. – М.: Медицина, 1999. – С. 14–19.
55. Кукес, В.Г. Метаболизм лекарственных препаратов / В.Г. Кукес, В.П. Фисенко. – М.: Палей-М, 2000. – 133 с.
56. Капустин, Р.В. Нимотоп в комплексном лечении хронических нарушений мозгового кровообращения / Р.В. Капустин // Здоровье Украины. – 2003. – № 64.– С.3–4.
57. Константинова, Н.П. Эффективность комплексного лечения нейросенсорной тугоухости / Н.П. Константинова, С.В. Морозова, У.С. Малявина // Мат. XVI съезда оториноларингологов РФ «Оториноларингология на рубеже тысячелетий». – Сочи, 2001. – С. 214–216.
58. Козлов, М. Я. Детская сурдоаудиология / М. Я. Козлов, А.Л.Левин. – Л.: Медицина, 1989. – 224 с
59. Кунельская, Н.Л. Реабилитация пациентов с различными формами нейросенсорной тугоухости / Н.Л. Кунельская // Рос. мед. журн. – 2011. – №24. – С. 1478–1480.
60. Кунельская, Н.Л. Комплексный подход к лечению нейросенсорной тугоухости / Н.Л. Кунельская // Фарматека. – 2013. – №15. – С. 54–58.
61. Кунельская, Н.Л. Нарушение слуха у лиц молодого возраста / Н.Л. Кунельская, Л.Ю. Скрыбина // Вестн. оторинолар. – 2014. – № 1. – С. 24–28.

62. Ланцов, А.А. Изменения морфофункционального состояния сосудистой полоски улитки под влиянием ототоксического антибиотика / А.А. Ланцов // Вестн. оторинолар. – 2003. – № 4. – С. 8–11.
63. Литвинов, А.В. Норма в медицинской практике: справочное пособие / А.В. Литвинов. – М.: МЕДпресс-информ, 2002. – 144 с.
64. Макляков, Ю.С. Основы клинической фармакологии. Клиническая фармакология гипотензивных средств: метод. рек. для кардиологов и терапевтов / Ю.С. Макляков. – Ростов н/Д: РостГМУ, 1997. – 78с.
65. Моисеев, С.В. Современные неинвазивные методы оценки прогрессирования атеросклероза и эффект нифедипина–ГИТС / С.В. Моисеев // Клин. фармакология и терапия. – 2002. – Т. 11, № 4. – С. 1–4.
66. Мельников, К.Н. Разнообразие и свойства кальциевых каналов возбудимых мембран / К.Н. Мельников // Психофармакология и биол. наркология. – 2006. – Т. 6, Вып.1–2. – С. 1139–1155.
67. Мельников, К.Н. Кальциевые каналы возбудимых мембран / К.Н. Мельников // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2007. – Т. 5, №1. – С. 28–42.
68. Мойса, С.С. Особенности регуляции обмена кальция в разные периоды роста и развития / С.С. Мойса, А.Д. Ноздрачев // Успехи геронтол. – 2014. – Т.27, № 1. – С.62–71.
69. Особенности гемодинамики головного мозга при ангиогенных кохлеовестибулопатиях и липидном дистресс – синдроме / А.И. Крюков, Н.А. Петухова, А.В. Каралкин, П.Р. Камчатнов // Вестн. оторинолар. – 2003. – № 2. – С. 8–11.
70. Ототоксическое воздействие цисплатина на внутреннее ухо / А.И. Крюков, Н.Л. Кунельская, В.Ю. Абрамов [и др.] // Вестн. оторинолар. – 2015. – № 1. – С. 21–24.
71. Оториноларингология / В.И. Бабияк, М.И. Говорун, Я.А. Накатис, А.Н. Пашинин. – СПб.:Питер, 2012. – 840 с.

72. Отоакустическая эмиссия как метод оценки слуха некоторых лабораторных животных / С.Г. Журавский, А.Н. Чомский, К.В. Нурский, Ю.Д. Мельников // Новости оторинолар. и логопатол. – 2001. – №4(28). – С. 114–116.
73. Основы клинической биохимии : пособие для студентов медико–диагност. фак. / С.В. Лелевич, И.А. Курстак, Т.Н. Гриневич [и др.]. – Гродно: ГрГМУ, 2013.– 184 с.
74. Остеопороз: рук–во для врачей / под ред. О.М. Лесняк. –М.: ГЭОТАР – Медиа, 2016. – 464 с.
75. Панкова, В.Б. Проблемы тугоухости у лиц летных профессий гражданской авиации России / В.Б. Панкова, А.Ю. Бушманов // Вестн. оторинолар. – 2014. – № 6. – С. 27–30.
76. Панкова, В.Б. Распространенность и особенности экспертных решений при профессиональной тугоухости у работников транспорта (на примере железнодорожного и воздушного транспорта) / В.Б. Панкова, Л.Ю. Скрыбина // Вестн. оторинолар. – 2016. – Т. 81, № 1. – С. 13–18.
77. Панкова, В.Б. Критерии связи нарушений слуха с профессией и критерии профпригодности по слуху у авиационного персонала гражданской авиации / В.Б. Панкова // Вестн. оторинолар. – 2017. – №2 (Т.82). – С.11–15.
78. Пальчун, В.Т. Лечение острой нейросенсорной тугоухости / В.Т. Пальчун, Н.Л. Кунельская, Т.С. Полякова // Вестн. оторинолар. – 2006. – № 3. – С. 45–48.
79. Патоморфологические особенности повреждения волосковых клеток спирального органа при экспериментальной сенсоневральной тугоухости / С.Г. Журавский, В.В. Томсон, В.Г. Бородулин, А.И. Лопотко // Бюл. экспериментальной биологии и медицины. – 2006. – Т.141, № 3. – С. 356–360.
80. Петрова, Н.Н. Проблемы профессиональной сенсоневральной тугоухости: автореф. дис. ...д–ра мед. наук : 14.01.03 / Петрова Наталья Николаевна. – СПб., 2010. – 42 с.

81. Практическое руководство по сурдологии / А.И. Лопотко, М.Ю. Бобошко, И.П. Бердникова [и др.]; под ред. А.И. Лопотко. – СПб.: Диалог, 2008. – 273 с.
82. Пухлик, С.М. Опыт применения препарата «немотан» при некоторых формах нейросенсорной тугоухости / С.М. Пухлик // Журн. вушн., нос. і горл. хвороб. – 2008. – №1. – С.78–82.
83. Райская–Качесова, О.Н. Значение кальциевого обмена в патогенезе хронической тугоухости : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.00.04 / Райская–Качесова Ольга Николаевна — СПб., 2003. – 20 с.
84. Рожинская, Л.Я. Системный остеопороз: практ. рук. для врачей / Л.Я. Рожинская. – 2-е изд., перераб.и доп. – М.: Издатель Мокеев, 2000. – 196 с.
85. Рубин, М.П. Диагностическая достоверность результатов денситометрии скелета / М.П. Рубин, Р.Е. Чечурин // Радиология–практика. –2003. – № 4. – С. 36–37.
86. Рубин, М.П. Диагностика, профилактика и лечение остеопороза в поликлинических условиях / М.П. Рубин, Р.Е. Чечурин // Терапевт. архив. – 2011. – № 1. – С. 32–38.
87. Сидоренко, Б.А. Диапазон применения современных антагонистов кальция при сердечно – сосудистых заболеваниях / Б.А. Сидоренко, Д.В. Преображенский // Терапевт. архив. – 1998. – № 12. – С. 80–84.
88. Сагалович, Б.М. Болезнь Меньера / Б.М. Сагалович. – М.: Мединформагентство, 1999. – 525 с.
89. Силкина А.В. Ранняя диагностика сенсоневральной тугоухости у больных с церебральными нарушениями кровообращения / А.В. Силкина, Я.А. Накатис, М.А. Рымша // Материалы межрег. научно–практ. конф. оторинолар. Сибири и Дальнего Востока «Актуальные вопросы оториноларингологии». – г. Благовещенск, 2017. – С.148–151.
90. Скрипникова, И.А. Возможности костной рентгеновской денситометрии в клинической практике: метод. рекомендации / И.А. Скрипникова, Л.А. Щеплягина, В.Е. Новиков. – М., 2015. – 36 с.

91. Таварткиладзе, Г.А. Диагностика нарушенной слуховой функции у детей первого года жизни / Г.А. Таварткиладзе, Т.Г. Гвелесиани, М.Е. Загорянская, М.Г. Румянцева – М.: Полиграф сервис, 2001. – Режим доступа: <http://www.studfiles.ru/preview/2419604> (15.08.2016).
92. Таварткиладзе, Г.А. Руководство по клинической аудиологии / Г.А. Таварткиладзе. – М.: Медицина, 2013. – 676 с.
93. Таварткиладзе, Г.А. Современное состояние и тенденции развития экспериментальной и клинической аудиологии / Г.А. Таварткиладзе // Вестн. оторинолар. – 2003. – № 3. – С. 3–6.
94. Токсическое поражение внутреннего уха под воздействием цисплатина. Экспериментальное исследование / Я.Ю. Кудеева, Е.В. Байбакова, М.А. Чугунова, Н.В. Резакова // Рос. оторинолар. – 2015. – №2(75). – С. 43–47.
95. Топографическая анатомия области «рыболовного крючка» и её значение при выборе хирургической техники кохлеарной имплантации / Ю.К. Янов, В.Е. Кузовков, А.С. Лиленко [и др.] // Вестн. оторинолар. – 2017. – №3 (Т.82). – С.4–8.
96. Турсунов Р.М. Изучение состояния слуха у судомехаников, в зависимости от стажа их работы / Р.М.Турсунов, М.Ю. Бобошко // Мат. VII Нац. Конгр. Аудиологов и XI Междунар. Симп. «Современ. проблемы Физиол. и патол. слуха». – г. Суздаль, 2017. – С. 151–153.
97. Уровень подвижности наружных волосковых клеток улитки регулируется двумя Ca^{2+} – зависимыми каналами передачи / Г.И. Фроленков, Ф. Маммано, И.А. Белянцева [и др.] // IV Междунар. Симп. «Современ. проблемы физиол. и патол. слуха» (Суздаль, 19–21 июня 2001 г.). – М., 2001. – С. 189–191.
98. Худавердян, Д.Н. Протективное действие блокатора кальциевых каналов верапамила на морфофункциональное состояние волосковых клеток кортиева органа в условиях канамицинового ототоксикоза. (Экспериментальное

- исследование) / Д.Н. Худавердян // Бюл. Эксперимент. биологии и медицины. – 2002. – Т. 133, № 4. – С. 466–469.
99. Цыганкова, Е.Р. Этические аспекты функционирования и развития помощи лицам с нарушениями слуха / Е.Р. Цыганкова, Г.А. Таварткиладзе // Мат. 7-го Нац. Конгр. аудиологов и 11-го Междунар. Симп. «Современ. проблемы физиол. и патол. слуха». (Суздаль, 12 – 14 сентября 2017г.). – М., 2017. – С.42–43.
 100. Шестакова, С.А. Нарушения водно-электролитного обмена и их фармакологическая коррекция / С.А. Шестакова, Н.Н. Петрищев, Э.Э. Звартау; под ред. Н.Н. Петрищева. – СПб.: СПбГМУ, 2005. – 91 с.
 101. Штыкова, О.Н. Клиническое значение остазы как специфического маркера формирования костной ткани и взаимосвязь его с сывороточным цинком у детей / О.Н. Штыкова, Т.И. Легонькова, О.В. Войтенкова О.В. // Вестн. Смоленской ГМА – 2016. – Т.15, №3.– С. 72–77.
 102. Электрофизиологическая оценка слуховой функции после введения цисплатина / М.Р. Богомильский, И.Н. Дьяконова, И.В. Рахманова [и др.] // Вестн. оторинолар. – 2010. – № 3. – С. 24–26.
 103. Янов, Ю.К. Состояние и перспективы развития кохлеарной имплантации в России / Ю.К. Янов, В.П. Ситников // Проблемы и возможности микрохирургии уха: Мат. Рос. научно-практ. конф. оторинолар. – Оренбург, 2002. – С.4–6.
 104. Aging changes in voltagegated calcium currents in hippocampal CA1 neurons / L. Campbell, S. Hao, O. Thibault [et al.] // J. Neurosci. – 1996. – N 16. – P. 6286–6295.
 105. Age-related changes of myelin basic protein in mouse and human auditory nerve / Y. Xing, D.J. Samuvel, S.M. Stevens [et al.] // PLoS One. – 2012. – Vol. 7, N 4. – P. e34500.
 106. Antioxidant vitamins and magnesium and the risk of hearing loss in the US general population / Y.H. Choi, J.M. Miller, K.L. Tucker [et al.] // Am. J. Clin. Nutr. – 2014. – Vol. 99. – P. 148–155.

107. A comparison of different murine models for cytomegalovirus-induced sensorineural hearing loss / Y. Wang, R. Patel, C. Ren [et al.] // *Laryngoscope*. – 2013. – Vol. 123, N 11. – P. 2801–2806.
108. Avery, R. Multiple channel types contribute to the low-voltage-activated calcium current in hippocampal pyramidal CA3 neurons / R. Avery, D. Johnston // *J. Neurosci.* – 1996. – N 16. – P. 5567–5582.
109. Acceleration of cochlear synaptopathy in "recovered" ears / K.A. Fernandez, P.W. Jeffers, K. Lall [et al.] // *J. Neurosci.* – 2015. – Vol. 35, N 19. – P. 7509–7520.
110. Auditory Nerve Perinodal Dysmyelination in Noise-Induced Hearing Loss / Tagoe T., Barker M., Jones A. [et al.] // *J. Neuroscience*. – 2014. – Vol. 34, N 7. – P. 2684–2688.
111. Baloh, R.W. Neurotology of migraine / R.W. Baloh // *Headache*. – 1997. – Vol. 37, N10. – P. 615–621.
112. Berrettini, S. Diagnostic and therapeutic approach to progressive sensorineural hearing loss / S. Berrettini, F. Ravecca, F. Forli // *Acta Otorhinolaryngol. Ital.* – 1998. – Vol. 18, N 4, Suppl. 59. – P. 87–94.
113. Biological and synthetic apatites // P.W. Brown, B. Constantz (eds.). *Hydroxyapatite and related materials*. CRC, Boca Raton, 1994. – P. 3–28.
114. Begrenzung chronischer Hörverluste durch locale Glukokortikoidgabe Meerschweinchen mit akutem Lärmtrauma / M. Müller, M. Tisch, H. Maier [et al.] // *HNO*. – 2016. – Vol. 64, Issue 11, P. 831–840.
115. Bracco, D. Vasospasm treatment in intensive care / D. Bracco, R. Chiolerio // *Rev. Med. Suisse Romande*. – 2000. – Vol. 120, N 4. – P. 355–362.
116. Blood pressure, nimodipine, and outcome of ischemic stroke / R. Fogelholm [et al.] // *Acta Neurol.ologica Scand.* – 2004. – Vol. 109, N 3. – P. 200–204.
117. Caterall, W.A. Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels / W.A. Caterall // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* – 2000. – Vol. 16. – P. 521–555.
118. Cochlear blood flow in response to dilating agents / K.A. Ohlsen, A. Didier, D. Baldwin [et al.] // *Hear. Res.* – 1992. – Vol. 58, N 1. – P. 19–25.

119. Current concepts in age-related hearing loss: Epidemiology and mechanistic pathways / T. Yamasoba, F. Lin, S. Someya [et al.] // *Hear. Res.* – 2013. – Vol. 303. – P. 30–38.
120. Disruption of intracellular calcium regulation is integral to aminoglycoside-induced hair cell death / R. Esterberg, D.W. Hailey, A.B. Coffin [et al.] // *J. Neurosci.* – 2013. – Vol. 33, N 17. – P. 7513–7525.
121. Does bone mineral density have an effect on hearing loss in postmenopausal patients? / Ozkiriş, M., Karaçavuş S., Kapusuz Z. [et al.] // *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* – 2013 –Oct;122(10) – P.648–52.
122. Dihydropyridine calcium antagonists increase fibrinolytic activity: a systematic review / M.D. Vergouwen, M. Vermeulen, R.J. de Haan [et al.] // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 2007. – Vol. 27. – P. 1293–1308.
123. ER-mitochondrial calcium flow underlies vulnerability of mechanosensory hair cells to damage / R. Esterberg, D.W. Hailey, E.W. Rubel [et al.] // *J. Neurosci.* – 2014. – Vol. 34, N 29. – P. 9703–9719.
124. Effects of a calcium blocker on spontaneous neural noise and gross action potential waveforms in the guinea pig cochlea / T. Sueta, S.Y. Zhang, P.M. Sellick [et al.] // *Hear. Res.* – 2004. – Vol. 188, N 1–2. – P. 117–125.
125. Effect of a fixed combination of nimodipine and betahistine versus betahistine as monotherapy in the long-term treatment of Meniere disease: a 10-year experience / D. Monzani, M.R. Barillari¹, M. Alicandri Ciufelli [et al.] // *ACTA otorhinolaryngol. Italica.* – 2012. –Vol. 32. – P. 393–403.
126. Furness, D.N. Molecular basis of hair cell loss / D.N. Furness // *Cell and Tissue Research.* – 2015. – Vol. 361, Is. 1. – P. 387–399.
127. FGF-23, vitamin D and calcification: the unholy triad / M.S. Razzaque, R. St-Arnaud, T. Taguchi [et al.] // *Nephrol Dial Transplant.* – 2005. – Vol. 20, N 10. – P. 2032–2035.

128. Gating of Ca^{2+} -activated K^{+} channels controls fast inhibitory synaptic transmission at auditory outer hair cells / D. Oliver [et al.] // *Neuron*. – 2000. – Vol. 26. – P. 595–601.
129. Gammopathy interference in clinical chemistry assays: mechanisms, detection and prevention / A.J. Bakker [et al.] // *Clin. Chem. Lab. Med.* – 2007. – Vol. 45, N 9. – P. 1240–1243.
130. Genetic Polymorphism Associated with Hearing Threshold Shift in Subjects during First Encounter with Occupational Impuls Noise / Y. Grondin, E.M. Bortoni, R. Sepulveda [et al.] // *PLoS One*. – 2015. – №10 (6). –01308827. doi:10.1371/journal.pone.0130827.
131. Hafidi, A. Developmental expression of $\text{Ca}_v1.3$ ($\alpha 1d$) calcium channels in the mouse inner ear / A. Hafidi, D. Dulon // *Brain Res. Dev. Brain Res.* – 2004. – Vol. 150. – P. 167–175.
132. Halevi-Katz, D.N. Exposure to music and noise-induced hearing loss (NIHL) among professional pop/rock/jazz musicians / D.N. Halevi-Katz, E. Yaakobi, H. Putter-Katz // *Noise Health*. – 2015. – Vol. 17, N 76. – P. 158–164.
133. Harr, M.W. Apoptosis and autophagy: decoding calcium signals that mediate life or death / M.W. Harr, C.W. Distelhorst // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* – 2010. – Vol. 2, N 10. – P.a005579.
134. Hawkins, J.E. Microcirculation in the labyrinth / J.E. Hawkins // *Arch. Otolaryng.* – 1976. – Vol. 212. – P. 241–245.
135. Hille, B. *Ion Channels of Excitable Membranes: Third Edition* / B. Hille. – University of Washington, 2001. – 722 p.
136. Hearing loss in postmenopausal women with low bone mineral density / J.Y. Kim, Lee S.B., Lee C.H. [et al.] // *Auris Nasus Larynx*. – 2016.– Apr;43(2).– P.155–60.
137. Jerger, J. Clinical experiences with impedans audiometry / J. Jerger // *Arch. otolaryng. (Chicago)*. – 1970. – Vol.92. – P. 311–324.

138. Kanowski, S. Nimodipine in the treatment of dementia / S. Kanowski, R. Ferszt // *Drugs Today (Barc)*. – 1998. – Vol. 34, N 9. – P. 767–776.
139. Kazda, S. Nimodipine A new calcium antagonist with preferential cerebrovascular action / S. Kazda, R. Towart // *Acta Neurochirurgica*. – 1982. – N 63. – P. 8–15.
140. Kennedy, H.J. Fast adaptation of mechanoelectrical transducer channels in mammalian cochlear hair cells / H.J. Kennedy, M.G. Evans, A.C. Crawford, [et al.] // *Nat. Neurosci*. – 2003. – Vol. 6. – P. 832–836.
141. Keyrouz, S. Clinical review: Prevention and therapy of vasospasm in subarachnoid hemorrhage / S. Keyrouz, M. Diringer // *Crit. Care*. – 2007. – Vol. 11, N 4. – P. 220.
142. Klotho gene, phosphocalcic metabolism, and survival in dialysis / P.U. Torres, D. Prie, L. Beck [et al.] // *J. Ren. Nutr*. – 2009. – Vol. 19, N 1. – P. 50–56.
143. Kujawa, S.G. Adding insult to injury: cochlear nerve degeneration after “temporary” noise-induced hearing loss / S.G. Kujawa, M.C. Liberman // *J. Neurosci*. – 2009. – Vol. 29. – P. 14077–14085.
144. Lamm, K. The effect of blood flow promoting drugs on cochlear blood flow, perilymphatic pO₂ and auditory function in the normal and noise damaged hypoxic and ischemic guinea pig inner ear / K. Lamm, W. Arnold // *Hear Res*. – 2000. – Vol. 141, N 1–2. – P. 199–219.
145. Lopez-Arrieta, A. Nimodipine for primary degenerative, mixed and vascular dementia / A. Lopez-Arrieta, J. Briks // *Cochrane Database Systematic Rev*. – 2002. – Is. 3. Art. № CD000147.
146. Lustig, H.S. Omega-agatoxin IVA and excitotoxicity in cortical neuronal cultures / H.S. Lustig, K.B. Ahern, D.A. Greenberg // *Neurosci Lett*. – 1996. – Vol. 213, N 2. – P. 142–144.
147. Mann, W. Calcium antagonists and damage to the organ of Corti in acoustic trauma / W. Mann, M. Pilgramm // *Article in German*. – 1987. – Vol. 35, N 5. – P. 203–207.

148. Mann, W. Calcium antagonists in the treatment of sudden deafness / W. Mann, C. Beck, C. Beck // Arch. Otorhinolaryngol. – 1986. – Vol. 243, N 3. – P. 170–173.
149. Maurer, J. Use of a Ca (++) antagonist in noise-induced hearing loss in animal experiment / J. Maurer, W. Mann, M. Schneider [et al.] G. Strecker // HNO. – 1993. – Vol. 41, N 4. – P. 192–197.
150. Nimodipine // Evidence-based Dementia Practice / Ed. by N. Qizilbash [et al.] – Oxford: Blackwell Science, 2002. – P. 537–540.
151. Nave, K.A. Myelination and support of axonal integrity by glia / K.A. Nave // Nature. – 2010. – N 468. – P. 244–252.
152. Naples, J.G. Calcium-channel blockers as therapeutic agents for acquired sensorineural hearing loss / J.G. Naples // Med. Hypotheses. – 2017. – V. 104, July. – P. 121–125.
153. Noskovic, P. Effect of a combination of pentoxifylline and nimodipine on lipid peroxidation in postischemic rat brain / P. Noskovic, V. Faberova, M. Fabianova // Mol. Chem. Neuropathol. – 1995. – Vol. 25. – P. 97–102.
154. Nimodipine and its use in cerebrovascular disease: evidence from recent preclinical and controlled clinical studies / D. Tomassoni, A. Lanari, G. Silvestrelli [et al.] // Clin. Exp. Hypertens. – 2008. – Vol. 30. – P. 744–766.
155. Orrenius, S. Regulation of cell death: the calcium–apoptosis link / S. Orrenius, B. Zhivotovsky, P. Nicotera // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2003. – Vol. 4. – P. 552–565.
156. Packer, M. Effect of amlodipine on morbidity and mortality in severe chronic heart failure. Prospective Randomized Amlodipine Survival Evaluation Study Group / M. Packer, C.M. O'Connor, J.K. Ghali // N. Engl. J. Med. – 1996. – Vol. 335. – P. 1107–1114.
157. Prophylactic and therapeutic functions of T-type calcium blockers against noise-induced hearing loss / H. Shen, B. Zhang, J.H. ShinH. [et al.] // Hear. Res. – 2007. – Vol. 226, N 1–2. – P. 52–60.

158. Prophylactic effect of Ca^{2+} -deficient artificial perilymph perfusion on noise-induced hearing loss / Li Xinggi, Yu Ning, Sun Jianhe [et al.] [// Chinese Med. J. – 2003. – Vol. 116, N 3. – P. 440–443.
159. Protection and treatment of sensorineural hearing disorders caused by exogenous factors: experimental findings and potential clinical application / M.L. Duan, M. Ulfendahl, G. Laurell [et al.] // Hear. Res. – 2002. – Vol. 169, N 1–2. – P.169–178.
160. Quantitative analysis of apoptotic and necrotic outer hair cell after exposure to different levels of continuous noise / W.P. Yang, D. Henderson, B.H. Hu [et al.] // Hear.Res. – 2004. – Vol. 196, N 1–2. – P. 69–76.
161. Role of class D L-type Ca^{2+} channels for cochlear morphology / R. Glueckert, G. Wietzorrek, K. Kammen-Jolly [et al.] // Hear. Res. –2003. – Vol. 178. – P. 95–105.
162. Role of L-Type Ca^{2+} Channels in Transmitter Release From Mammalian Inner Hair Cells I. Gross Sound-Evoked Potentials / S.Y. Zhang [et al.] // J. Neurophysiol. – 1999. – Vol. 82, N 6. – P. 3307–3315.
163. Schacht, J. Aminoglycoside ototoxicity: prevention in sight? / J. Schacht // Otolaringol. Head. Neck Surg. – 1998. – Vol. 118, N 5. – P. 674–677.
164. Synaptic organization in cochlear inner hair cells deficient for the $\text{Ca}_v1.3$ ($\alpha 1D$) subunit of L-type Ca^{2+} channels / N.R.M. Nemzou, A.V. Bulankina, D. Khimich [et al.] // Neuroscience. – 2006. – Vol. 141. – P. 1849–1860.
165. Tan, W.J.T. Noise-induced cochlear inflammation / W.J.T. Tan, P.R. Thorne, S.M. Vlajkovic // World J. Otorhinolaryngol. – 2013. – Vol. 3. – P. 89–99.
166. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics / C.A. Burtis, E.R. Ashwood, D.E. Bruns (ed.). – 4th ed. – St. Louis: Elsevier Inc., 2012. – 2238 p.
167. The mechanism of pneumolysin-induced cochlear hair cell death in the rat / M. Beurg, A. Hafidi, L. Skinner [et al.] // J. Physiol. – 2005. – Vol. 568, Pt. 1. – P. 211–227.

168. The International Cooperative Study on the timing of aneurysm surgery. Part 1: Overall management results / N. Kassell, J. Torner, E. Haley [et al.] // J. Neurosurg. – 1990. – N 73. – P. 18–36.
169. Treatment with nimodipine or mannitol reduces programmed cell death and infarct size following focal cerebral ischemia / A. Korenkov, J. Pahnke, K. Frei [et al.] // Neurosurg Rev. – 2000. – N 23. – P. 145–150.
170. Type Voltage-Gated Calcium Channel is Involved in The Pathogenesis of Acoustic Injury in the Cochlea / I. Uemaetomari, K. Tabuchi [et. al.] // Tohoku J. Exp. Med. – 2009. – Vol. 218. – P. 41–47.
171. Vicente-Torres, M.A. A bad link to mitochondrial cell death in the cochlea of mice with noise-induced hearing loss / V.A. Vicente-Torres, J. Schacht // J. Neurosci Res. – 2006. – Vol. 83, N 8. – P. 1564–1572.
172. Virzbicka, L. Long term stability of inner ear function using vibrant soundbridge / L. Virzbicka, G.M. Sprinzl, V. Koci // XXXI World Congr. Audiol. (April 29–May 3, 2012, Moscow, Russia.) – M., 2012. – P.185.
173. Wong, A.C.Y. Noise-induced hearing loss in the 21st century: A research and translational update / Wong Ann Chi Yan, Kristina E Froud, Yves Shang-Yi Hsieh // World J. Otorhinolaryngol.– 2013. –Vol. 3, N 3. – P. 58–70.
174. Wong A.C.Y. Canonical transient receptor potential channel subtype 3-mediated hair cell Ca²⁺ entry regulates sound transduction and auditory neurotransmission / A.C.Y. Wong, L. Birnbaumer, G.D. Housley // Eur. J. Neurosci. – 2013. – Vol. 37. – P. 1478–1496.
175. Wong A.C.Y. Mechanisms of sensorineural cell damage, death and survival in the cochlea / A.C.Y. Wong, Allen F. Ryan // Front Aging Neurosci. – 2015. – Vol. 7. – P. 58.
176. Wilson, J. Global action against hearing impairment / Wilson J. //Scand.Audiology.–1988. – Suppl. 28 –P.33–58.

Список сокращений

СНТ–сенсоневральная тугоухость

НВК– наружные волосковые клетки

ВВК– внутренние волосковые клетки

БКК– блокаторы кальциевых каналов

МПКТ–минеральная плотность костной ткани