



николай славков цандев

"МОРФОЛОГИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ ВЪРХУ СЛУХОВАТА ТРЪБА ПРИ ДОМАШНАТА СВИНЯ"

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация за присъждане на образователната и научна степен "ДОКТОР" Област на висше образование: 6. Аграрни науки и ветеринарна медицина Професионално направление: 6.4. Ветеринарна медицина Специалност (научна специалност): Морфология

Научен ръководител: Проф. д-р Ангел Петров Воденичаров, двмн

Стара Загора 2023 Дисертационният труд на докторант на самостоятелна подготовка Николай Славков Цандев е обсъден и насочен за защита в заседание на разширен катедрен съвет на Катедра "Ветеринарна анатомия, хистология и ембриология" на Ветеринарномедицински факултет при Тракийски университет, гр. Стара Загора (Протокол №196/15.11.2023).

Авторът на дисертационния труд е докторант на самостоятелна подготовка в катедра "Ветеринарна анатомия, хистология и ембриология" на ВМФ, ТрУ – Стара Загора. Дисертацията е в обем от 152 страници текст от които: Увод, Литературен преглед, Цел и Задачи, Материали и Методи, Резултати, Обсъждане със заключение, Изводи, Приноси, Препоръки за практиката и Списък на използваната литература (238 източника, от които 26 на кирилица и 212 на латиница). Дисертацията съдържа 51 фигури и 9 таблици.

Докторантът е отчислен с право на защита със Заповед №2245/ 21.06.2023 г. на ректора на Тракийски университет – Стара Загора и Протокол №39/20.06.2023 г.

Защитата на дисертационният труд ще се състои на г. отчаса в зала на ВМФ, ТрУ, Стара Загора на открито заключително заседание на научното жури. Материалите по защитата са на разположение на заинтересованите лица в Отдел "Научен" на ВМФ и на интернет страницата на Тракийски университет: www.uni-sz.bg

БЛАГОДАРНОСТИ

Благодаря на научния ми ръководител проф. д-р Ангел Петров Воденичаров, двмн, за оказаната безрезервна подкрепа и всеотдайност при разработването и написването на този научен труд.

Благодаря на проф. д-р Ивайло Стефанов Стефанов от катедрата по "Анатомия, хостология и ембриология" на МФ при ТрУ за приятелството и безграничното съдействие през всичките тези трудни за мен години.

Специални благодарности изказвам към г-жа Галина Стефанова Вътева за изключителния професионализъм и помощ при изготвянето на голяма част хистологичните препарати.

Благодарности и на всички приятели и колеги, които ме подкрепяха през цялото време.

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

ВМΦ	– Ветеринарномедицински факултет
ТрУ	– Тракийски университет
ΕT	– Евстахиева тръба
ТА	– tuba auditiva (слухова тръба)
LVP	– m. levator veli palatini
TVP	– m. tensor veli palatini
NADPH-d	– никотинамид-аденин-динуклеотид-фосфат-диафораза
H&E	- хематоксилин-еозин
MC, mc	- мастоцити
NOS	– азотен-окис синтаза
VG	– Van Gieson
DAB	– диаминобензидин
OPHTA	– ostium pharyngeum tubae auditivae
OTMTA	– ostium tympanicum tubae auditivae
MALT	– мукозно – свързана лимфоидна тъкан
APAD	– a. palatina ascendens (дясна)
APAS	– a. <i>palatina ascendens</i> (лява)
TB	– толуидиново синьо
A/S	– алцианово синьо-сафранин

СЪДЪРЖАНИЕ

1.	VВОЛ
2.	и залачи
	2.1. Цел.
	2.2. Залачи
3.	МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ
	3.1. Използван трупен материал
	3.2. Използвани методи
	3.2.1. ДИСЕКЦИЯ НА ПРЕСЕН ТРУПЕН МАТЕРИАЛ
	3.2.1.1. Дисекция на разполовени глави и морфометрично измерване на
	слуховата тръба "in situ"
	3.2.2. МОРФОМЕТРИЯ
	3.2.3. СТЕРЕОСКОПИЯ
	3.2.4. КОРОЗИОНЕН МЕТОД
	3.2.4.1. Изпълване лумена на слуховата тръба с акрилатна
	студенополимеризираща пластмаса
	3.2.4.2. Изпълване артериалната система на главата и изготвяне на трайни
	корозионни препарати за изследване кръвоснабдяването н
	слуховата тръба
	3.2.5. РЕНТГЕНОГРАФИЯ
	3.2.5.1. Контрасна рентгенография на лумена на слуховата тръба
	3.2.5.2. Рентгенография на корозионни отливки от артериите на глава след
	запълване с акрилатна пластмаса
	3.2.5.3. Рентгенография на препаратите със запазени кости на
	главата и изпълнен лумен на слуховата тръба с акрилатна
	пластмаса
	3.2.6. КОМПЮТЪРНОТОМОГРАФСКО ИЗСЛЕДВАНЕ
	3.2.6.1. Конусно – лъчева компютърна томография (CBCT)
	3.2.6.2. Триизмерна реконструкция-3D компютърен образ на кръвоноснит
	съдове на главата
	3.2.7. ИЗПЪЛВАНЕ СЪС СИЛИКОНОВИ ЕЛАСТОМЕРИ
	3.2.7.1. Изпълване лумена на слуховата тръба с Elite Double и изготвяне на
	отливки от него
	3.2.7.2. И зпълване кухината на средното ухо и лумена на слуховата тръба
	през външния слухов проход с A-silicone

(Perfect-F Light Premium-set)	.18
3.2.7.1. Изпълване артериалната система на главата с	
Elite Double и изготвяне на влажни препарати	19
3.2.8. ИЗПЪЛВАНЕ С ТУШ – ЖЕЛАТИН	19
3.2.8.1. Изпълване на кръвоносните съдове с туш – желатин	19
3.2.9. ДИАФОНИЗАЦИЯ	20
3.2.9.1. Диафонизиране на слуховата тръба и прилежащите ѝ	
структури	20
3.2.10. ПЛАСТИНАЦИЯ	21
3.2.10.1. Пластиниране на слуховата тръба и прилежащите ѝ структури в	
полиестерна смола	.21
3.2.11. ИЗРАБОТВАНЕ НА ХИСТОЛОГИЧНИ ПРЕПАРАТИ	.23
3.2.11.1. Оцветяване с Хематоксилин – Еозин	.23
3.2.11.2. Оцветяване с толуидиново синьо за доказване на метахромазия	23
3.2.11.3. Оцветяване с берберин сулфат за доказване на хепарин позитивни	1
мастоцити чрез флуоресценция	23
3.2.11.4. Оцветяване с алцианово синьо – сафранин за доказване на	
биогенни амини, гликозаминогликани и сулфатирани муцини	23
3.2.11.5. Оцветяване по Ван Гизон	.23
3.2.11.6. Оцветяване с орцеин за доказване на еластични влакна	23
3.2.12. ЕНЗИМОХИСТОХИМИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ	23
3.2.12.1. Ензимохистохимично (ензимохимично) изследване за доказване	на
NADPH-d	23
3.2.13. ИМУНОХИСТОХИМИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ	24
3.2.13.1. Имунохистохимично (имунохимично) изследване за доказване на	a
азот окис синтаза по АВС метода	24
3.2.14. СТАТИСТИКА	25
3.2.14.1. Статистически анализ2	25
. РЕЗУЛТАТИ2	26
4.1. МАКРОСКОПСКА АНАТОМИЯ НА СЛУХОВАТА ТРЪБА	6
4.1.1. Наблюдения върху разрезната повърхност на глави и последваща дисекция	26
4.2. СТЕРЕОСКОПСКО ИЗСЛЕДВАНЕ	29
4.3. ДЕМОНСТРАЦИЯ РЕЛЕФА НА ЛУМЕНА НА ТРЪБАТА	30
4.3.1. Външен релеф на тръбата след изпълване с акрилатна пластмаса и силиконови	
еластомери	30
4.4. Позитивна контрастна рентгенография на лумена на слуховата тръба	36
4.5. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ТОПОГРАФИЯТА НА СЛУХОВАТА ТРЪБА	.37
4.5.1. Проекция на слуховата тръба върху нативни препарати	37

5.

4.6. /	Артериална архитектоника на съдовете, кръвоснабдяващи слуховата тръба	
4	.6.1. Изпълване на артериите със силиконов еластомер	
4	.6.2. Изпълване на артериите с разтвор на туш – желатин	
4	.6.3. Изпълване на артериите с акрилатна пластмаса	40
4.7. I	ИЗСЛЕДВАНЕ НА СЛУХОВАТА ТРЪБА И КРЪВОНОСНИТЕ СЪДОВЕ Н	IA
ГЛАВА	АТА ЧРЕЗ МЕТОДИ НА ОБРАЗНА ДИАГНОСТИКА	44
2	4.7.1. Рентгенография на корозионни отливки от артериалната система	
2	4.7.2. Конусно – лъчева компютърна томография (СВСТ)	46
4.8.	. ПЛАСТИНАЦИЯ	48
	4.8.1. Пластиниране на слуховата тръба с полиестерна смола	48
4.9.	. ДИАФОНИЗАЦИЯ	50
	4.9.1. Изследване на слуховата тръба чрез диафонизационна техника	50
4.10	0. МИКРОСКОПСКА АНАТОМИЯ НА СЛУХОВАТА ТРЪБА	
	4.10.1. Хистологични методи	52
4.1	1. Ензимохистохимични и имунохистохимични методи	63
	4.11.1. Ензимохистохимично изследване за NADPH-диафоразна реактивност	63
	4.11.2. Имунохистохимична реакция за доказване на азот окис синтаза (NOS)	64
5.	ИЗВОДИ	65
6.	ПРИНОСИ	66
6.1 . (Оригинални приноси	66
6.2. I	Потвърдителни приноси	67
7.	ПРЕПОРЪКИ	68
8.	НАУЧНА АКТИВНОСТ	69
8.1.	Научни публикации	69
8.2.	Участия в научни форуми	69
9. SUI	MMARY	70

1. УВОД

Въпреки, че в литературата отдавна има данни за сходството по редица анатомични, физиологични, биохимични и имунологични показатели на домашната свиня (*Sus scrofa domestica*, L.; 1758) и човека, броят на изследванията върху този животински вид показва рязко покачване след разгадаването и публикуването на нейния геном. Това се приема за преломен момент в усилията на учените за намиране на най-подходящия модел, данните от изследванията върху който да са максимално пригодни за различни цели от предклиничната медицина и патологията на човека.

Слуховата тръба като част от средното ухо е свързващ канал между последното и носната част на глътката – назофаринкса. По нея, възпаленията на фаринкса се пренасят в средното ухо, което е съпроводено с определена симптоматика и разстройства не само във функцията на равновесно-слуховия орган, но и в по-тежки случаи, и в състоянието на организма като цяло. В подкрепа на това становище е фактът, че посредством анатомичната връзка на средното ухо с черепната кухина, възпаленията могат да се пренесат към мозъчните обвивки.

В този смисъл детайлното познаване морфологичните особености на слуховата тръба при домашната свиня несъмнено ще допринесе за обогатяване на знанията за тръбата при бозайниците и за по-обективно изясняване на редица въпроси от нормалната функция, патогенезата, и клиничната картина на разстройствата в органа като цяло. Тези данни без съмнение ще бъдат и от полза за интерпретацията на редица състояния, свързани с използване на домашната свиня като модел за възпроизвеждане на определена патология с приложимост за човека.

Ето защо предприетото изследване върху морфологичните особености и кръвоснабдяването на слуховата тръба у домашната свиня е обосновано не само по отношение на този животински вид, но и в друг, значим в социален и здравен за човека аспект.

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

2.1. Цел

Целта на настоящата разработка е да се извърши подробно морфологично изследване на слуховата тръба и кръвоснабдяването ѝ при домашната свиня чрез различни методи.

За изпълнението на целта бяха поставени следните задачи:

2.2. Задачи

1. Да се установят анатомотопографското положение и размерите на слуховата тръба на пресни нативни препарати от разрязани по медианната линия глави на прасета.

2. Да се определи скелетотопията на отливки от лумена на слуховата тръба и да се извърши тяхното измерване.

3. Да се извърши сравнително изследване на точността на корозионния метод чрез използване на интракухинна контрастна рентгенография след изпълване на тръбата с различни видове контрастни материали и смеси.

4. Да се извърши подробно изследване на артериалната архитектоника около слуховата тръба върху корозионни препарати и рентгенограми и се определят артериите, които участват в кръвоснабдяването на тръбата.

5. Да се направи сравнителен анализ на компютърнотомографски образи на артериалната система между изпълнени с контрастна желатинова смес спрямо изпълнени с акрилатна пластмаса глави, с цел визуализиране на артериите, снабдяващи слуховата тръба на модели след 3D реконструкция.

6. Да се визуализира хрущялната и костната част на слуховата тръба чрез метода диафонизация.

7. Да се опишат особеностите в хистоструктурата на стената на слуховата тръба с различни методи на оцветяване и да се направи микроморфометрична характеристика на слоевете ѝ.

8. Да се извърши сравнително изследване на мастоцитите след използване на различни методи на оцветяване.

9. Да се изследва реактивността на структурите в стената на слуховата тръба към никотинамид аденин динуклеотид фосфат – диафораза и азотен-окис синтаза.

10. Да се извърши статистическа обработка на данните от морфометричните изследвания.

3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

3.1. Използван трупен материал.

За изследванията са използвани глави от 260 броя клинично здрави прасета (Българска бяла × Ландрас), на възраст 6 месеца, с телесна маса 90 – 110 kg/b.w. Животните са заклани за консумация в лицензирана кланица (предприятие за месодобив и месопреработка, рег. № ВG 2401011) "ДИМЕС 2000 ООД", с. Хан Аспарухово, общ. Стара Загора.

След отделянето на главите от трупа в кланицата, те бяха транспортирани съобразно установените изисквания до дисекционната зала на катедра "Ветеринарна анатомия, хистология и ембриология" на Ветеринарномедицински факултет, Тракийски университет, Стара Загора (понататък за кратност споменавана като катедрата).

В залата главите бяха почиствани старателно, измивани и подготвяни за по-нататъшна обработка, в зависимост от целта на изследването и прилаганата методика.

За изпълнение на съответната методика, се използваха както цели, така и разполовени по медианните линии (*linea mediana dorsalis* и *linea mediana ventralis*) глави. Разполовяването беше извършено много внимателно с помощта на електрически трион (Bosch PFZ 700 PE, Switzerland).

Материалът за хистологично, хистохимично, ензимохистохимично и имунохистохимично изследвания беше взет и фиксиран на място ("*in situ"*), непосредствено след клането на животните и отделянето на главите.

3.2. Използвани методи.

Броят на животните, както и използваните методи, са представени в таблица 1.

	· · · · ·	3069	NUTO	3588	MATCH	SOLE INSOL	05]]] 570R
МЕТОДИ		(Дясва страва)		(Лева страва)		ИЗСЛИДВАНИ СЛУХОВИ ТРЪЗИ	NECTEDBANK SEBOTIEN
		3	P 2	3	<u>٩</u>		
1.ДН	СЕКЦИЯ НА ПРЕСЕН ТРУПЕН МАТЕРИАЛ	- 87	8	. 8	8	32	16
-2.MO	P#OMETPHS	10	10	10	10	40	20
3. CT	ГРЕОСКОПНЯ	4	4	4	4	16	8
4 80	РОЗНОНИА ТЕХНИКА ПРИЛОЖЕНА ВЪРХУ		1.1		1.0	10	, u
4.1.	лумена на тръбата с акримактилатни пластмаси	12	.12	-12	12	48	24
42	каљеоносните съдове с оканатистистисто	8	8	- 8	8	32	16+12
Ser egy		1.1	್ಷ	- C.	<u>~</u>		
5. PE	TTEHOTPA # HR	1 2	<u> </u>		1.2	<u>,</u> 10	2
5.1.°	понтрастна рентесно грария на лумена на слухова тръба (РвзО4)	<u> </u>		1	<u></u>		50 20
52	Контрастна рентесно графия на кръеоносни съд осе (Pb3O4)	2.2	2	2	2	1	4+1 9
53	Рентгенография на корозионни отиеки от лу мена	6	6	6	6	24	12
	на слуховата тръба отакрилатна пластиласа на		1.00		1 - 1		
	препарати със запазени кости		, ·				
5.4.	Рентгенография на корозионни отлиени от	- 8	8	.81	8	32	16
	кръеоносни съдове с акрилакрилатна пластиласа	1. J. 1. 1.	1.00		1911		
6.K0	МПЮТЪРНА ТОМОГРАФНЯ НА ГЛАВА		a		<u>.</u>	a	4
6.1.0	Конусно — лъчева компотърна томография (CBCI) —	2	2.	2	2-		4
-7. HB I	ТЪЛВАНЕ СЪС СИЛИКОНОВИ ЕЛАСТОМЕРИ						
7.1.	Изпълване със силиконов властомер	- 4.	4	:4	4	16	8
	(Elite Double-22) луменана слуховатръба през ostium		1.00	10.12	1000	1997 A.	
	pharingeum tubae auditivae						
.7.2	Изпълване със силиконов властомер	<u>4</u> ~	:4	:4:	: 4	16.	8
	(A-silicone) думена на слухова тръба		· .				
	npes meatus acusticus externus		1			- 	
73	Изпълване със силиконов властомер	- 6	- 6	്റ	6	24	125
	(Elite Double-22) на кръеоно сните съдове на глава		1.1				
8. HBI	ТЪЛВАНЕ С ТУШ – ЖЕЛАТИН						
8.1	Изпълване на кръеоносните съдоев на глава с ту ш и	4	4	4	4	16	8
	CONTRACTOR A CONTRACTOR A		30 - D		·	54 C	2
<u>.9.дл.</u>	АФОНИЗАЦИОННА ТЕХНИКА	1 2	1.2			24	10
.9.1.0	Диафонизация на слуховатрио а	0.0	10	:0,	- D	24	12:
10.JL	АСТИНАЦИОННА ТЕХНИКА	-	1 2	-	<u>_</u>	, j	<u></u>
10.1	Пластинация на слуховатръра в поливстврна с жола	-2^{2}		2	2-	, ,8 .	4
<u>11.H3</u>	РАБОТВАНЕ НА ХИСТОЛОГИЧНИ ПРЕРПАРАТИ					24	10
11.1.	Сцевтоване с лежатокашия – Еозия	0	0.0	0	0	24	12:
112.	Листохимично изследеане за доказване на	8.	- 8	. 8.	8	32	10
112	металрожания толуцоиново синьо	. 4		4	4	16	
115.	даналалия на канания натичном настичном	4	4	- 4	4	10	ீ
	дананелиние фананелиние		· .				
11.4	улурунцания Кистохиления извеедерие за дохозвоне на тисери	2	2	2	2	10	6
11.4.	mannen a Annancea anna - Cadeann	200	1.00	20.	(CD)	12	0
11.5	Паказване на калагенни влакна па Ван Гизан	3	3	3	3	12	6
116	Лахазване на властични власна с Отнон	1 2	1.5	2	12	2	Ă
12 12	PHUONICTONNANNAN METODA	<u>,</u> 4,	1 4 1	<u> </u>	<u> </u> ^▲	101	ד,
12.1	Блаколано голлани чин тавгоди. Екзимахистахимична изследеане, за МАДРН —	6	6	6	6	24	12
	диафораза	1 .00	1,000	1000	1,00	47 ·	14.
13 17	АУНОХИСТОХИМИЧНИ МЕТОЛИ	1			1		
13.1.	Имунохистолимично изследеане за NOS	4	4	4	- 4	16	. 8
14.31	- РЕКОНСТРУКИНЯ				· ·		Ŭ Ŭ
14.1	Създаване на триизмерен компютърен образ на	1	ð	1	2	·	2
	тьериасните съдовете на главата	1 -		1 ⁻ 1			-

Таблица. 1. Използвани методи на изследване и разпределение на пробите от животни

> Общ брой изследвани животни: 260

Общ брой изследвани слухови тръби: 380

3.2.1. ДИСЕКЦИЯ НА ПРЕСЕН ТРУПЕН МАТЕРИАЛ

3.2.1.1. Дисекция на разполовени глави и морфометрично измерване на слуховата тръба "*in situ*".

След почистване на разрезната повърхност на надлъжно разполовени 16 броя глави от 8 мъжки и 8 женски прасета се пристъпи към дисекция на тъканите около слуховата тръба. След това тя беше отделена внимателно от костния полуканал (*semicanalis tubae auditivae*) на *pars tympanica* на слепоочната кост чрез метод, разработен по опитен път от нас и адаптиран за целта на изследването (вж. Резултати).

След изваждането на главния мозък (без хипофизната жлеза – hypophysis) се извършваше препариране на меките тъкани при каудалния край на слуховата тръба, под pars basilaris на тилната кост и corpus ossis basis sphenoidalis на клиновидната кост. Съдовете, нервите и мастната тъкан бяха отстранени така, че да бъдат разкрити: медиалната повърхност на bulla tympanica, както и проксималната, медиална част от стилохиоида на подезичния апарат. Лигавицата в дорзоростралния край на ostium pharyngeum tubae auditivae се препарираше като се внимаваше да не бъде нарушена целостта на отвора. (Отворът трябваше да се отдели така, че двата му края да извършват лека ротация в противоположни посоки под ъгъл 25-30° спрямо надлъжната ос на тръбата).

Меките тъкани латерално на *tuba auditiva* и особено мускулите (*m. tensor veli palatini* и *m. levator veli palatini*) не се препарираха с оглед да придържат тръбата в нормално анатомотопографското положение.

За отстраняване на костен фрагмент от разполовеното тяло на клиновидната кост (базисфеноида) с цел изваждане на слуховата тръба използвахме две взаимно пресичащи се проекционни линии, започващи от определени стандартни точки – A, H и St (von den Driesch, 1980).

Първата линия свързва точка "A" (Akrokranion), с най-изпъкналата точка на *tuberculum musculare*, намираща се на 20 mm каудално от точка "H" (Hormion), като минава през *synhondrosis sphenooccipitalis* (при възрастни свине през костния шев), непосредствено зад *sella turcica*.

Втората линия започва от точка "St" (Staphylion), преминава през synhondrosis intersphenoidalis между тялото на базисфеноида и пресфеноида на клиновидната кост. След това минава през rete mirabilae epidurale rostrale точно зад хипофизата и пред върха на dorsum sellae, продължава по свободния ръб на tentorium cerebbelli membranaceum до protuberantia occipitalis interna.

След направен разрез се отделяха костните фрагменти по описаните линии, съвпадащи точно със синхондрозните свързвания на костите (при стари свине, чрез разрез на костите по техните костни шевове). С леко проникване и завъртане на върха на ножа в направения: 3-4 mm в дълбочина, разрез в

synhondrosis sphenooccipitalis и разклащането му, костния фрагмент се отстраняваше, осигурявайки визуален контакт със запазените слухова тръба, костен канал на слуховата пирамида и чудната мрежа на *a. carotis interna*.

С помощта на скалпел се отстраняваше твърдата мозъчна обвивка (*dura mater*), покриваща каменистата част (*pars petrosa*) на слепоочната кост (*os temporale*). С върха на скалпела, поставен близо до мястото на излизане от черепната кухина на триделния нерв (*n. trigeminus*), с умерен натиск в посока назад и нагоре се отделяше каменистата част на слепоочната кост.

По такъв начин се откриваше кухината на средното ухо (*cavum tympani*) с прилежащите й структури. След внимателното им отпрепариране беше направено подробно анатомично описание на находките.

3.2.2. МОРФОМЕТРИЯ

На препарирани по описания по-горе метод разполовени глави от 20 броя прасета (10 мъжки и 10 женски) бяха извършени морфометрични измервания "*in situ*" на слуховата тръба. Измерванията се отчитаха с дигитален дебеломерен-микрометър (Digital Caliper, LOUISWARE Electronic Stainless Steel Vernier Caliper 150 mm/0-6 Inch Measuring Tool with Extra-Large LCD Screen-Inch/Millimeter Conversion, ROSIMO, China), с точност на измерването 0,02 mm.

3.2.3. СТЕРЕОСКОПИЯ

На 8 броя разполовени глави от прасета (4 мъжки и 4 женски) беше извършено стереоскопско изследване на фарингеалния отвор (*ostium pharyngeum tubae auditivae*) на слуховата тръба и част от фарингеалната стена, за установяване на неговата форма, размер и наклон. Наблюденията и документирането на изследваните параметри се извърши със стереомикроскоп MEC – 10 (USSR) и дигитален стереомикроскоп (Leica S9i 10×23, Microsystems, Switzerland), камера -TM69, Leica S9i Stereozoom) и софтуерна програма за анализ (LAS X 5.1.0, Leica Microsystems, Switzerland).

3.2.4. КОРОЗИОНЕН МЕТОД

3.2.4.1. Изпълване лумена на слуховата тръба с акрилатна студенополимеризираща пластмаса.

За изпълване лумена на слуховата тръба беше използван химически иницииран полимер, Duracryl[®]Plus (O), (Spofa Dental, Czech Republic). Броят на използваните животни е отразен в **таблица 1.**

3.2.4.2. Изпълване артериалната система на главата и изготвяне на трайни корозионни препарати за изследване кръвоснабдяването на слуховата тръба.

На 16 броя цели глави от прасета (8 мъжки и 8 женски) беше извършено изпълване на артериалната система на главата. За всяка глава беше използвана студенополимеризираща базисна смола (Duracryl[®]Plus, Spofa Dental, Czech Republic), със следната пропорция на смесване на двете компоненти: – 1 част (Duracryl[®]plus U, powder, Spofa Dental, Czech Republic) се смесваше с 5 части течна фаза (Duracryl[®]plus, solution, Spofa Dental, Czech Republic).

След смесването на двата компонента на смолата по установена по опитен път от нас и препоръчвана за тази цел прескрипция – 1:5 в полза на течната фаза, се извърши хомогенизиране "*ex tempore*" в продължение на 1 min. За по-лесно различаване на отливките по пол беше добавен по 0,1 g/100 ml течна фаза от смолата син пигмент (Orasol Blue GN 825, powder, Northern West Stuff, USA) за мъжките и червен пигмент по 0,5g/100 ml течна фаза от смолата (Neozapon Red 365, powder BASF, Germany) за женските индивиди, като към червения пигмент се добавяше и флуоресцентен прах по 0,01g/100 ml червено оцветена течна фаза (Rhodamine 6G, powder, Sigma-Aldrich, USA).

Синият и червеният пигмент непосредствено преди оцветяването бяха предварително разтворени в 2 ml абсолютен алкохол, а флуоресциращия – в 2 ml дестилирана вода, и след това добавени в мономера на акрилатната пластмаса, преди самото ѝ въвеждане в кръвоносните съдове.

От така оцветената акрилатна смес бяха въведени по 120 ml във всяка обща сънна артерия. За избягване на нежелана бърза полимеризация на смолата от самозагряването ѝ (екзотермична реакция) се извършваше предварително охлаждане на течната компонента в хладилник при 4°С. По такъв начин, при бавно въвеждане се постигаше качествено изпълване на артериалната система.

Инжектирането се осъществи под умерено налягане чрез използване на приспособен за целта инжекционен винтов механизъм, показан на **фигура 1**.



Фиг. 1. Инжекционен винтов механизъм за мануелно въвеждане на полимери и силиконови еластомери под налягане. 1 – резбови вал, 2 – бутало, 3 – подвижен ограничител, 4 – свързващ елемент, 5 – допълнителен работен плот. Линия =100 mm.

Постоянната скорост на движение на буталото (2) се осъществявяваше чрез завъртане на резбови вал (1) с 0,25 грm/sec (Фиг. 1). Тази скорост на въвеждане беше установена от нас по опитен път, като оптимална.

Въвеждането на сместа във всяка сънна артерия се извършваше последователно, като се спираше притока на акрилатната смес по катетъра на всеки 30 ml чрез притискането му с хемостатичен пинсет за 10 sec. Количеството беше достатъчно, за да изпълни съдовете изцяло, след което съответната артерия незабавно се клампираше (за предотвратяване на смолата). Не бяха използвани автоматична обратното изтичане на инжекционна помпа и по-високо налягане, тъй като те обикновено причиняват образуване на мехурчета. Последните след попадане в съдовете могат да доведат до дефекти отливката или предизвикат изтичане на сместа чрез разкъсване на околните кръвоносни съдове. След това препаратите бяха поставени в 0,5% разтвор на формалин за 14 дни на стайна температура до пълната полимеризация на изпълващия материал.

Четири часа след изпълването, вискозитета на сместа се повишаваше достатъчно и се пристъпваше към внимателно отстраняване на кожата, като бяха оставяни малки полета от нея около очите, клепачите, областта на ушите и ноздрите. Непосредствено след това главите бяха потопени във пластмасова вана с воден разтвор от 1% калиева основа (КОН) и 0,5% натриева основа (NaOH) в съотношение 1:1 за 5 дни при температура на разтвора 45-47°C, за разграждане (мацерация) на меките тъкани. Непосредствено след това те бяха разрязвани по медиалната линия.

След тази процедура 16 отливки от 8 броя разполовени глави от 4 мъжки и 4 женски прасета бяха промити на бавно течаща чешмяна вода (*aqua fontana*) и поставени в пластмасов съд, пълен с вода при добавяне на 30% водороден пероксид (H_2O_2) в дозата 2,5 ml/1L H_2O . После те бяха отново промити с вода, разрязани по медианната линия чрез използване на ръчен трион и поставени в съд с 36% солна киселина (HCl) за 40 дни. След пълното разграждане на цялата органична материя, осапунените участъци и костите, отливките бяха отново промивани с чешмяна вода с добавяне на малко количество (2 ml/L H_2O), детергент (VANISH[®]Oxi Action, Reckitt Benckiser, EU), а след това почистени и подсушени.

Другите 16 отливки от 8 броя разполвени глави от 4 мъжки и 4 женски прасета бяха запазени с костните структури. Те не преминаваха през етапа на поставяне във вана с 36% HCl. След това отливките бяха отново промивани с чиста питейна вода във вана с добавка на малко детергент, без да се оставят да изсъхнат. Непосредствено след това те бяха разрязани по медианната линия чрез използване на ъглошлайф, почиствани и изсушавани на стайна температура за 24 h.

Диаметърът на отливката от калибъра (лумена) на възходящата небцова артерия беше измерен посредством калиброван със стандартен обект микрометър (Carl Zeiss – Jena) окуляр микрометър на стереоскоп MБС – 10 (USSR), с точност 0,01 mm.

Получените данни за дясната и лявата артерия при мъжките и женските животни бяха обработени с методите на вариационната статистика.

3.2.5. РЕНТГЕНОГРАФИЯ

3.2.5.1. Контрастна рентгенография на лумена на слуховата тръба.

С наситен разтвор на триоловен тетраоксид (Pb_3O_4) в затоплен 10% воден разтвор на желатин (40°С) бяха изпълнени през фарингеалния отвор (*ostium pharyngeum tubae auditivae* – OPHTA) слуховите тръби на разполовени глави от 6 прасета (3 мъжки и 3 женски). След това, всички препарати бяха групирани и подредени по пол и страна, и позиционирани така че отвора на слуховата тръба да се намира в хоризонтално положение. През OPHTA във всяка тръба беше инжектиран по 1,8 ml от наситения разтвор до свободното му изтичане през отвора. Накрая, пространството около самия отвор беше почистено от останала извън него втвърдена смес. След 4 h престой на стайна температура бяха изговени рентгенограми в медио-латерална проекция на всяка половина от главите, като беше използвана рентгеноогичната техника на ВМФ, ТрУ, Стара Загора. стационарен рентгенов апарат TUR 800D-1 (Röntgenbelichtungsautomat-20029, Dresden) и дигитайзер iQ – CR ACE. Софтуер: iQ – VIEW Version 2.7.0 BETA INT EN 002R; Copyright[©]2006-2011 IMAGE Information Systems Ltd.

3.2.5.2. Рентгенография на корозионни отливки от артериите на глава след изпълване с акрилатна пластмаса (Duracryl[®]Plus).

На 16 корозионни отливки от кръвоносните съдове с отстранени кости на 8 мъжки и 8 женски прасета бяха направени рентгенограми със същия апарат от 4.2.5.1. на лумена на слуховата тръба.

3.2.5.3. Рентгенография на препаратите със запазени кости на главата и изпълнен лумен на слуховата тръба с акрилатна пластмаса (Duracryl[®]Plus).

На препаратите от корозионни отливки от 12 броя прасета (6 мъжки и 6 женски) на кръвоносните съдове със запазена кост бяха направени рентгенограми на разполовени по медианната линия глави в медио-латерална проекция със същия апарат от "Рентгенографията на лумена на слуховата тръба".

3.2.6. КОМПЮТЪРНОТОМОГРАФСКО ИЗСЛЕДВАНЕ

3.2.6.1. Конусно – лъчева компютърна томография (СВСТ)

Като материал бяха използвани глави на 4 броя прасета (2 мъжки и 2 женски) взети непосредствено след клането. Приблизително 20 h след това артериалната система на главите беше промита с дестилирана вода през общите сънни артерии за отстраняване (изтичане) на остатъчната кръв през яремните вени, както и да бъдат отстранени кръвните съсиреци. Главите бяха инжектирани с наситен разтвор на триоловен тетраоксид (Pb_3O_4) в доза 120g (Pb_3O_4) на 100 ml 10% воден р-р на желатин загрят до 40°С. За въвеждане на желатиновата смес беше използвана описана по-горе методика (вж. 4.2.4.2.).

След инжектирането, препаратите бяха сканирани с помощта на конусно-лъчев 512-срезов компютърен томограф Fidex I (Fidex, 107 Animage LLC, California, USA) на ВМФ, ТрУ, Стара Загора. След извършване на процеса на сканиране всички изображения бяха обработени и прехвърлени на компютър, позволяващ процеса на сегментиране подходяш на 2D изображенията, които бяха споделени в софтуерната програма 3D Slicer (3D 113 Slicer, версия 4.11.0, GitHub, San Francisco, USA). За някои от компютърнотомографските изследвания беше използван томограф с 32-срезов апарат Somatom Go Now (Siemens, Germany), базиран в отделението по Образна диагностика към Университетската ветеринарна болница, на Ветеринарномедицинския факултет приТракийски университет.

3.2.6.2. Триизмерна реконструкция – 3D компютърен образ на кръвоносните съдове на главата.

Върху 1 корозионен препарат на кръвоносни съдове от цяла глава със запазени кости и 1 препарат от глава изпълнена с контраст (наситен с Pb_3O_4 10% р-р на желатин), на конусно-лъчев 512-срезов компютърен томограф Fidex I (Fidex, 107 Animage LLC, California, USA) бяха направени сегментирани скенограми и създадени модели за 3D реконструкция през всички нива на напречната и сагиталната равнини на главата. При сегментирането на главата скелетът и артериите бяха изобразени във всяка секция на отделни стойности в сивата скала, за да разделят различните тъкани. След ръчното сегментиране на скелета на главата и артериите, 3D компютърните модели бяха създадени един по един. Впоследствие постсегментационния процес беше извършен върху 3D цифрови модели със Софтуер Meshmixer (Autodesk Inc., San Francisco, Version 3.5). Крайните 3D модели на скелета на главата и артериите да скелета на главата и артериите и селета на главата и артериите деяте и селета на скелета на главата и със Софтуер Meshmixer (Autodesk Inc., San Francisco, Version 3.5). Крайните 3D модели на скелета на главата и артериите и селета на главата и артериите за скелета на главата и артериите и селета на главата и артериите от селето селето и със софтуер Мезhmixer (Autodesk Inc., San Francisco, Version 3.5). Крайните 3D модели на скелета на главата и артериите бяха реализирани след прилагане на корекции.

3.2.7. ИЗПЪЛВАНЕ СЪС СИЛИКОНОВИ ЕЛАСТОМЕРИ

3.2.7.1. Изпълване лумена на слуховата тръба с Elite Double (22 Shore) и изготвяне на отливки от него.

Разполовените глави на 4 прасета (2 мъжки и 2 женски) бяха позиционирани за изпълване, като ОРНТА на всяка слухова тръба беше почистен и ориентиран хоризонтално върху работната маса. Чрез поставен гумен накрайник на спринцовка от 20 ml във всяка слухова тръба (дясна и лява), беше направено промиване на лумена им с изотоничен разтвор на NaCl и позициониране на всяка половина във вертикално положение при което ОРНТА на тръбата да е под ъгъл 45° спрямо хоризонталната повърхност за свободно изтичане на разтвора от отвора. След това всяка половина беше поставена в хоризонтална позиция така, че ръбът на отвора към фаринкса да е в хоризонтално положение, а самото изпълване беше извършено чрез въвеждане по 1,8 ml от акрилатната пластмаса (Duracryl[®]Plus, Spofa Dental, Czech Republic) или силиконов еластомер (Elite Double 22 Shore, Zhermack, Italy) в лумена на всяка тръба. Това количество за изпълване на лумена на тръбата беше неколкократно установено по опитен път чрез премахване на pars petrosa и наблюдаване степента на изпълване до входа в тъпанчевата кухина със стереоскоп (MБС-10, USSR). Това количество беше установено като оптимално и при изпълване с желатин.

При прилагането на силиконовия еластомер за женските индивиди беше използван зелен цвят, а за мъжките (син цвят) се добавяше 1 капка синя акрилна боя към базата от 1,8 ml стандартен еластомер. След хомогенизиране на боята беше прибавен ксилен в съотношение 1:0,5 в полза на базата, а непосредствено преди изпълването се добавяше катализатор в съотношение 1:1 спрямо смесената с ксилен база.

След престой за 30 min при стайна температура, всяка една от отливките беше внимателно извадена от лумена с леко въртеливо движение и оставена под стъкло за 24 h. Получените отливки бяха измерени с дигитален дебеломерен микрометър (вж. по-горе).

3.2.7.2. Изпълване кухината на средното ухо и лумена на слуховата тръба през външния слухов проход с A-silicone (Perfect-F Light Premium-set).

С цел постигане на по-голяма прецизност на изследването беше използван ново поколение адитивен силикон с повишена хидрофилност и нисък вискозитет (Perfect-F Light Premium-set, Type 3, Han Dae Chemical-Korea), въведен през *meatus acusticus externus* с помощта на картюша със смесителен накрайник и специализиран пистолет. На 4 разполовени глави от 2 мъжки и 2 женски прасета около фарингеалния отвор на тръбата беше нанесен тънък слой цианакрилатно лепило и залепено парче пропиленово фолио за него така, че да бъде ограничено изтичането на силикона от лумена на тръбата. След престой от 10 min готовите препарати бяха поставени в 10% КОН при 55°C за 24 h.

Получените след това отпечатъчни препарати се отличаваха с изключителна отчетливост на детайлите относно вътрешната повърхност на тръбата, а също така и нейната проекция поради по-високата твърдост на този вид силикон и неговата тиксотропност.

3.2.7.3. Изпълване артериалната система на главата с Elite Double (22 Shore) и изготвяне на влажни препарати.

За всяка глава от 6 броя мъжки и 6 броя женски прасета беше използван силикон – Elite Double (22 Shore, Zhermack, Italy) със следната пропорция на смесване на двете компоненти – 1:1 и след хомогенизиране на сместа главите бяха изпълнени по начина, описан при акрилатната пластмаса. След 30 min престой всяка глава беше разполовена с помощта на електрически трион на две симетрични половини по описания по-горе начин и почистена за последваща дисекция на изпълнените съдове.

3.2.8. ИЗПЪЛВАНЕ С ТУШ – ЖЕЛАТИН

3.2.8.1. Изпълване на кръвоносните съдове с туш – желатин

На всяка от главите, от 4 броя мъжки и 4 броя женски прасета непосредствено след отделянето ѝ от трупа в кланицата, бяха поставени катетри на дясна и лява сънни артерии, а самите те лигирани и фиксирани към катетъра. Непосредствено след това се извърши перфузия на съдовете чрез въвеждане в тях на затоплен (37°С) изотоничен разтвор на NaCl, до изтичане на бистър разтвор през съответната яремна вена (v. jugularis).

За всяка глава беше използван 10 % воден разтвор на желатин, оцветен с черен туш (Чёрная тушь, морозоустойчивая до -20°С, Московский завод художественных красок, Министерство химической промышленности, СССР). През всяка сънна артерия беше въвеждан по 120 ml предварително затоплен до 37°С 10 %-ов воден разтвор на желатин с добавен туш в количество 0,4 /100 ml желатинов разтвор.

Въвеждането се извършваше под налягане чрез използване на инжекционния механизъм (фиг 1).

След приключване на изпълването, всяка обща сънна артерия беше клампирана, а главите оставяни за 4 h при стайна температура за последваща дисекция.

3.2.9. ДИАФОНИЗАЦИЯ

3.2.9.1. Диафонизиране на слуховата тръба и прилежащите ѝ структури.

Веднага след машинното разполовяване на 12 глави от 6 мъжки и 6 женски прасета в кланицата, те бяха поставени в контейнери и пренесени в хладилна чанта до дисекционна зала на катедрата. Чрез дисекция бяха взети слухови тръби от 3 мъжки и 3 женски прасета с част от околните тъкани които бяха обозначени по страна и пол. На други 3 мъжки и 3 женски прасета слуховите тръби бяха взети с част от базисната повърхност на тилната кост и част от слепоочната кост, с включена цялата *pars petrosa* и *bulla tympani*. След промиване с чешмяна вода за 30 min, препаратите бяха поставени в дестилирана вода за 96 h, промити на течаща вода за 5 h с последващо поставяне в дестилирана вода за 10 min.

След това препаратите бяха изработени по следната адаптирана от нас за тази цел методика (установена по опитен път) както следва:

Депигментиране и дехидратиране

Депигментиране (избелване) на тъканите се извърши в разтвор от 0,25% водороден прероксид (H_2O_2) и 0,5% калиева основа (КОН) за 2 h, с последващо промиване в дестилирана вода за 30 min, а дехидратиране - чрез поставяне на препаратите в 90° етанол до потъването им на дъното на съда.

Оцветяване с Alcian blue 8GS

След това, за оцветяване на хрущялните структури препаратите бяха поставени в спиртен (96°) разтвор на алцианово синьо (Alcian blue 8GS, powder, Sigma) и ледена оцетна киселина (Acetic Acid (Glacial) 100%, Merck) с pH 1,6-2,0 за 24 h при стайна температура. Разтворът се приготвяше чрез смесване на етанол (96°) и ледена оцетна киселина в съотношение 3:1 и добавяне на Alcian blue 8GS (Merck, Germany) в доза 0,15g/100 ml.

Извадени от този разтвор, препаратите бяха поставяни за 12 h в разтвор за неутрализиране на киселото pH, приготвен от една част наситен разтвор на натриев тетраборат (Na₂B₄O₇10H₂O) и две части дестилирана вода.

Ензимно третиране

За постигане на прозрачност на тъканите препаратите се поставяха в 1,5% разтвор на трипсин (свински), приготвен след смесване на наситен разтвор на $Na_2B_4O_710H_2O$ с дестилирана вода в съотношение 1:2 (pH 8,0) за 72 h на стайна температура.

Оцветяване с Alizarin Red S

Работния разтвор беше приготвен като към 0,5 % воден разтвор на КОН, разтворена в *aqua destillata*, беше добавен Alizarin red S (Merck,

Germany) в доза 0,01g/100 ml, като препаратите престояваха в него за 30 h при температура 25°C.

Допълнителна обработка в 0,5% КОН и глицерол

На следващия етап препаратите се поставяха последователно в смес от 0,5 % КОН и глицерол в съотношение, както следва – 1:1 за 48 h при стайна температура, 1:2 за 72 h при същата температура, и само в глицерол за 7 денонощия при 28°С.

След това препаратите бяха извадени от разтвора, отцедени внимателно и поставени върху матирано бяло стъкло. За детайлна визуализация на хрущялните и костните структури, под стъклото при нужда се подаваше допълнителна светлина. Накрая, препаратите (обработените слухови тръби) бяха измерени старателно с посочения по-горе дигитален дебеломер и фотодокументирани чрез дигитална камера (Nikon Coolpix L23, Japan).

3.2.10. ПЛАСТИНАЦИЯ

3.2.10.1. Пластиниране на слуховата тръба и прилежащите ѝ структури в полиестерна смола Norsodyne[®]O 12335 AL.

Използвани са 4 глави от 2 мъжки и 2 женски прасета. Преди надлъжното разполовяване с електрическия трион главите престояваха за 24 h в хладилна камера при -1C°. На всяка половина от главите на 1 мъжко и 1 женско прасе бяха направени сагитални срезове (плочи) с размери 120×120×18 mm (височина×ширина×дебелина). Плочите бяха взети с част от околните тъкани, групирани на десни и леви с обозначен пол, а разрезната повърхност почистена. На други 2 прасета (мъжко и женско) бяха направени надлъжни срезове с размери 90×20×2 mm (дължина×ширина×дебелина) през точно определена хоризонтална равнина перпендикулярна на медианната равнина минаваща през точките "St" (Staphylion) и "H" (Hormion), (von den Driesch, 1980), а впоследствие включени в полимерни блокчета. Всеки от така направените срезове беше промит на течаща вода за 60 min и поставен в 10% воден разтвор на неутрален формалин за 10 дни (с последващо кратко промиване на течаща вода). След това се поставяше последователно в етанол 70° за 24 h и 95° за 48 h, и ацетон (р.а., Е. Merck, D-6100 Darmstadt, F. R. Germany) за 72 h, с трикратна смяна. Така обработените препарати бяха поставени в ортофталова полиестерна смола – Norsodyne[®]O 12335 AL, (Polynt Group, Italy) под вакуум с последователно повишаване на отрицателното налягане до -0.8 bar., за 30 дни, като базисната смола без катализатор беше подменяна на всеки 10 дни. След потъване на препаратите на дъното на съда, те бяха премествани в подходящи пластмасови съдове със смола с добавен катализатор (Luperox K4CE) в съотношение 0,02:1 за 20 min при стайна температура и налягане -0,3 bar, и накрая за още 30 min при -0,4 bar.

Импрегнираните препарати бяха оставени за окончателно втвърдяване за 5 денонощия при термостатна температура 35° C. След изваждането им те бяха оформени в полимерни блокчета с помощта на контурен трион (HECHT-8916, 120 W, 50 mm, Czech Republic). За допълнително позициониране и визуализиране на желаната повърхност на всяко блокче беше използван лентов шлайф (Einhell TC-US 400, Sandpaper-K 120, Germany). След допълнително оформяне надлъжните срезове с размери ($90 \times 20 \times 20$ mm) бяха включени трайно в полимерни блокчета ($110 \times 60 \times 20$ mm), които след 5 дни престой на стайна температура бяха заснети и анализирани. Друга група срезове, които не бяха включени в полимерни блокчета, бяха оставени като пластинати.

ХИСТОЛОГИЧНИ, ХИСТОХИМИЧНИ, ЕНЗИМОХИСТОХИМИЧНИ И ИМУНОХИСТОХИМИЧНИ МЕТОДИ, ИЗПОЛЗВАНИ ПРИ СВЕТЛИННОМИКРОСКОПСКИТЕ НАБЛЮДЕНИЯ.

За изследване на микроскопската анатомия и хистологичните особености на слуховата тръба, както и някои особености, свързани с реактивност към субстанции, намиращи се в определени клетки, в екстрацелуларния матрикс, съдове и нерви, бяха използвани различни методи.

Броят на изследваните животни, при отделните методи, както и общият им брой е отразен в **таблица 1**.

Непосредствено след клането и разполовяването на главите бяха взети късчета от трите части на слуховата тръба – фарингеална, средна и тимпаникова (тясната част към тимпаниковия отвор), чрез разрязването й напречно на три равни сегмента с големина 0,5-1,5 mm³. Материалът беше фиксиран веднага в един от следните фиксатори: 10% неутрален формалин, течност на Carnoy или смес на Bouin, като продължителността на фиксацията зависеше от съответния фиксатор и плътността на материала – до 24 h (формалин) и от 2 до 4 h за останалите два фиксатора.

Следваше промиване на течаща вода, обезводняване във възходяща етанолова редица, просветляване в ксилен и включване в парафин. На шейновиден (Reichert, Austria), полуавтоматичен (Leica RM2245, Heldelberger, Germany) и замразяващ (MTC Table Cryostat, SLEE, Mainz, Germany) микротоми бяха изготвени срезове с дебелина 5-7 µm, които бяха оцветявани по различните методики, описани по-долу.

3.2.11. ИЗРАБОТВАНЕ НА ХИСТОЛОГИЧНИ ПРЕПАРАТИ

3.2.11.1. Оцветяване с Хематоксилин (по Erlich) – Еозин

3.2.11.2. Оцветяване с толуидиново синьо за доказване на метахромазия.

Използван беше 0,1% разтвор на толудиново синьо (Toluidin blue, Rieded – de Haën AG, Leelze, Germany, в буфера на McIlvane - pH 3,0 (Pearce, 1960) за доказване на метахромазия.

3.2.11.3. Оцветяване с берберин сулфат за доказване на хепарин позитивни мастоцити чрез флуоресценция.

Използван беше 0,1 % разтвор на барберин – Berberine (Berberine Neutral sulfate, Sigma – Aldrich Chemie, Gmbh, Steinheim, Germany), за доказване на хепарин съдържащи мастоцити (Xu et a., 1993). Наблюдението е извършено със светлинен/флуоресцентен микроскоп Leica DM 1000 в режим на флуоресценция – Fluorescein isothiocyanate (FITC) с дължина на вълната за екстенционен (възбуждащ) и емисионен (задържащ, бариерен) филтри съответно 355-425 nm и 470 nm. отразяващо огледало (Бихроматично огледало) 455 nm. дългочестотен филтър (Longpass (LP) 470 nm).

3.2.11.4. Оцветяване с алцианово синьо – сафранин за доказване на биогенни амини, гликозаминогликани и сулфатирани муцини.

Използван беше разтвор на Алцианово синьо-сафранин с pH 1,0, 1,42 и 2,5 за доказване на биогенни амини и гликозаминогликани (сулфатирани и карбоксилирани), както и сулфатирани муцини (Pearce, 1960, Mowry, 1963, Csaba, 1990).

3.2.11.5. Оцветяване по Ван Гизон (Van Giesson).

3.2.11.6. Оцветяване с орцеин за доказване на еластични влакна.

3.2.12. ЕНЗИМОХИСТОХИМИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ

3.2.12.1. Ензимохистохимично (ензимохимично) изследване за доказване на никотинамид аденин динуклеотид фосфат – диафораза (NADPH-d) по метода на Sherer – Singler et al. (1983).

Късчета с големина около 1 cm³ бяха взети от трите части на слуховата тръба веднага след клането на животните и фиксирани в 4% параформалдехид (Paraformaldehyde, Sigma Aldrich Chemie, Switzerland) във фосфатен буфер (PBS), pH 6,9 и транспортирани в хладилна чанта до лабораторията на катедрата. Там те престояваха в хладилник при 4°C за 24 h, а след това

промити с 0,01 M PBS, pH 6,9. От тях бяха направени криостатни срезове с дебелина 15-20 µm и свободно плаващите в термостатна вана срезове бяха обработени по метода на Sherer-Singler (1983) за NADPH-d хистохимия. Инкубирането беше извършено в разтвор, съдържащ 0,2 mg/ml nitroblue tetrazolium (NBT) (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Germany), 1 mg/ml β -NADPH (Sigma Aldrich Chemie, Switzerland) и 0,5% Triton X-100 (Merck Belgalabo, Overisje, Belgium) за 1 h при 37°C в термостат. След появата на стандартния цвят бяха извършени две промивания: първо в 0,1M Tris, HC1 и второ, в 0, 01 M PBS.

3.2.13. ИМУНОХИСТОХИМИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ

3.2.13.1. Имунохистохимично (имунохимично) изследване за доказване на азот окис синтаза (NOS) по ABC метода.

Материалът е фиксиран веднага след клането на животните в 10% неутрален формалин (Merck, Darmstadt, Germany) за 48 h, след което дехидратиран във възходяща етанолова редица, просветлен в ксилен и включен в парафин. Монтираните на предметни стъкла срезове с дебелина 5-6 µm бяха обработени по Avidin-Biotin Complex метода за имунохистохимия (имунохимия) с демаскиране на антиген в 0,01 М цитратен буфер, рН 6,0 (Atanassova et al. 2006, Stefanov and Atanassova, 2011). Срезовете в началото бяха третирани с 3% (w/v) водороден пероксид (H_2O_2) в метанол и след това блокирани с нормален свински серум с 5% BSA (Sigma Chemical A3425, St Louis, MO, USA). Първото инкубиране се извърши в първично универсално антитяло - заешка анти-азот оксид синтаза универсална (N-217, Sigma-Aldrich, Chemie Gmbh, Germany) за откриване на трите NOS изоформи: невронална, ендотелна и индуцируема (индуктивна) в разреждане 1:100, за 24 h при 4°С. Последващото инкубиране се извърши със свински антизаешки биотинилиран IgG (DAKO E0353 Glostrup, Denmark) и ABC-HRP (DAKO; K0355, Glostrup, Denmark). Позитивирането на реакцията се проведе с диаминобензидин (DABтечна, DAB + субстрат-хромогенна система), (DAKO; K3468, Glostrup, Denmark) и се контролираше под микроскоп, след което се спираше във вода. След това последва контрастно оцветяване с хематоксилин (Harris), дехидратация и покриване с монтажна среда Pertex (CellPath pic). Отрицателните контроли се провеждаха без първичното антитяло или след предварителна абсорбция с имуногенен пептид в съотношение 1:10.

Контролите бяха извършени за изключване на възможности за опорочаване на резултатите чрез кръстосана реактивност и имунологични взаимодействия. Всички контроли бяха отрицателни.

3.2.14. СТАТИСТИКА

3.2.14.1. Статистически анализ

Данните от извършените микроморфометрични изследвания бяха обработени от GraphPad Prism 6 for Windows (GraphPad Software, Inc., USA) чрез статистически анализ използвайки ANOVA, последван от Tukey-Kramer post-hoc тест и са представени като средни стойности±стандартно отклонение (SD). Р-стойностите <0.05 са отчетени за статистически значими.

Статистическият анализ на данните, получени от макро и микрометричните изследвания беше направен и чрез използването на програмен продукт StatMost for Windows, Student t-test. За определяне на средните стойности (mean), стандартна грешка (SEM) и стандартно отклонение (SD) беше приложен дескриптивният анализ.

ФОТОДОКУМЕНТАЦИЯ

За документиране на резултатите от светлинно микроскопските изследвания бяха използвани:

- Светлинен микроскоп (Zeiss Primo Star, Germany), камера (Progres, Capture 2.6 – Jenoptik) снабдена със софтуер – Soft Imaging Sistem GmbH с анализираща програма.
- Светлинен микроскоп (Leica DM 1000 LED, Germany), камера (Leica DMC 2900) снабдена със софтуер Leica Application Suite, Version 4. 8. 0, Copyright[®] 2003 - 2015 с анализираща програма. Същият се използва и за флуоресцентна микроскопия със софтуер – LAS X 5.1.0, Leica Microsystems, Switzerland.
- ▶ Бинокулярен стереомикроскоп (МБС-10, USSR).
- Стереомикроскоп (Leica S9i, Germany), вградена камера (Leica S9i 10×23, Microsystems, Switzerland), вградена камера-ТМ69, Leica S9i Stereozoom) и софтуерна програма за анализ.

Изследванията са извършени в катедра "Ветеринарна анатомия, хистология и ембриология" на Ветеринарномедицинския факултет и катедра "Анатомия" на Медицинския факултет при Тракийски университет, Стара Загора.

Рентгеновите и компютърнотомографските изследвания бяха проведени в Университетска Ветеринарна болница с клиники (УВБК) към ВМФ, ТрУ, Стара Загора.

Използваните термини при означенията са съобразени с Nomina Anatomica Veterinaria (2017) и с Nomina Histologica Veterinaria (2017).

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. МАКРОСКОПСКА АНАТОМИЯ НА СЛУХОВАТА ТРЪБА.

4.1.1. Наблюдения върху разрезната повърхност на глави и последваща дисекция.

Наблюденията върху надлъжно разполовени в медианната равнина глави (между linea mediana dorsalis и linea mediana ventralis) показаха, че единствено видима част от тръбата е нейният фарингеален отвор – ostium pharyngeum tubae auditivae (OPHTA), както и разположените в съседство анатомични структури, показани на фигура 2.



Фиг. 2. Разполовена глава от мъжко прасе дясна страна – медиален изглед (ляво). Голямо увеличение (дясно). Стрелки (бели) – ostium pharyngeum tubae auditivae (ОРНТА), Стрелка (черна) – choana, Ttb – tonsilla tubaria, Tpe – tonsilla paraepiglottica, pml – palatum molle, pha – pars nasalis pharynges, mlc – m. longus coli, vmr – vomer, lng – lingua, pdr – palatum durum, sna – septum nasi, eth – os ethmoidale, str – sella turcica, p –hypophysi, mob – medulla oblongata, crb – cerebellum, htl – hyphotalamus, hms – hemisphere cerebri, ofr – os frontale, sfr – sinus frontalis. Линия = 20 mm.

На всичките разполовени глави от 16 броя прасета беше определено анатомотопографско положение на фарингеалния отвор на слуховата тръба и синтопичното му отношение спрямо съседните структури (**Фиг. 3**).

Дорзоростралният му край достигаше проекционната линия минаваща точно пред хипофизната жлеза между точките "A" (Akrokranion) и точка "H" (Hormion), (von den Driesch, 1980). Каудовентралния край на OPHTA достигше линията, започваща от точка "A" и спускаща се надолу под ъгъл приблизително 10° спрямо линията между точките "A" – "H". Напречната ос на отвора беше ориентирана под ъгъл 60° спрямо първа или втора линия (**Фиг. 3**).



Фиг. 3. Етапи при изпълнение на медиален достъп до слухова тръба на прасе (A, B, C, D, E, F). Стрелка (черна) – ostium pharyngeum tubae auditivae, Стрелка (жълта) – демонстрира отстраняването на pars petrosa, 1 – pars basilaris ossis occipitalis, 2 – corpus ossis basisphenoidalis, 3 – tentorium cerebelli membranaceum (dura mater), 4 – os palatinum, 5 – hypophysis, 6 – dorsum selle, 7 – n. opticus, 8 – endoturbinalia (os ethmoidale), 9 – rete mirabilae epidurale rostrale, 10 – palatum molle, 11 – palatum durum, 12 – tonsilla paraepyglotica, 13 – lingua, 14 – m. longus coli, 15 – pars petrosa (os temporale), 16 – stylohyoideum, 17 – cochlea (pars petrosa), TA – tuba auditiva, A – точка "Akrokranion", St – точка "Staphylion", H – точка "Hormion". Линия = 10 mm.

При дисекция на същите глави, чрез използване на адаптиран от нас медиален анатомичен достъп илюстриран на фигура 2 беше препарирана цялата слухова тръба, при което се установи, че тя е с хрущялна основа по цялата си дължина. Хрущялната част, навлизаща в костния канал (*semicanalis tubae auditivae*), показваше такава структура до навлизането ѝ в барабанната кухина (*cavum tympani*) на средното ухо, където се отваряше с каудолатерален елипсовиден тимпаников отвор (*ostium tympanicum tubae auditivae*). Хрущялът лесно се отделяше от костния канал, беше гъвкав, без макроскопски видими участъци на вкостяване. (Фиг. 4 и Фиг. 5).



Фиг. 4. Нативен препарат от надлъжно разполовена глава на женско прасе с проекция на дясна слухова тръба (ляво). Голямо увеличение (дясно). Стрелки (бели) – tuba auditiva, Стрелка (черна) – semicanalis tubae auditivae (canalis musculotubarius), At – tuba auditiva, Ppt – pars petrosa (os temporale), OAt – ostium pharyngeum tubae auditivae, Plb – os palatinum, Tc – cavum tympani, i – incus, op – n. opticus, p – hypophysis, ds – dorsum selae, tcm – tentorium cerebelli membranaceum, Ocb – pars basilaris ossis occipitalis. Линия (дясно) = 10 mm.

За визуализацията на цялата слухова тръба на нативни препарати беше необходимо специфично препариране по подходяща методика установена от нас с отстраняване на структурите (кости и меки тъкани), разположени в съседство. (Фиг. 3). За отбелязване е, че дори и при внимателно извършено препариране, не беше възможно да се добие точна представа за формата и размерите на тръбата, както и за двата ѝ отвора (Фиг. 5).



Фиг. 5. Надлъжно разполовена лява страна на глава от мъжко прасе – медиален изглед. Стрелка (бяла) – ostium pharyngeum tubae auditivae (OPHTA), Стрелки (черни) – стени на semicanalis tubae auditivae, (*) – ostium tympanicum tubae auditivae (OTMTA), i – incus, \mathbf{m} – membrana tympani, \mathbf{m} t – m. tensor tympani, \mathbf{lm} – lamina cartilaginis medialis (tubae auditivae), boc – pars basilaris ossis occipitalis, bt – bulla tympani, \mathbf{ap} – corpus ossis presphenoidalis, \mathbf{cpr} – corpus ossis presphenoidalis, \mathbf{op} – n. opticus. Линия = 10 mm.

След направата на медиален достъп до слуховата тръба и премахване на костните фрагменти визуално беше установено, че медиалната стената на ТА беше видима от ОРНТА до ОТМТА. Виждаха се отчетливо прерязаната стена на semicanalis tubae auditivae, а над него *m. tensor tympani* и навлизащия в *cavum tympani* край на тръбата. Също така добре видими бяха и структурите в кухината на средното ухо – наковалнята (*incus*) и тъпанчевата мембрана (*membrana tympani*), означени на **фигура 5**.

От латералната страна стената на тръбата беше трудно видима без цялостното ѝ дисекциране от околните тъкани.

4.2. СТЕРЕОСКОПСКО ИЗСЛЕДВАНЕ

От извършеното стереоскопско наблюдение на ОРНТА беше установена неговата форма, размер и бяха уточнени видимите структури в областта около него – клонове на *a. palatina ascendens, torus tubarius, mucosa respiratoria* (**Фиг. 6**).



Фиг. 6. Надлъжно разполовена глава от мъжко прасе – медиален изглед (ляво). Стереоскопия на фарингеален отвор на дясна слухова тръба (дясно). Стрелка (бяла) – ostium pharyngeum tubae auditivae (ОРНТА), Стрелки (черни) – клонове на дясна *a. palatina ascendens* (APAD). 1 – ростродорзален край на ОРНТА, 2 – torus tubarius, 3 – вентрокаудален край на ОРНТА, 4 – tunica mucosa с epithelium respiratorium. Линия (ляво) = 20 mm. Линия (дясно) = 0,25 mm.

4.3. ДЕМОНСТРАЦИЯ РЕЛЕФА НА ЛУМЕНА НА ТРЪБАТА

4.3.1. Външен релеф на тръбата след изпълване с акрилатна пластмаса (Duracryl[®]Plus) и силиконови еластомери (Elite Double 22 Shore и A-silicone Perfect-F Light Premium-set).

Същият подход беше приложен и след изпълване на тръбите (виж раздел Материал и методи) през *ostium pharyngeum tubae auditivae* с Duracryl[®]Plus (Spofa Dental, Czech Republic) след това отливките бяха наблюдавани и описвани "*in situ*", впоследствие изваждани, и използвани за по-нататъшни изследвания (**Фиг. 7**).



Фиг. 7. Скелетотопия на акрилатна отливка от дясна слухова тръба на женско прасе (ляво). Голямо увеличение (дясно). Стрелка (бяла) – отливка от лумена на тръбата (акрилатна пластмаса), Стрелки (черни) – semicanalis tubae auditivae, Сгс (At) – корозионна отливка от лумена на слуховата тръба, Тс – cavum tympani, Tb – bulla tympanica, Ptb – hamulus pterygoideus (os pterygoideum); Линия (ляво) = 20 mm; Линия (дясно) = 10 mm.

Наблюденията ни показаха, че всички получени отливки от лумена на слуховите тръби бяха елипсовидни, с форма на сплеснат пресечен конус, с ясно изразени ростродорзален (краниален) и вентрокаудален (каудален) ръбове. Отливките бяха с по-голяма дължина при женските индивиди както отдясно, така и отляво (Таблица 2).

Също така, тези особености бяха наблюдавани както на препарирани пресни (нативни) влажни препарати, така и на препарати след премахване на меките тъкани чрез корозионна техника, със запазени кости и цели отливки от лумена на слуховите тръби (**Фиг. 7** и **Таблица 2**).

За извършване на по-обстойно и прецизно измерване на слуховата тръба предварително беше направена схема, максимално наподобяваща формата ѝ, на която с цифри бяха маркирани основни точки. Освен това, наподобяващият форма на неправилен ромб участък между точките 4, 5, 8 и 9 и продължението му (до звездичката) показва най-голямото стеснение на тръбата (Фиг. 7). Тези означения бяха използвани за измервания на слуховата тръба, както на нативни препарати, така и на отливки от лумена ѝ (Таблица 2 и Таблица 3).



Фиг. 8. Схема на лява слуховата тръба при домашна свиня – медиален изглед. Вентрокаудална дължина (1 – 4), Ростродорзална дължина (3 – 6), Медиална дължина (2*– 5), Латерална дължина (2 – 7), Голям диаметър на фарингеалния отвор (10 – 11), Малък диаметър на фарингеалния отвор (5 – 7), Голям диаметър на тимпаниковия отвор (1 – 3), Малък диаметър на фарингеалния отвор (2 – 2*), Диаметър в средната част от дължината на тръбата (8 – 9), Звезда (*) – барабанен край на стесненото поле.



Фиг. 9. Акрилатна отливка от лумена на дясна слухова тръба от прасе – латерален изглед (ляво). Акрилатна отливка от лумена на лява слухова тръба от прасе – медиален изглед (дясно). Сгс (ТА) – корозионна отливка от лумена на слуховата тръба, **pm** – *proc. muscularis*, **ptr** – *pars petrosa*, **3везда** (*) – барабанен край на стеснения участък. С жълта пуннктирана линия се очертава най- голямото стеснение на лумена на слуховата тръба. Линия = 10 mm.

На представената корозионна отливка на дясна слухова тръба (Фиг. 9) се вижда навлизане и изливане на акрилатната пластмаса в кухината на средното ухо през ostium tympanicum tubae auditivae както и това, че към стеснения край отливката става по-широка, но с кръгло напречно сечение. Това беше установено при наблюдаване на отливките от акрилатна пластмаса и от силиконов еластомер, а също така и при дисекциране на нативни препарати. Надлъжно тръбата показваше прав, леко спираловиден ход на лумена. Не бяха наблюдавани отклонения от относително правия ход на лумена. Отливките от страната на тимпаниковия край имаха леко каудовентрално извит завършек.

Стойностите от направените сравнителни макроморфологични измервания върху нативни препарати на слуховата тръба при двата пола са отразени в **таблица 2**.

HADAMETRI	животни		
HAPAMETPH	Мъжки прасета	Женски прасета	
ДЪЛЖИНА НА ХРУЩЯЛНАТА Ч	АСТ НА ТА		
Дорзална линия	35,10±1,94	35,16±1,8	
Срединна линия	34,79±1,48	35,02±1,27	
Вентрална линия	36,05±1,23 A	35,76±1,24	
ЦЯЛА ДЪЛЖИНА НА ТА			
Дорзална линия	38,39±1,13	37,70±0,86	
Средлина линия	38,36±0,68	38,57±0,90 A	
Вентрална линия	38,32±0,77	38,65±1,08	
ВИДИМА ЧАСТ ОТ ТА			
Дорзална линия	14,91±0,68	15,48±0,90	
Вентрална линия	13,03±0,50 A***	13,67±1,14 A***	
ДЪЛЖИНА НА ТА В СМТ	7,40±0,33	8,19±0,48***	
ДЪЛЖИНА НА ТА		Approximation and the second sec	
Краниална част	13,48±0,88 A***	13,38±1,08 A***	
Средна част	8,08±0,24 A	8,10±0,29 A***	
Каудална част	1,89±0,35 A***	2,06±0,18 A***	
ДЪЛЖИНА НА ОРНТА	11,40±1,07	10,51±1,79	
ДИАМЕТЪР НА ЛУМЕНА В КРАЯ НА ТА	1,36±0,45	1,10±0,37	

Таблица 2. Стойности на параметри на ТА, измерени на нативни препарати при мъжки и женски прасета (mm).

*** (P<0.001) статистически значима разлика в стойностите при мъжки срещу женски прасета.

А`, А``` (P<0.05; P<0.001) Статистически значима разлика спрямо предишната част на ТА.

OPHTA – Ostium pharyngeum tubae auditivae

CMT – Canalis musculotubarius

Както се вижда от **таблица 2**, при мъжките животни разликата между дължината на вентрокаудалния ръб беше с около 2,39 (2,4) mm по-голяма от тази на ростродорзалния ръб при десните отливки и с 1,99 mm при левите. При

TA – Tuba auditiva

женските индивиди тези стойности бяха съответно: 0,67 mm отдясно и 1,77 mm отляво. Различия бяха установени и в дължината на двете стени (медиална и латерална) измерена между две точки, разположени по средата на съответния отвор – ростродорзална (предна, медиална), и вентрокаудална (задна, латерална) – 4,34 mm и 4,59 mm в полза на втората стена съответно за десните и левите отливки при мъжките, и също 3,29 mm отдясно и 2,81 mm отляво при женските индивиди.

Съотношението малък/голям диаметър на ostium pharyngeum tubae auditivae, отдясно и отляво при мъжките беше 0,35 а при женските – 0,28 отдясно и 0,27 съответно отляво.

Данните от измерванията върху отливки от слуховите тръби след изпълване с Duracryl[®]Plus при мъжките и женските индивиди са представени в **таблици 3.1.**, **3.2.**, и **3.3**.

	ЖНВОТ	ни
ДЪЛЖИНА НА СЛУХОВАТА ТРЪБА (ТА)	Мъжки прасета	Женски прасета
Ростродорзална (1-4)		
Дясна страна	26,99±4,71	29,96±2,71
(min-max)	36,89-22,59	34,67-26,23
Лява страна	27,44±5,80	29,52±3,72
(min-max)	36,72-19,20	36,75-23,92
Медналиа (2'- 5)		
Дясна страна	26,98±4,03	29,43±2,49
(min-max)	34,30-23,09	34,19-26,29
Ляво страна	27,75±5,54	29,28±3,13
(min-max)	36,33-18,66	33,76-24,43
Латерална (2 – 7)		17
Дясна страна	31,32±4,26	32,72±2,674
(min- max)	40,31-26,90	38.28-28.73
Лява страна	32,34±6,74	32,09±3,26
(min- max)	44,83-22,99	36,93-25,32
Вентрокаудална (3-6)		it.
Дясна страна	29,38±4,05	30,63±3,83
(min- max)	38,47-25,09	35,87-22,25
Лява страна	29,43±5,04	31,29±2,85
(min- max)	37,62-19,93	35,47-24,94

Таблица 3.1. Размери за ТА на отливки от слуховата тръба на прасета от двата пола (mm).

TA-tuba auditiva

Таблица 3.2. Размери за ОРНТА на отливки от слуховата тръба на прасета от двата пола (mm).

	ЖHBO1	ни
ДИАМЕТЪР НА ФАРИНГЕАЛЕН ОТВОР (ОРНТА) НА СЛУХОВАТА ТРЪБА	Мъжки прасета	Женски прасета
Голям днаметър (10 – 11)		
Дясна страна	$13,25\pm1,84$	13,12±0,92
(min-max)	16,09-10,08	14,97-11,91
Лява страна	12,02±1,27	12,45±1,71
(min-max)	14,59-10,37	14,48-8,82
Мальк днаметьр (5 – 7)		50
Дясна страна	4,65±1,56	3,48±0,80
(min-max)	7,66-2,95	5,06-2,47
Лява страна	4,26±0,72	3,36±1,28
(min-max)	5,17-2,98	5,57-1,04

OPHTA – ostium pharyngeum tubae auditivae

Таблица 3.3. Размери за ОТМТА на отливки от слуховата тръба на прасета от двата пола (mm).

	животни			
ДИАМЕТЪР НА ТИМПАНИЧЕН ОТВОР (ОТМТА) НА СЛУХОВАТА ТРЪБА	Мъжки прасета	Женски прасета		
Голям диаметър (1 – 3)				
Дясна страна	1,53±0,23	1,52±0,24		
(min-max)	1,23-1,93	1,14-1,93		
Лява страна	1,81±0,38	1,48±0,16*		
(min-max)	1,24-2,68	1,28-1,85		
Мальк днаметьр (2'- 2)				
Дясна страна	0,70±0,27	0,63±0,17		
(min-max)	0,32-1,17	0,32-0,95		
Лява страна	0,80±0,21	0,53±0,16*		
(min-max)	0,47-1,23	0,31-0,80		

*P<0.05 – статистически значима разлика в стойностите при мъжки срещу женски прасета.

P<0.05 – статистически значима разлика в стойностите при леви срещу десни слухови тръби на женски прасета.

OTMTA – ostium tympanicum tubae auditivae

С оглед получаване на максимално точни отпечатъци от лумена на слуховата тръба, бяха направени и отливки от използвания в денталната медицина дублиращ силикон "Elite Double 22 Shore". Получените реплики от лумена на тръбата дадоха добра визия за вътрешния релеф на слуховата тръба.

Също така за по-голяма прецизност и достоверност на отливките на целия лумен на тръбата беше използван ново поколение адитивен силикон с повишена хидрофилност и нисък вискозитет (A-silicone). Като ползвахме свойството на този тип силикон – тиксотропност, след въвеждането му през *meatus acusticus externus* с помощта на специализиран смесителен пистолет, установихме цялостно изпълване на лумена на слуховата тръба, както и на кухината на средното ухо. Не открихме разлики в размера на отливките между двата вида силиконови еластомери.

Получените по този метод отпечатъчни препарати (реплики) се отличаваха с изключителна рязкост на детайлите, относно вътрешния релеф на тръбата, а също така беше визуализирана и нейната реална проекция по надлъжната ѝ ос, поради по-високата окончателна твърдост на този вид материал. Беше установено с точност местоположение на ОТМТА поради ясните и отчетливи граници върху репликата спрямо тези на *cavum tympani* (**Фиг. 10**).



Фиг. 10. Корозионна силиконова отливка от лумена на дясна слухова тръба на мъжко прасе (ляво) – медиален поглед. Корозионна силиконова отливка от лумена на лява слухова тръба на мъжко прасе (дясно) без каменистата част на слепоочната кост – медиале низглед. 1 – отливка от лумена на тръбата (адитивен силикон), 2 – pars petrosa, 3 – bulla tympanica, 4 – cavum tympani, 5 – pars squamosa (facies cerebralis на os tempolale), 6 – proc. pterygoideus на os basisphenoidale. Линия = 20 mm.

Наблюденията ни върху силиконовите отливки показаха, че, отпечатъчния релеф от лумена на слуховата тръба не е гладък. В посочения погоре стеснен участък (**Фиг. 8**), между точките 4, 5, 8 и 9 и продължението му, отливките бяха доста по-тънки от останалите части на тръбата. За отбелязване е, че това "хлътване" се наблюдаваше както на латералната, така и на медиалната стена на *tuba auditiva* (**Фиг. 11**).



Фиг. 11. Корозионна отливка от лумена на лява слухова тръба от мъжко прасе (ляво) – латерален поглед. Силиконова отливка от лумена на лява слухова тръба от мъжко прасе (дясно) върху милиметрова хартия – латерален изглед. Стрелки – стеснена част от лумена на слуховата тръба по нейната дължина. Линия = 10 mm.

4.4. Позитивна контрастна рентгенография на лумена на слуховата тръба.

Данните от нативните препарати, корозионните отливки направени чрез използване на акрилатна пластмаса (Duracryl[®]plus U) и отливки от силиконов еластомер (Elite Double 22 Shore), бяха сравнени с тези от рентгенологично изследване на лумена на тръбата след изпълването й с наситен разтвор на триоловен тетроксид (Pb₃O₄) в 10% воден разтвор на желатин, за получаване на по-интензивна сянка (**Фиг. 12** и **Фиг. 13**). Визуалният анализ показа идентичност на отливките от акрилатна пластмаса и силиконов еластомер.



Фиг. 12. Рентгенограма на дясна страна на глава от мъжко прасе с позитивна сянка на слуховата тръба (ляво) – медиолатерална проекция. Голямо увеличение (дясно). Стрелки – контраст от лумена на дясна слуховата тръба, 1 - pars petrosa, 2 - bulla tympanica (os temporale), 3 - corpus os presphenoidale, 4 - proc. paracodylaris (os occipitale), 5 - hamulus pterygoideus 6 - mandibula, 7 - stylohyoideum, 8 - squama occipitalis.



Фиг. 13. Рентгенограма на част от дясна половина на глава в режим Rainramp от прасе с позитивна сянка на слуховата тръба Стрелка (чериа) – контрастна сянка от лумена на слуховата тръба при ОРНТА, Стрелка (бяла) – контрастна сянка от лумена на слуховата тръба при ОРНТА, стрелка (бяла) – контрастна сянка от лумена на слуховата тръба при ОТМТА, сту – cavum tympani, Ppt – pars petrosa, bt – bulla tympanica, cob – corpus ossis basisphenoidalis, ppc – proc. paracondylaris.

Както се вижда на фигура 13 *cavum tympani* и точното място на *ostium tympanicum tubae auditivae* личат по-добре в сравнение със същите на фигура 12.

4.5. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ТОПОГРАФИЯТА НА СЛУХОВАТА ТРЪБА.

4.5.1. Проекция на слуховата тръба върху нативни препарати.

При щателно проучване и анализ на данните беше установена проекцията на слуховата тръба върху кожата чрез въведени от нас топографски проекционни линии и известни, общоприети в цефалометрията точки, съобразени със стандартизирани точки в съвременната краниометрия (von den Driesch, 1980) показани на **фигура 14**.



Фиг. 14. Рентгенограма на дясна страна на глава от мъжко прасе с позитивна сянка на слуховата тръба (ляво) – медиолатерална проекция. Натурален модел (дясно), А – Ent (Entorbitale) – дорзален слъзен отвор, В – връх на яремен израстък (proc. paracondylariss), С – Ot (Otion) – вентралния ръб на ушната раковина – lamina tragi, D – междучелюстния ръб, Е – точката на 1 ст под пресечната точка на линиите А – В с С – D. F – точката над външния слухов канал. G – Мястото на пресичане на линия А – В с С – D. Линия = 10 mm.

Проекцията на слуховата тръба през кожата на прясна, нефиксирана свинска глава (натурален модел) беше определяна при използване на три мислени линии.

Първата линия свързва точка Ent с дорзалния слъзен отвор (точка A) с вентралния край на *proc. paracondylaris* на тилната кост (точка B).

Втората линия свързва точка Ot – вентралната част на слуховия вход, непосредствено под вентралния свободен ръб на ушната раковина - *lamina tragi* (точка C), с ъгъла, заключен в междучелюстното пространство (точка D). Тя пресича перпендикулярно линия A – B.

Третата линия (E – F) започва от точка E, намираща се на 1,5 cm от точка G - мястото на пресичане на линиите A – B с C – D.

Линия E – F пресича под ъгъл 35° линия C – D. Между точка G и E се намира проекцията на фарингеалния отвор на слуховата тръба. Мястото на пресичане на линия C – D с линия E – F проектира мястото на навлизане на тръбата в костния канал.

4.6. АРТЕРИАЛНА АРХИТЕКТОНИКА НА СЪДОВЕТЕ, КРЪВОСНАБДЯВАЩИ СЛУХОВАТА ТРЪБА.

4.6.1. Изпълване на артериите със силиконов еластомер (Elite Double 22 Shore).

Макроскопското визуализиране на артериите на главата чрез изпълване с еластомер показа, че на препарирани препарати можеше съвсем ясно да се определят не само главните артерии, но и техните клонове. Бяха установени основните артерии, а именно: общата сънна артерия (*a. carotis communis*), горночелюстната артерия (*a. maxillaris*), езичната артерия (*a. linqualis*), лицевата артерия (*a. facialis*). Също така добре се различаваха и артериите с по-малък калибър.

Наред с това, внимателно беше проследена *a. palatina ascendens*, която се изкачваше към *ostium pharyngeum tubae auditivae*. Ясно се отличаваха нейните клонове, разклоняващи се медиално в тъканите около фарингеалния отвор на тръбата.

Детайлното визуално изследване на артериите, разположени около слуховата тръба показа, че основният артериален съд, който кръвоснабдява тръбата около фарингеалния ѝ отвор, е възходящата небцова артерия – a. *palatina ascendens*. Артерията се разделяше по дихотомичен тип на дорзален и вентрален клон (**Фиг. 15**).



Фиг 15. Артерии на глава от женско прасе – дясна страна. Изпълване със силиконов еластомер. Стрелки (черни) – a. palatina ascendens, Стрелка (бяла) – ostium pharyngeum tubae auditivae, 1 - дясна a. carotis communis, 2 - a. maxilaris, 3 - a. linqualis, 4 - a. facialis, 5 - r. glandularis 6 - glandula mandibularis, <math>7 - m. pterygoideus medialis, 8 - n. hypoglossus, 9 - stilohyoideum, <math>10 - m. levator veli palatini, 11 - bulla thympani, 12 - m. longus capitis, 13 - corpus ossis basisphenoidalis, <math>14 - m. stylopharyngeus, 15 - palatum mollae. Линия = 10 mm.

В по-голяма част от случаите (около 60%) вентралният клон на *а. palatina ascendens* беше по-силен от дорзалния и при двата пола. Тази особеност се наблюдаваше в двойно по-голяма честота при женските индивиди.

4.6.2. Изпълване на артериите с разтвор на туш – желатин.

Изпълнените с туш-желатин препарати показаха много добър контраст, който установихме при наблюдение с "просто око". Виждаше се цялостното изпълване на чудната мрежа и съдовете на мозъка. Наблюдаваха се тъмни петна от изпълнените капиляри дори по костите. Ясно видима беше капилярната мрежа, която силно контрастираше в лигавицата около фарингеалния отвор на тръбата. Препаратите, изпълнени със силиконов еластомер, потвърдиха, че *a. palatina ascendens* се отделя от *a. facialis* (**Фиг. 16**).



Фиг. 16. Артерии на глава от мъжко прасе – дясна страна. Изпълване с туш – желатин. Стрелка (бяла – ляво) – a. palatina ascendens, Стрелка (бяла – дясно) – ostium pharyngeum tubae auditivae, Стрелки (черни) – a. palatina ascendens, 1 - a. maxilaris, 2 - a. linqualis, 3 - a. facialis, 4 - stylohyoideum, 5 - m. levator veli palatini, 6 - bulla thympanica, 7 - m. longus capitis, 8 - corpus ossis basisphenoidalis, 9 - a. carotis interna, 10 – rete mirabile epidurale ristrale, 11 - m. stylopharyngeus. Линия = 10 mm.

В дорзорострална посока артерията се разделяше на два клона, като малките разклонения на дорзалния клон бяха разположени в областта около медиалния ръб на фарингеалния отвор на слуховата тръбата.

Вентралният клон се разделяше на два по-малки клона, като ясно се отличаваше тъмната област на лигавицата, вентрално от фарингеалния отвор. При проследяване на видимите малки разклонения беше установено, че вентралният клон снабдява преди всичко лигавицата вентрално от отвора, както и латералната стена на тръбата при фарингеалния отвор.

4.6.3. Изпълване на артериите с акрилатна пластмаса (Duracryl[®]Plus).

Макроскопското наблюдение на корозионните реплики от артериалната система показа, че въведеното количество полимер (Duracryl[®]Plus) и последващата технологична обработка позволяват да се получат качествени, и достатъчно инструктивни отливки. На корозионните препарати можеше без затруднение да се определят не само главните артерии, но и техните клонове: обща сънна артерия – *a. carotis communis*, външна и вътрешна сънни артерии – *a. carotis externa* и *a. carotis interna*, горночелюстна артерия – *a. maxillaris*, базиларна артерия – *a. basilaris*, артериалният кръг по базалната повърхност на главния мозък – *circulus arteriosus cerebri* (Вилизиев кръг), ростралната епидурална чудна мрежа – *rete mirabile epidurale rostrale* и др. (Фиг. 17, А; В, С и D).



Фиг. 17. А. Корозионен препарат от артериална система на главата от женско прасе (акрилатна пластмаса) – медиален изглед. Лява половина със запазени кости и отливка от лумена на слуховата тръба. В. Голямо увеличение – медиален изглед.



С. Корозионен препарат от артериална система на главата от женско прасе (акрилатна пластмаса) – медиален изглед. Лява полвина с отстранени кости и запазена отливка от лумена на слуховата тръба. D. Схематично представена артериална система на главата от прасе – лява половина – медиален изглед. ТА – tuba auditiva (корозионна отливка), \mathbf{a} – pars petrosa (os temporale), \mathbf{b} – bulla tympanica (os temporale), \mathbf{c} – hamulus pterygoideus, \mathbf{d} – proc. paracodylaris, \mathbf{e} – mandibula; 1 –лява a. carotis communis, 2 - a. carotis interna, 3 - a. carotis externa, 4 - a. lingualis, 5 - a. facialis, 6 - a. maxillaris, 7 - a. palatina ascendens, 8 - a. auricularis caudalis, 9 - a. temporalis profunda caudalis, 10 - a. alveolaris inferior, 11 - a. meningea media, 12 - rete mirabile epidurale rostrale, 13 - a. buccalis. Линия = 10 mm.

Начинът на разделянето на *a. palatina ascendens* позволи да се обособят следните три варианта:

І ВАРИАНТ

Артерията се разделяше на дорзален (насочен по латералната повърхност на тръбата) и вентрален (насочен по медиалната повърхност на тръбата) клонове, от които вентралният беше с видимо по-голям калибър. Този вариант беше установен в преобладаващата част от случаите – 21 (65,6 %), от

които 7 при мъжките и 14 при женските изследвани индивиди (Фиг. 18 и Фиг. 19).



Фиг. 18. Корозионен препарат от артериална система на главата от мъжко прасе (ляво). Дясна половина с отстранени кости (дясно) – медиален изглед. Стрелка – a. palatina ascendens, 1 – дясна a. carotis communis, 2 - a. carotis externa, 3 - a. lingualis, 4 - a. facialis, 5 - a. maxillaris, 6 - a. palatina ascendens, 7 - a. auricularis caudalis, 8 - a. temporalis profunda caudalis, 9 - a. alveolaris inferior. Линия = 10 mm.

А. palatina ascendens се отделяще почти под прав ъгъл от лицевата артерия – a. facialis. По пътя си към мекото небце (под барабанния мехур, непосредствено до фарингеалната част на слуховата тръба), a. palatina ascendens показваше рострално извит ход с добре изразени дорзална и вентрална дъга, под ъгъл приблизително 75-80° една спрямо друга. След отделянето на клон за мекото небце, a. palatina ascendes продължаваше ростродорзално към слуховата тръба, където се разделяще на два, а по-рядко на четири клона, които обхващаха двете стени на тръбата. Малки клонове излизаха от чудната мрежа и се насочваха вентролатерално за снабдяване на дорзолатералната страна на тръбата извън костния канал (semicanalis tubae auditivae), като някои от тях навлизаха и в канала, заедно с клоновете на a. meningea media. (Фиг. 19).



Фиг. 19. Корозионен препарат от артериална система на главата от женско прасе със запазени кости (изглед отзад). Стрелки – a. palatina ascendens, 1 - дясна a. carotis communis, 2 - лява a. carotis communis, 3 - a. lingualis, 4 - a. facialis, 5 - a. maxillaris, 6 - a. carotis interna, 7 - rete mirabile epidurale rostrale, 8 - a.auricularis caudalis, 9 - a. alveolaris inferior, cps – pars petrosa, bt – bulla timpanica. Линия = 10 mm.

II ВАРИАНТ

Разделянето на артерията беше подобно, но с по-силен дорзален клон. Това беше наблюдавано у 7 случая (21,9 %), само при женските индивиди.

III ВАРИАНТ

Артерията се разделяше на четири клона, от които двата централни бяха с по-голям калибър от страничните. Този вариант беше установен при най-малка част от изследваните препарати – 4 (12,5 %), от които 3 при мъжките и 1 при женските.



Фиг. 20. Процентно съотношение на разклоняване на a. palatina ascendens при двата пола прасета.

При трите варианта зоната на кръвоснабдяване от *a. palatina ascendens* обхващаше около 65-70% от стената на тръбата. В останалата по-малка част от случаите се установиха разклонения от *a. meningea media* и *a. temporalis* profunda caudalis, както и фини артериални клончета, идващи от периферията на rete mirabile epidurale rostrale.

Ориентацията на слуховата тръба, както и на двете ѝ стени (медиална и латерална), позволи да се установят разклоненията на посочените артерии. Бяха установени и клонове на мрежата, разклоняващи се в тръбата и прилежащите на нея меки тъкани.

При ostium pharyngeum tubae auditivae дорзалният клон на a. palatina ascendens се разделяше в значителна част от случаите (87,5%) по дихотомичен начин като кръвоснабдяваше по-голямата част от вентромедиалната повърхност на слуховата тръба, меките тъкани около нея и фарингеалния отвор, в ростралната и каудалната част на който беше оформена добре видима на отливките фина капилярна мрежа (**Фиг. 19**).

Дорзомедиалният сегмент на тръбата (до ostium tympanicum tubae auditivae) се кръвоснабдяваше от малкокалибрени, хоризонтално разположени 4-5 клона, идващи от периферията на rete mirabile epidurale rostrale, а също така, но в по-слаба степен, и от много къси разположени в съседство малкокалибрени клонове от *a. meningea media*.

A. meningea media вземаше участие в кръвоснабдяването и на каудолатералната стена на тръбата. По хода си към черепната кухина, тя

следваше извит ход пред *bulla tympanica* (в основата на черепа) и се разделяше най-често на три добре видими клона, които основно кръвоснабдяваха меките тъкани, латерално на тръбата и мекото небце. Освен това техни крайни разклонения снабдяваха каудолатералната част от стената на тръбата.

В каудалната си част слуховата тръба (дорзалната 1/3 от дължината ѝ) получаваше клонове от *a. temporalis profunda caudalis*, които бяха с малък калибър. Около фарингеалния ѝ отвор и каудолатералната част, кръвоснабдяването беше от фини клончета на *a. palatina ascendens*.

Данните от извършените измервания върху отливките от калибъра на *a. palatina ascendens* са представени в **таблица 4**.

Таблица 4. Стойности за калибъра на дясна и лява *a. palatina ascendens* при двата пола (mm).

животни	APAD	APAS
Мъжки прасета mean+SD	0.83+0.097	0.97+0.12**
Женски прасета	0,0310,097	0,77±0,12
mean±SD	0,77±0,07	0,88±0,09*

*/** (P<0.05, P<0.01) – Статистически значима разлика между десни и леви артерии при животни от един и същи пол.

APAD – дясна a. palatina ascendens

APAS – лява a. palatina ascendens

От данните в таблицата е видно, че при мъжките животни дясната артерия е с малко по-голям калибър на отливката – 0,06 mm, в сравнение с женските. Тази разлика отляво е също в полза на мъжките, макар и незначително по-висока – 0,09 mm. И при двата пола калибърът на лявата артерия е по-голям от този на дясната, с установена статистически значима разлика. При мъжките индивиди калибърът на дясната и лявата артерия е поголям от този при женските, но без статистически значима разлика.

4.7. ИЗСЛЕДВАНЕ НА СЛУХОВАТА ТРЪБА И КРЪВОНОСНИТЕ СЪДОВЕ НА ГЛАВАТА ЧРЕЗ МЕТОДИ НА ОБРАЗНА ДИАГНОСТИКА.

4.7.1. Рентгенография на корозионни отливки от артериалната система.

Наблюдаваните особености в архитектониката при корозионните препарати бяха потвърдени и при рентгенологичното им изследване, тъй като използваната акрилакрилатна пластмаса (Duracryl[®]Plus U) показа доста добър контраст на рентгенограмите (**Фиг. 21**).

Това даде възможност да се установят и потвърдят съдове със среден калибър, участващи в кръвоснабдяването на фарингеалната и барабанната част

на слуховата тръба. По този начин бяха игнорирани съвсем малките по калибър съдове, които не се визуализираха на рентгенограмите. Това даде възможност да бъдат видяни ясно основни клонове, които иначе трудно се разграничаваха в местата на разклонения на корозионните препарати, тъй като се покриваха от сянката на по-малките съдове.

На по-голямо увеличение на рентгенограмата се виждаха отвесно спускащи се кръвоносни съдове (корозионни отливки от лумена им) участващи в кръвоснабдяването на слуховата тръба в нейната каудолатерална стена и по – специално в стеснената ѝ част, навлизаща в костния канал (*semicanalis tubae auditivae*). Те образуваха мрежа около стената на тръбата в тимпаниковата й част заедно с клонове идващи от чудната мрежа (*rete mirabile epidurale rostrale*) на вътрешната сънна артерия. Тези клонове снабдяваха основно ростромедиалната барабанна част на тръбата (**Фиг. 21**).



Фиг. 21. Рентгенограма на корозионна отливка от лумена на лява слуховата тръба и артериите на главата от прасе, медиолатерална проекция. Стрелки – a. palatina ascendens, TA – tuba auditiva, 1 – лява a. carotis communis, 2 – a. carotis interna, 3 – a. carotis externa, 4 – a. lingualis, 5 – a. facialis, 6 – a. maxillaris, 7 – a. auricularis caudalis, 8 – a. temporalis profunda caudalis, 9 – a. alveolaris inferior, 10 – a. meningea media, 11 – rete mirabile epidurale rostrale, 12 – a. buccalis.

Рентгентгенографското изследване на васкуларните корозиони отливки от акрилатна пластмаса с отстранена кост, позволи да бъде елиминирана визуално фината капилярна мрежа и да се отличат ясно съдовете с по-голям калибър. Изследването потвърди, че *а. palatina ascendens* излиза от лицевата артерия, а другите описани артерии в областта бяха визуализирани с добър контраст и означени, както е показано на **фигура 21**.

Също така беше добре видима и сянката на корозионната отливка на слуховата тръба и клоновете от чудната мрежа, спускащи се към нея. На рентгенограмата се констатираха малките разклонения от *a. temporalis profunda caudalis* и *a. meningea media,* които снабдяват преди всичко меките тъкани около тръбата (**Фиг. 21**).

4.7.2. Конусно – лъчева компютърна томография (СВСТ).

При проведеното компютърно-томографско изследване установихме, че костните структури и артериите могат да бъдат добре идентифицирани на изображенията на СВСТ както върху съдове изпълнени с желатинова смес (**Фиг. 22**), така и върху препарати направени чрез използване на корозионна техника при прилагане на студенополимеризираща пластмаса Duracryl[®] Plus U (**Фиг. 23, А** и **23, B**).



Фиг. 22. Триизмерна компютърна томография на кръвоносните съдове на главата от прасе (Проспективна СТ реконструкция – медиален изглед). Изпълване с контрастна смес (Рb₃O₄ и желатин).

Комбинацията от корозионни отливки на съдовете и CBCT сканиране доведе до ясно видима артериална система, която можеше да бъде добре различима от костните структури (**Фиг. 24**, **A** и **24**, **B**).



Фиг. 23. Компютърнотомографски образ на препарат изпълнен с акрилатна пластмаса. Латерален (A) и каудален (B) изглед на артерии и кости на глава при прасе. Стрелка – a. palatina ascendens. 1 – лява a. carotis communis, 2 – a. carotis interna, 3 – мозъчни артерии, 4 – a. auricularis caudalis, 5 – rete mirabile epidurale rostrale, 6 – a. facialis, 7 – a. palatina major, 8 – a. transversa faciei, 9 – a. lingualis.

При прилагането на посочените процедури за корекция, бяха ясно демонстрирани 3D компютърните модели на отливките от артериалните съдове. Също така беше установено, че тези модели позволяват още по-добра визуализация на архитектониката на артериалната кръвоносна система (Фиг. 24, A и 24, B).



Фиг. 24. Кранио-латерален изглед на цветна триизмерна реконструкция на артерии и кости на главата при прасе. А – Цяла глава. В – Дясна страна (медиаленизглед). Стрелка (бяла) – a. palatina ascendens.

Трябва да се отбележи, че желатиновата смес даде по-добър контраст при СВСТ, в сравнение с отливките от Duracryl Plus U.

Почти всички артерии на скелета на главата, включително клонове на вътрешната каротидна артерия и външната каротидна артерия, бяха добре видими на 3D моделите на желатиновия препарат въпреки, че последните бяха съвместими с тези на корозионните препарати (**Фиг. 24** и **Фиг. 25**).

Добре визуализирани бяха *a. palatina ascendens, rete mirabile epidurale rostrale* и *a. temporalis profunda caudalis,* които имат отношение към кръвоснобдяването на слуховата тръба. На нито един от моделите не беше наблюдавана *a. meningea media* (**Фиг. 24, В**; **Фиг. 25** и **Фиг. 26**).



Фиг. 25. Кранио-латерален изглед на дясна сънна артерия и нейните клонове при прасе – триизмерна реконструкция. 1 – a. auricularis caudalis, 2 – a. auricularis rostralis, 3 – a. transversa faciei, 4 – a. facialis, 5 – a. lingualis, 6 – a. sublingualis, 7 – a. maxillaris, 8 – a. alveolaris inferior, 9 – a. temporalis profunda caudalis, 10 – a. buccalis, 11 – a. ophtalmica externa, 12 – a. supraorbitalis, 13 – a. malaris, 14 – a. palatina descendens, 15 – a. infraorbitalis, 16 – a. profunda linguae, 17 – a. palatina ascendens, 18 – a. pharyngea ascendens, 19 – a. carotis interna, 20 – rete mirabile epidurale rostrale.



Фиг. 26. Кранио-латерален изглед на двустрана цветна триизмерна реконструкция на артери на главата при прасе. Текста е както на фиг. 25. Стрелка (бяла) – анастомоза на дясната и лявата *a. lingualis.*

4.8. ПЛАСТИНАЦИЯ

4.8.1. Пластиниране на слуховата тръба с полиестерна смола (Norsodyne[®] O 12335 AL).

При изследване на изготвените пластинирани препарати (пластинати), установихме ясно различими структури, както и липса на деформация у тях. Препаратите бяха твърди, с добра механична якост, запазен цвят, без участъци с помътняване и без специфична или неприятна миризма (**Фиг. 27**).



Фиг. 27. Пластиниран срез през лява слухова тръба от мъжко прасе включен в полимерно блокче – дорзален изглед. ТА – tuba auditiva, Стрелка (бяла) – (ОТМТА), Стрелка (черна) – (ОРНТА), bt – bulla tympanica, rm – rete mirabilae epidurale rostrale, Ppt – pars petrosa, crb – cerebellum. Линия = 10 mm.

На включени в полимерни блокчета надлъжни срезове, направени през точно определена хоризонтална равнина, перпендикулярна на медианната

равнина, минаваща през точките "St" (Staphylion) и "H" (Hormion), (von den Driesch, 1980), с размери: $90 \times 20 \times 2$ mm, беше наблюдаван целия лумен на тръбата по надлъжната ѝ ос – от *cavum tympani* до нейния фарингеален отвор, както и нейните стени, а медиално на нея се виждаше напречен срез през чудната мрежа, като ростралният ѝ край съвпадаше с трансверзалната равнина прекарана пред *bulla tympanica*. В каудална посока се виждаше срез през средата на каменистата част, а каудомедиално – част от хемисферата малкия мозък (**Фиг. 27**).

Върху латералната повърхност (страна) на пластиниран срез беше установено, че луменът на тръбата в средната ѝ третина съвпада с вертикалната равнина лежаща успоредно (сагитално) на медианната линия и минаваща през латералната костна стена на черепната кухина в непосредствена близост до мозъчните хемисфери. Костният канал беше ясно видим, а фарингеалният отвор на това ниво не беше установен.

При наблюденията върху медиалната разрезна повърхност с премахната 1/2 от *bulla tympanica* и отворена *cavum tympani* се установи не само липса на отвора, но и на лумена на тръбата.

На оформените от всяка половина на главите блокчета с размери $120 \times 120 \times 18$ mm след двустранно отнемане на слой под ъгъл от 23° спрямо медианната равнина, отворен дорзално (латерална страна) и вентрално (медиална страна), ясно се виждаше цялата слухова тръба по нейното надлъжно сечение, а също така и прилежащите ѝ в съседство структури (**Фиг. 28**).



Фиг. 28. Пластинат на дясна слухова тръба от женско прасе – латерален поглед (ляво). Пластинат на дясна слухова тръба от женско прасе – медиален изглед (дясно). ТА – tuba auditiva, bt – bulla tympanica, dm – dura mater, tcm – tentorium cerebelli membranaceum, tpt – pars petrosa, op – n. opticus, Dp^{3-4} – dentes premolars на горна челюст, et – labyrinthus ethmoidalis, bo – bulbus olfactorius, of – os frontale, hms – hemispherium cerebri, soc – squama occipitalis, fc – fossa cerebellaris, rb – m. retractor bulbi, mlc – m. longus capitis. Линия = 20 mm.

4.9. ДИАФОНИЗАЦИЯ

4.9.1. Изследване на слуховата тръба чрез диафонизационна техника.

Извършените обстойни наблюдения и анализът на данните от тях показаха, че изготвените по тази техника макроскопски препарати, са с ясно отличими по цвят визуализирани структури: хрущял – синьо-зелен цвят, кости – керемидено-червен (до лилав) цвят, а останалите тъкани – прозрачни (транспарантни) (**Фиг. 29** и **Фиг. 30**).



Фиг. 29. Медиален изглед на дясна слухова тръба на женско прасе – нативен препарат (ляво). Стрелка (бяла) – pars cartilaginea tubae auditive, Стрелка (черна) – pars ossea tubae auditive, Lm – lamina cartilaginis medialis, Tvp – m. tensor veli palatini. Линия = 10 mm. Надлъжен срез на дясна слухова тръба през костната и част (дясно). Стрелки – pars ossea tubae auditive, Lvp – m. levator veli palatini, bt – bulla tympanica. Линия = 5 mm.



Фиг. 30. Медиален изглед на дясна слухова тръба от женско прасе – диафонизиран препарат (ляво). Стрелка (бяла) – pars cartilaginea tubae auditive, Стрелка (черна) – pars ossea tubae auditive, Lm – lamina medialis, Lvp – m. levator veli palatini. Линия = 10 mm.

Напречен срез на дясна слухова тръба от женско прасе през началото на костния канал (дясно). Стрелка (бяла) – pars cartilaginea tubae auditive, Стрелка (черна) – pars ossea tubae auditive, Lm – lamina cartilaginiis medialis, Lvp – m. levator veli palatini, Tvp – m. tensor veli palatini, Ll – lamina cartilaginis lateralis. Линия = 10 mm. Измерванията със стереомикроскоп показаха, че стойностите на ширината и височината на хрущялната част на лявата слухова тръба варират както следва:

Установената ширина при мъжките животни беше в границите от 2,10 до 3,05 mm (\bar{x} - 2,61 mm), а височината – от 3,65 до 3,90 mm (\bar{x} - 3,6 mm). При женските индивиди параметрите бяха съответно– ширина от 2,80 до 3,40 mm (\bar{x} - 3,14 mm) и височина – от 3,60 до 4,40 mm (\bar{x} - 4,0 mm).

И при двата пола стойностите за дясната слухова тръба бяха по-високи от тези, за лявата тръба.

При мъжките ширината варираше от 2,25 до 2,70 mm (\bar{x} - 2,50 mm), височината – от 2,80 до 3,10 mm (\bar{x} - 2,96 mm), а при женските – ширината беше съответно 2,45 – 3,15 mm (\bar{x} - 2,79 mm), а височината – 3,25 - 3,80 mm (\bar{x} - 3,61 mm).

При мъжките прасета измерените параметри показаха по-ниски стойности в сравнение с тези при женските.

Дължината на слуховата тръба в костния канал беше измерена с дигитален дебеломер. Дължината на дясната и лявата костна част на тръбата, и при двата пола показаха сходни стойности. При мъжките прасета бе установено, че дължината на дясната е 10,73 - 11,80 mm (\bar{x} - 11,17 mm), а на лявата – съответно 9,60 - 11,84 mm (\bar{x} - 10,97 mm). При женските стойностите варираха 10,52 - 12,40 mm (\bar{x} - 11,5 mm) за дясната, и 10,15 - 11,93 mm (\bar{x} - 11,7 mm) за лявата слухова тръба.

4.10. МИКРОСКОПСКА АНАТОМИЯ НА СЛУХОВАТА ТРЪБА

4.10.1. Хистологични методи

На оцветени с H&E напречни срезове (Фиг. 31 А, В, С и D) взети от трите части (начална – фарингеална, средна и крайна – барабанна) на слуховата тръба при наблюдение със стереомикроскоп, установихме добре визуализирани основните структури на тръбата – лигавица, хрущял или костна основа.



Фиг. 31. Напречен срез през начална (фарингеална) – А, средна – В и С и крайна (барабанна) – D части на дясна слухова тръба при прасе – стереомикроскопия. (H&E, 10×0,6). Crt – хрущял, Lm – lamina cartilaginis medialis (TA), Ll – lamina cartilaginis lateralis (TA), tm – лигавица, Lv – лимфно възелче (nodulus limphaticus), Ttb – tonsila tubaria, gl – туболозни жлези, ad – мастна тъкан, Tvp – m. tensor veli palatini, Lvp – m. levator veli palatini, стрелка – лигавични крипти, (+) – лумен на слуховата тръба, Линия = 1 mm.

На срез (А) от фарингеалния отвор ясно се виждаше S-овидната форма на лумена на тръбата и наличието на множество гънки по лигавицата, разделени от дълбоки крипти. В тях наблюдавахме от едно до три кълбовидни лимфни възелчета (*noduli lymphatici s. lymphonoduli*), като много рядко се наблюдаваха четири в една лигавична гънка (*noduli lymphatici tubarii*). Поголям брой от посочения не беше установен.

На следващия срез (В) взет от фарингеалния край на средната третина от дължината на тръбата, наблюдавахме силно напречно стесняване на лумена, загуба на лигавичните гънки, които ставаха с по-малка височина и съдържаха единични лимфни възелчета. Дебелината на хрущяла не беше променена, като латералната пластина беше силно извита към лумена и насочена дорзално. Ясно се отличаваха серомуцинозните жлези (*gll. tubariae*) в проприята.

При срез (С) получен от барабанния край на средната третина беше установена слаба промяна във формата на самия лумен на тръбата, като тя се запазваше все така S-овидна. Липсваха лигавични гънки с лимфоидни струпвания в тях. Дебелината на хрущяла беше същата.

В срез (D) получен от барабанната част на крайната третина, не бяха намерени лимфоидни струпвания, а хрущяла беше с увеличена дебелина, а лумена по-широк.

Наблюденията ни със светлинен микроскоп върху препарати, оцветени също с Н&Е показаха типичния за слуховата тръба строеж.

Лигавицата, беше съставена от привидномногослоен призматичен (цилиндричен) ресничест епител (epithelium columnare pseudostratificatum ciliatum), преминаващ в еднослоен призматичен епител (epithelium simplex columnare на lamina epithelialis mucosae), с чашковидни клетки (exocrinocyti caliciformes) и съединителнотъканен слой lamina propria mucosae, който се захващаше за хрущяла на тръбата или за костна основа (Фиг. 32 и Фиг. 33).



Фиг. 32. Напречен срез през средната част на лява слухова тръба при женско прасе Хематоксилин – Еозин (H&E). L – лумен, е – епител – (lamina epithelialis mucosae), под нея lamina propria mucosae (pr), m – m. levator veli palatini, c – cartilage tubae auditivae (lamina cartilaginis medialis), tc – мастна тъкан, gl –gll. tubariae. Линия = 500 µm.



Фиг. 33. Напречен срез през средната част на лява слухова тръба при женско прасе (H&E). L – лумен, е – епител (lamina epithelialis mucosae), под нея lamina propria mucosae (pr), Lm – cartilage tubae auditivae (lamina cartilaginis medialis), Ll – cartilage tubae auditivae (lamina cartilaginis lateralis), tc – мастна тъкан. Линия = 500 µm.

Епителния слой показа различна височина в отделните участъци на слуховата тръба (**Таблица 5**).

Таблица 5. Дебелина на lamina epithelialis mucosae.

	Височина на lamina	epithelialis mucosae ×400 (Me	ean±SD)
Мъя	кки прасета	Женски п	расета
Дясна страна	Лява страна	Дясна страна	Лява страна
	H	чална част (µm)	
A0/B0	B0	A0	
46,17±5,32	42,69±5,50	39,99±6,62	40,87±6,08
	c	редна част (µm)	
A0/B0/C3	B0/C0	A0/C0	CO
39,64±2,83	44,41±12,48	47,16±6,07	42,99±4,41
<u>.</u>	K	райна част (µm)	A:
A0/B0/C0	B0/C4	A0/C4	C4
28,83±2,24	22,45±1,65	$25,44\pm6.98$	22,45±1,65

Данните са представени като средни стойности ± стандартно отклонение (Mean±SD).

0 – липса на значима разлика

3, **4** – степен на значима разлика при р<0.001/0.0001

А – статистически значима разлика между дясна и лява част на тръбата

В – статистически значима разлика между мъжки и женски индивиди за съответната дясна или лява част на тръбата

Č – статистически значима разлика спрямо надстоящия ред

Дебелината на *lamina epithelialis mucosae* в началната част на тръбата показа по-високи стойности на дясната спрямо лявата част при двата пола, както и при мъжките спрямо женските индивиди, но без значима разлика.

Дебелината на *lamina epithelialis mucosae* в средната част на тръбата показа по-високи стойности (без значима разлика) на дясната спрямо лявата част при женските и на лявата спрямо дясната част при мъжките индивиди.

При мъжките животни *lamina epithelialis mucosae* беше по-тънка в сравнение с лявата част, докато при женските индивиди беше наблюдавана обратната зависимост, без установена значима разлика.

Дебелината на *lamina epithelialis mucosae* в крайната част на тръбата показа по-високи стойности на дясната спрямо лявата част при двата пола, а дебелина на слоя при дясната част на мъжките беше по-дебела отколкото същата при женските, без установена значима разлика в посочените стойности.

Дебелината на *lamina epithelialis mucosae* на дясната тръба при мъжките животни беше най-голяма в началната част, последвана от средната част и наймалка в крайната част, със значима разлика между крайната част, и останалите две части.

Лявата тръба на мъжките животни подобно на лявата и дясната част на женските животни показа по-високи стойности в средната част, последвана от началната част, и най-малки стойности в крайната част.

Сред ресничестите епителните клетки на *lamina epithelialis mucosae* се разполагаха ясно различими чашковидни клетки (**Фиг. 34**).



Фиг. 34. Напречен срез през дясна началната част на слуховата тръба при женско прасе Толуидиново синьо (ТВ). е – епител (lamina epithelialis mucosae), рг – проприя (lamina propria mucisae), vl – венула, gl – gl. tubariae, ch – cartilage tubae auditivae, L – лумен, Стрелки – чашковидни клетки (exocrinocytus caliciformis). Линия = 200 µm.

Количеството на чашковидните клетки беше най-голямо в средната част, последвано от началната част и най-малко в крайната част на дясната и лявата тръба, и при двата пола. Статистически значима разлика беше установена между средната и крайната част. Липсваше значима разлика между средна и начална част, както и между начална и крайна част на тръбата. Не се установи разлика в броя на тези клетки между дясната и лявата тръба, с изключение на средната част на тръбата при женските индивиди, където наблюдавахме значително повече клетки в дясната слухова тръба (**Таблица 6**).

Мъжки	прасета	Женскі	і прасета
Дясна страна	Лява страна	Дясна страна	Лява страна
	Ha	чална част	
A0/B0 2,50±0,54	B0 2,33±1,21	A0 2,00±0,89	2,50±1,37
	Cr	една част	
A0/B0/C0	B0/C0	A2/C0	C0
3.66±1.86	3,66±0,81	4,33±1,75	2,66±0,81
	Кр	айна част	Sandy diversion of
A0/B0/C1	B0/C1	A0/C1	C0
1,83±0,98	1.50 ± 0.54	1.50 ± 0.83	1,50±0,54

Таблица 6. Брой на	чашковидните клетки на	единица площ.
--------------------	------------------------	---------------

Данните са представени като средни стойности ± стандартно отклонение (Mean±SD).

0 – липса на значима разлика

1, 2 – степен на значима разлика при p<0.05/0.01

А – статистически значима разлика между дясна и лява част на тръбата

В – статистически значима разлика между мъжки и женски индивиди за съответната дясна или лява част на тръбата

С - статистически значима разлика между средна и начална част на тръбата

Дебелината на *lamina propria mucosae* в трите части на дясната и лявата тръба, и при двата пола не показа значими разлики (**Таблица 7**).

Дебелината на този слой в началната част на тръбата беше най-голяма, последвана от крайната част и най-малка беше тя в средната част. Значителна разлика беше установена между началната и останалите части на тръбата, докато между средната и крайната част на тръбата липсваше значима разлика на измерените стойности при всички изследвани индивиди.

В непосредствена близост около ostium pharyngeum tubae auditive наблюдавахме лимфоидни клетки, оформящи в проприята дифузна лимфоидна тъкан и лимфни фоликули, които бяха разделени от съединителна тъкан. Те представляваха структурен компонент на tonsilla tubaria. Епителът, който покриваше лимфоидните фоликули, беше силно инфилтриран от лимфоидни клетки.

	Дебелина на <i>lamina pro</i>	pria mucosae ×200 (Mean±SD	0	
Мъжки прасета		Женски прасета		
Дясна страна	Лява страна	Дясна страна	Лява страна	
	Начал	на част (µm)		
A0/B0 101,6±19,69	B0 102,8±8,90	A0 95,57±22,32	104,5±7,19	
	Средн	на част (µm)	10	
A0/B0/C4 47,32±16,76	B0/C3 57,21±4,62	AO/C3 46,51±24,20	C4 41,97±14,78	
	Крайн	на част (µm)		
AO/B0/CO 60,19±17,71	B0/C0 61,59±14,61	AO/C0 60,08±16.,33	C0 57,64±13,12	

 Π_{a}

Таблица 7. Дебелина на *lamina propria mucosae*.

0 – липса на значима разлика

3, 4 – степен на значима разлика при p<0.001/0.0001

А – статистически значима разлика между дясна и лява част на тръбата

В – статистически значима разлика между мъжки и женски индивиди за съответната дясна или лява част на тръбата

С – статистически значима разлика спрямо надстоящия ред

Дължината и ширината на лимфните възелчета (noduli lymphatici aggregati tubarii) показаха значително по-високи стойности в началната част в сравнение със средната част на тръбата, с изключение на дължината им в лявата тръба на мъжките индивиди, и дясната тръба при женските индивиди, където стойностите на тези показатели бяха близки. (Таблица 8). Липсваше значима разлика между дължината и ширината на възелчетата при сравняване на дясната с лявата тръба.

5 F	Ver with the state of a	Marrante maa			
IVI BASI	di fipaceta	ленски прасета			
Дясна страна Лява страна		Дяена страна	Лява страна		
	Начална част – дълг	жина/ширина (µm)			
A0/B0 A0/B0	B0 B0	A0 A0			
131,8 ±30,34	96,62±14,77	$100,5\pm8,24$	104,9±12,34		
99,21±13,83	80,12±18,41	81,85±9,58	90,86±20,14		
	Средна част – дъля	сина/ширина (μm)	Antonia Materia antonia dal		
A0/B0/C2 A0/C1	B0/C0 B0/C1	A0/C0 A0/C1	C1 C1		
76,78±28,39	82,15±20,76	98,07±29,13	89,81±25,42		
58,86±17,34	58,79±9,71	55,97±9,13	49,22 ±8,05		
- Contration - March - March	Крайна част – дъли	кина/ширина (µm)			
•2	-	-			

Таблица 8. Дължина и ширина на лимфните възелчета (*noduli lymphatici aggregati tubarii*). Данните са представени като средни стойности ± стандартно отклонение (Mean±SD).

0 – липса на значима разлика

1, 2 – степен на значима разлика при р<0.05/0.01

А – статистически значима разлика между дясна и лява част на тръбата

В – статистически значима разлика между мъжки и женски индивиди за съответната дясна или лява част на тръбата

С – статистически значима разлика между средна и начална част на тръбата

Описаните особености за основните структурни компоненти на слуховата тръба бяха по-ясно разграничени след селективното оцветяване по Ван Гизон (Van Gieson), както е показано на фигура 30 и фигура 31. Идентична картина беше наблюдавана и при оцветяването с алцианово синьо – сафранин (Фиг. 42 и Фиг. 43).





Фиг. 35. Напречен срез през средната част на лява слухова тръба при женско прасе. Колагенни влакна, оцветени по Ван Гизон (VG). L – лумен, m – m. levator veli palatini, Lm – cartilage tubae auditivae (lamina cartilaginis medialis), Ll – cartilage tubae auditivae (lamina cartilaginis lateralis), tc – мастна тъкан. Линия = 500 µm.

Фиг. 36. Напречен срез през средната част на лява слухова тръба при женско прасе. (VG). L – лумен, е – епител (lamina epithelialis mucosae), pr – проприя (lamina propria mucosae), с – cartilage tubae auditivae. Линия = 100 µm.

Оцветяването с орцеин убедително показа наличие на еластични влакна в хрущяла на слуховата тръба, в перихондриума, в съединителната тъкан и в стената на кръвоносните съдове около тръбата (**Фиг. 37**).



Фиг. 37. Напречен срез през средната част на лява слухова тръба при мъжко прасе (Orcein). Cart – cartilage tubae auditivae с добре видими хондроцити и мрежа от еластични влакна около тях. el – еластични влакна в перихондриума и съединителната тъкан, ar – малки артерии с добре видима вътрешна еластична мембрана. Линия = 250 μm.

Най-силно изразена реакция беше установена в еластичния хрущял, където влакната образуваха мрежа около лакуните (*lacunae cartilagineae*), с разположените в тях предимно единични хондроцити. В съединителната тъкан те показваха леко нагънат ход без видимо оформяне на мрежа. В перихондриума обаче влакната оформяха слабо изразена на места мрежа от тънки влакна. Разположените около хрущяла и в съединителната тъкан малки артерии притежаваха ясно изразена вътрешна еластична пластинка (мембрана) – *lamina elastica interna*. Външната еластична пластинка, *lamina elastica externa* също беше оформена, но в по-слаба степен.

Изследванията върху разпределението на мастоцитите в стената на слуховата тръба бяха извършени върху препарати, оцветени с толуидиново синьо и с алцианово синьо-сафранин. Светлинното микроскопско наблюдение показа, че преобладаващата част от мастоцитите са разположени предимно в близост съдовете от микроциркулаторното съдово русло – артериоли и венули, или в адвентицията им близо до малките кръвоносни съдове, до/или в адвентицията както и до базалната мембрана от стената на капилярите – *mastocytus perivascularis*. Подобна локализация беше наблюдавана и в близост до малките кръвоносни съдове (**Фиг. 38** и **Фиг. 39**).



Фиг. 38. Напречен срез през началната част на дясна слуховата тръба при женско прасе (ТВ). е епител (lamina epithelialis mucosae), рг – проприя (lamina propria mucosae), vl – венула, Стрелки – мастоцити. Линия = 100 µm.



Фиг. 39. Напречен срез през началната част на дясна слуховата тръба при женско прасе (ТВ). е – епител (lamina epithelialis mucosae), рг – проприя (lamina propria mucosae), vl – венула, arl – артериола, gl – жлеза, Стрелки – мастоцити. Линия = 20 µm.

Подобна реакция беше наблюдавана в хрущяла и в жлезите (вж. Фиг. **39**).

Почти всички открити толуидиново синьо позитивни мастоцити (TB⁺) показваха добре изразена γ-та метахромазия. Формата на клетките с видими ядра беше предимно овална, с размери на разрезната им повърхност, представени в **таблица 9**. Мастоцити в мускулния слой на стената на кръвоносните съдовете не бяха открити.

Таблица	9. Дължина и	і ширина н	а мастоцитите.	

Данните са представени като средни стойности \pm стандартно отклонение (mean \pm SD).

	Г	олемина	на мастоп	итите ×400 (mean±SD)	
	Мъжки пр	расета			Женски	прасета	
Дясна страна		Лява страна		Дясна страна		Лява страна	
Дължниа	Ширпва	Дължина	Шпрпна	Дължния	Шярана	Дължния	Шприна
			Начална	част (µm)	10		
A0/BO/D4	A0/BO	D4		A0/BO/D4	A0	D4	
8,01±2,07	4,15 ±0.83	7,78 1,39	4,20=0,615	8,16±2,02	$4,06\pm0,84$	7,71±1,86	4,12=1,09
			Средна	част (µm)			
A0/B0/C0/D4	A0/BO/C0	C0/ D4	C0	A0/BO/C2/D4	A0	C2/D4	CO
8,72±2,34	4,65±1,45	7,38±1.48	4,05±0,51	10.04±1.92	4,86±0,98	9.23±2.95	5,47±1,73
			Крайна	част (µm)	12	8	
A0/B0/C0D4/	A0/BO/C0	C0/D4	CO	A0/BO/C4/D4	A0	C4/ D4	CO
7,61±2,70	4,15±0,80	6,41±1,69	4,53±1,34	7,84±2,08	$4,18\pm1,53$	$5,76\pm 2,86$	3,56±1,55

0 – липса на значима разлика

2, 4 - степен на значима разлика при p<0.01/0.0001

А - статистически значима разлика между дясна и лява част на тръбата

В – статистически значима разлика между мъжки и женски индивиди за съответната дясна или лява част на тръбата

С – статистически значима разлика спрямо надстоящия ред

D - статистически значима разлика между дължина и ширина на мастоците

Във всички части на дясната и лявата ТА, дължината на мастоцитите беше значително по-голяма от тяхната ширина. Не беше установена разлика у двата пола в стойностите на дължината и ширината им при дясната и лявата слухова тръба.

При мъжките индивиди, в трите части на дясната и лявата ТА, дължината и ширината на мастоцитите бяха със сходни стойности.

При женските индивиди обаче, най-дълги мастоци бяха установени в средната част на дясната и лявата ТА, последвана от началната й част и с наймалка дължина – в крайната й част (**Таблица 9**).

Ширината на мастоцитите в трите части на тръбата при женските индивиди показа същата зависимост, но без значима статистическа разлика.

Наблюдаваните в проприята мастоцити (mastocytus mucosus) в преобладаваща част бяха без видима реакция на дегранулация. Намерените в хлабавата съединителна тъкан около тръбата мастоцити обаче, показваха различно изразена степен на дегранулация, демонстрирана с червено-виолетов участък (воал) около клетката. Освен това, в цитоплазмата на някои от мастоцитите ясно личаха и по-тъмно оцветени гранули (**Фиг. 40** и **Фиг. 41**). Наблюдавани бяха и случаи, при които не се виждаха гранули в метахроматично оцветената цитоплазма на мастоцитите.

Макар и рядко се установиха единични мастоцити, които с повече от половината си повърхност бяха локализирани между съседни епителни клетки на жлезен изводен канал (**Фиг. 41**).





Фиг. 41. Мастоцит (mc*) в стената на канал и в адвентицията (mc**) на малка артерия в съединителната тъкан (TB). Линия = 20 µm.

При двукратно оцветяване на едни и същи срезове – първо с 0,02 w/v на Berberine neutral sulfate, наблюдение с флуоресцентен микроскоп и фотографиране, а след това оцветяване с 0,1 % разтвор на толуидиново синьо и рефотографиране, бяха установено различия в броя на мастоцитите (**Фиг. 42**). Сравняването на броя на берберин позитивните (хепарин съдържащи) мастоцити с този, установен след преброяването на същите полета с толуидиново синьо, наблюдавани като синьо-виолетови овални структури показа, че около 80 % от тях бяха берберин-положителни, наблюдавани като светлозелени овални структури.

Наред с това правеше впечатление, че ендотела на съдовете и цитолемата на мастните клетки (адипоцити) показваха добре изявена флуоресценция, с типичен за FITC (Fluorescein-5-isothiocyanate) жълтозелен цвят (Фиг. 42).



Фиг.42. Напречен срез през средната част на лява слухова тръба при мъжко прасе. Ляво – Берберин сулфат, Дясно – Толуидиново синьо. Стрелки (бели и черни) – хепарин позиивни мастоцити. Линия = 100 µm.

Оцветяването с алцианово синьо – сафранин (pH 1,42) също показа отчетлива разлика в отделните структури на слуховата тръба (Фиг. 43 и Фиг. 44).



Фиг. 43. Напречен срез през средната част на дясна слухова тръба при мъжко прасе. Алцианово синьо – Сафранин (A/S). L – лумен, е – епител (lamina epithelialis mucosae), рг – проприя (lamina propria mucosae), m – m. levator veli palatini Lm – хрущял (lamina cartilaginis medialis), Ll – хрущял (lamina cartilaginis lateralis), gl – жлези. Линия = 500 µm.



Фиг. 44. Напречен срез през средната част на дясна слухова тръба при мъжко прасе. (A/S). L – лумен, е – епител (lamina epithelialis mucosae), pr – проприя (lamina propria mucosae), gl – жлеза, с – cartilage tubae auditivae (lamina cartilaginis medialis). Линия = 500 µm.

Силна сафранин (S⁺) позитивна реация беше наблюдавана в хрущяла на тръбата, последвана в по-слаба степен и в епитела на лигавицата. Съединителнотъканните влакна в проприята бяха с предимно алцианово синьо (A⁺) положителна реактивност.

Светлинномикроскопските наблюдения показаха наличие на три вида мастоцити, реагирали по различен начин – алциан-позитивни (A^+), сафранин-позитивни (S^+) и алциан/сафранин (A^+/S^+) положителни. Значително по-голям беше броя на първите, докато останалите два типа бяха представени от единични клетки. Преобладаваща част от A^+ клетки беше установена в проприята на лигавицата, а по-малката част, реагирали като S^+ и A^+/S^+ в съединителната тъкан (**Фиг. 45**).

Също така беше установена добре изразена реакция за кисели муцини по апикалната повърхност на епителните клетки, както и в съединителната тъкан, разположена между проприята и хрущяла на тръбата. Същата експресия демонстрираха и чашковидните клетки, които се открояваха контрастно между оцветения в червено епител. Както вече се спомена, силно изразена позитивност към сафранин беше установена и в хрущяла на тръбата (**Фиг. 46**).





Фиг. 45. Част от проприята и съседен участък от стената на лява слуховата тръба при женко прасе. (A/S). Стрелка – A^+ , Глава на стрелка – S^+ , Стрелка* – A^+/S^+ позитивни мастоцити. Линия = 50 µm.

Фиг.46. Начална част от лява слуховата тръба на женско прасе (A/S). cart – cartilage tubae auditivae, pr – проприя (lamina propria mucosae), ер – епител (lamina epithelialis mucosae), lum – лумен, (*) – чашковидни клетки със секрет, Стрелки – секрет по апикалната повърхност на епитела. Линия = 100 µm.

4.11. ЕНЗИМОХИСТОХИМИЧНИ (ЕНЗИМОХИМИЧНИ) И ИМУНОХИСТОХИМИЧНИ (ИМУНОХИМИЧНИ) МЕТОДИ

4.11.1. Ензимохистостохимично изследване за NADPH – диафоразна реактивност.

Светлинното микроскопско наблюдение показа различна реактивност на NADPH-d в структурите на лигавицата на слуховата тръба. Ензимната активност беше визуализирана в различни нюанси на синия цвят – от тъмносиньо до светлосиньо, поради което тя се отчиташе като силна, средна (умерена) и слаба по степен.

Епителът на лигавицата показа силна ензимна активност, а жлезният епител в проприята беше със силна до умерена ензимна активност (Фиг. 47).



Фиг. 47. Стена на лява слухова тръба при мъжко прасе (ляво). Силна NADPH-d експресия в епитела на тръбата и в ендотелна на кръвоносните съдове. Силна до умерена NADPH-d позитивни жлезни клетки, локализирани в проприята на лява слуховата тръба при женско прасе (дясно). е – епител (lamina epitelialis mucosae), pr – проприя (lamina propria mucosae), bv – кръвоносните съдове, adp – мастна тъкан, Стрелка – NADPH-d позитивни клетки, GL – gl. tubariae. Линия = 50 µm (ляво), Линия = 60 µm (дясно).

В ендотелния слой на артериите, артериолите, капилярите, венулите и вените беше наблюдавана силна ензимна активност (Фиг. 48 и Фиг. 49). Реактивността на гладкомускулните клетки в средната обвивка на съдовете обаче, беше слаба до умерена (Фиг. 48). За отбелязване е, надлъжно и тангенциално разположени кръвоносни съдове бяха много добре визуализирани (Фиг. 49).

NADPH-d положителни мастоцити бяха наблюдавани предимно в съседство с кръвоносните съдове, както и в съединителната тъкан (**Фиг. 49**).



Фиг. 48. Силна NADPH-d експресия в ендотела и слаба до средна експресия в мускулния слой на артерия. L – лумен, Tm – мускулен слой (tunica media с myocytus levis), е – епител (lamina epitelialis mucosae). Стрелки – ендотелен слой със силна реакция, аdp – мастна тъкан. Линия = 100 µm.



Фиг. 49. Стена на дясна слухова тръба на мъжко прасе – тангенциално сечение на малка артерия. Силна ензимна експресия в ендотела на кръвоносните съдове, както и в съседно разположените мастоцити. Стрелки –мастоцити. art – артерия, pr – проприя (lamina propria mucosae), adp – мастна тъкан, Линия = 100 µm.

4.11.2. Имунохистохимична реакция за доказване на азот окис синтаза (NOS).

При светлинномикроскопските наблюдения беше установена азот оксид синтазната експресия в нитрергични автономни нерви, разположени в проприята (**Фиг. 51**). Експресия, но в по-слаба степен беше установена в кръвоносните съдове и в единични мастоцити. Те бяха установени в проприята, в съседство с фибрознохрущялната обвивка.



Фиг. 51. Нитритергични автономни нерви (стрелка) в съседство с кръвоносни съдове в проприята на дясна слуховата тръба на мъжко прасе. PR – lamina propria mucosae. Линия = 50 µm.

5. ИЗВОДИ

- 1. Слуховата тръба е по-дълга при женските индивиди.
- 2. Единствената видима част на тръбата върху разполовени глави е фарингеалния й отвор *ostium pharyngeum tubae auditivae*.
- 3. Основен кръвоносен съд е *a. palatina ascendens*, която се отделя от *a. faciallis* и показва три типа на разклоняване.
- 4. В кръвоснабдяването вземат участие клонове от *a. temporalis profunda* caudalis, a. meningea media и rete mirabile epidurale rostrale.
- 5. В началната част на слуховата тръба лигавицата е дихателна (*mucosa respiratoria*) с лимфоидни структури, които оформят мукозо-свързаналимфоидна-тъкан.
- 6. На шест месечни прасета по цялата дължина тръбата е хрущялна.
- Мастоцитите в стената на слуховата тръба са разпределени неравномерно и показват специфична реакция при оцветяване по различни селективни методи.
- Реагиралите положително структури за никотинамид аденин динуклеотид фосфат-диафораза и за азот окис синтаза в стената на слуховата тръба дават основание да се смята, че в тях съществува метаболитен път за синтез на азотен оксид.
- 9. За пръв път при домашната свиня върху корозионни препарати е визуализирано стеснение на слуховата тръба.

6. ПРИНОСИ

6.1. Оригинални приноси

1. Описано е анатомотопографско положение на *ostium pharyngeum tubae auditivae* и определено синтопичното му отношение със съседните структури, като са използвани стандартни точки от скелета на главата и прекарани линии между тях.

2. За пръв път се представят метрични данни за дължината, ширината и височината на слуховата тръба, и нейните два отвора, получени след използване на различни методи и начини на измерване.

3. За пръв път е извършено иновативно сравнително изследване на метричните данни между двата пола, както и между тези за десни и леви половини на главите. Установено е, че дължината на слуховата тръба е с повисоки стойности при женските животни.

4. Чрез използване на ново поколение силикон, въведен през външния слухов проход с максимална точност е определен релефа на лумена на тръбата.

5. Определена е проекцията на слуховата тръба върху кожата чрез използване на точките Ent (Entorbitale) и Ot (Otion) и адаптирани за целта мислена точка и линии на нативни препарати.

6. За разлика от известното от литературата е установено, че основната артерия, която кръвоснабдява слуховата тръба на свинята – *a. palatina ascendes* се отделя от *a. facialis*. Описани са три типа в разделянето й и са дадени стойности за калибъра на артерията.

7. В комбинация са приложени различни методи за визуализине на артериалната система – корозия, корозия с рентгенография, желатинова смес – рентгенография и корозия, желатинова смес и конусно-лъчева компютърна томография, и е направен сравнителен анализ.

8. За пръв път иновативно чрез методите пластинация и диафонизация е изследвана слуховата тръба при домашната свиня, а върху препаратите са направени морфометрични измервания.

9. За пръв път са изследвани и описани различни характеристики на мастоцитите в слуховата тръба на домашната свиня.

10. Намерената позитивна експресия на NADPH-d и на NOS в различни структури показва, че в слуховата тръба на домашната свиня съществува метаболитен път за синтез на азотен оксид.

6.2. Потвърдителни приноси

1. Слуховата тръба при домашната свиня е с хрущялна основа по цялата си дължина и е разположена изцяло в костен полуканал, *semicanalis tubae auditivae*.

2. Върху нативни препарати и отливки след корозия на меките тъкани е установено, че слуховата тръба е с форма на пресечен конус с ростродорзална и вентрокаудална стени.

3. Сравняването на образите от рентгенография на корозионни препарати и след изпълване с триоловен четириоксид – желатин показа подобър контраст при последните.

4. Основният кръвоносен съд, който снабдява слуховата тръба е възходящата небцова артерия – *a. palatina ascendens*.

5. Началната част на слуховата тръба е покрита с респираторна лигавица. Лимфоидните образувания в нея могат да се определят като Мукозо – Свързана – Лимфоидна – Тъкан (MALT).

6. Дебелината на епителния слой, проприята и количеството на чашковидните клетки в отделните части на слуховата тръба е различно.

7. Установени са и двата типа мастоцити в лигавицата – mastocytus mucosus и около кръвоносните съдове – mastocytus perivascularis.

8. Различна по степен реакция за NADPH-d беше установена в стената на кръвоносните съдове и мастоцитите.

7. ПРЕПОРЪКИ

1. За изваждане на слуховата тръба от разполовена по медианната равнина глава да се използват точките Akrokranion, Hormion и Staphylion за определяне на линии, които достигат зад *sella turcica* и до *protuberantia occipitalis interna*.

2. Адитивният силикон с повишена хидрофилност и нисък вискозитет (Perfect-F Light Premium-set, Type 3, Han Dae Chemical-Korea) е много подходящ за получаване на точни отпечатъци от кухината на слуховата тръба и средното ухо.

3. За изпълване на кръвоносни съдове с успех може да бъде използван конструираният за тази цел инжекционен винтов механизъм.

4. Методите пластинация и диафонизация могат с успех да се използват за изследване и изучаване на слуховата тръба.

5. Рентгенографията на корозионни препарати от акрилатна пластмаса може да се използва с успех за изследване на кръвоносната система.

8. НАУЧНА АКТИВНОСТ

8.1. Научни публикации

- 1. **Nikolay Tsandev**, Ivailo Stefanov, Angel Vodenicharov, 2012. NADPH d expression in mast cells of porcine tube auditivae. *Acta morphologica et anthropologica*, 18, 84-87.
- Nikolay Tsandev, 2020. Arterial vascularisation of pig's auditory tube with respect to a. Palatina ascendens – a corrosion cast and morphometric study. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 26, №1, 32-39.
- 3. Nikolay Tsandev, Angel Vodenicharov, Ivaylo Stefanov, 2020. Morphometric Study of the Domestic Swine Auditory Tube. Acta morphologica et anthropologica, 27, (1 - 2), 92-97.

8.2. Участия в научни форуми

- 1. Nikolay Tsandev, Angel Vodenicharov, Ivailo Stefanov. Arterial vascularization of pig's auditory tube a corrosion cast study. VII Национална конференция с международно участие "Морфологични дни", София, 8-10 Юни 2018.
- 2. Nikolay Tsandev, Caner Bakici, Angel Vodenicharov, 2019. Evaluation of the compatibility between corrosion casts and 3D reconstruction of pig head arterial system on cone beam computed tomography. In: Proceedings from the Second Conference "Veterinary Medicine in International Scientific Service of People", Stara Zagora, Bulgaria, 19 October 2019.
- 3. **Nikolay Tsandev**, Angel Vodenicharov, Ivailo Stefanov. Using of Diaphonization for Study of Domestic Pig's Auditory Tube. XI International Symposium on clinical anatomy. Department of Anatomy and Cell Biology, Medical University, Varna, 2-4 October 2020.
- 4. **Nikolay Tsandev**, Angel Vodenicharov. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase (NADPH-d) reactivity in the wall of porcine auditory tube. XXV National Congress of the Bulgarian Anatomical Society with International Participation. Medical university, Department of Anatomy, histology, cytology and biology, Pleven, Bulgaria, 28-30 May 2021.
- 5. **Nikolay Tsandev**, Angel Vodenicharov. Early historiography of the auditory tube. Jubilee International Scientific Conference "One Health" Faculty of Veterinary Medicine, Trakia University, Stara Zagora, Bulgaria, 12 May 2023.

9. SUMMARY

On 260 clinically healthy 6-month-old pigs with a body weight of 90 - 110 kg/b.w., of both sexes (Bulgarian white x Landrace), slaughtered for meat consumption in accordance with Bulgarian legislation, complex studies were carried out on the structural features and blood supply of the auditory tube.

An original access for removing the tube was developed and the projection of the tube onto the skin was presented for the first time. It is found that at this age the auditory tube is completely cartilaginous.

On casts of the tuba's lumen both the external relief and its narrowest part are described, and a suitable scheme is drawn up, giving detailed information about its two openings and the three parts of the *tuba auditiva*, lying between them. A new generation silicone elastomer has been used with particularly good success, which is inserted through the external auditory canal.

The measurements of the auditory tube and its two openings are of original character. They show that the tube is longer in female individuals, and in both sexes it is entirely cartilaginous.

For the first time, detailed information on the blood supply of the auditory tube in the domestic pig has been presented, and in contrast to the literature data, it has been established that the main artery that supplies blood to the tube – the ascending palatine artery, *a. palatina ascendens*, separates *from a. facialis* and not from *a. lingualis*. Three types in its division are described, and metric values for the caliber of the artery are given.

For the visualization of the arterial system, a comparative analysis of the data from the different methods applied - corrosion, corrosion with radiography, gelatin mixture - radiography, and cone-beam computed tomography, was applied for the first time.

Data useful for training and future research were also obtained from the application for the first time in the domestic pig of two other methods - plastination and diaphonization.

Histological and histochemical studies carried out using different methods add to the knowledge of the microscopic anatomy of the tube in the domestic pig. For the first time, data on the distribution of mast cells and their histochemical characteristics, regarding the content of heparin, biogenic amines and glycosaminoglycans, are reported.

Enzyme- and immunochemical studies to prove structures related to nitric oxide synthesis have shown that the majority of them, incl. and mast cells, show positive expression for NADPH-d. In addition, a positive NOS reaction was found in nitrergic nerves located in the proria.

The data from the morphometric studies were processed statistically.

In conclusion, the obtained original data on the macro- and microscopic anatomy of the auditory tube in the domestic pig, including its topographical anatomy, without a doubt expand and validate the existing data on this important not only for veterinary anatomy animal species.