

УДК: 611.013;591.4;591.3+616.21/.22;616.28

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ, МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ И ХИРУРГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ РЕПАРАТИВНЫХ ГИСТОГЕНЕЗОВ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ПОВРЕЖДЕНИЙ БАРАБАННОЙ ПЕРЕПОНКИ В УСЛОВИЯХ РЕМИССИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ХРОНИЧЕСКОГО ГНОЙНОГО СРЕДНЕГО ОТИТА

В.А. ДОЛГОВ*, Н.Н. ШЕВЛЮК*, Н.И. ИВАНОВА**, Л.Б. ЛУНЬКОВА**

* *ФГБОУ ВО Оренбургский государственный медицинский университет Минздрава России, ул. Советская, д. 6, г. Оренбург, 460000, Россия, e-mail: k_histology@orgma.ru*

** *Оренбургский областной врачебно-физкультурного диспансер, ул. Постникова, д. 11, г. Оренбург, 460000, Россия, e-mail: k_histology@orgma.ru*

Аннотация. Целью исследования явилось определение оптимальных условий для восстановления целостности барабанной перепонки у животных на стадиях ремиссии хронического гнойного среднего отита. Объектами исследования служили 30 беспородных собак, на которых моделировали хронический гнойный средний отит, приводящий к возникновению перфораций различного размера в барабанной перепонке. После проведенной противовоспалительной терапии животным проводили миринопластику с использованием наноструктурированного биопластического материала на основе гиалуроновой кислоты. По срокам проведения миринопластики животные были разделены на 5 групп. Животным первой группы миринопластику проводили через 1 неделю после завершения лечения, животным 2-й группы – через 2 недели, животным 3-й группы – через 3 недели, животным 4-й группы – через 4 недели, животным пятой группы – через 12 недель. Животных из эксперимента выводили через 2 недели после проведения миринопластики. На сроках 1, 2, 3, 4 и 12 недель после завершения антимикробной терапии исследовали общую микробную обсемененность слизистой оболочки среднего уха. Полученный материал обрабатывали с использованием гистологических, гистохимических и морфометрических методов исследования. Результаты исследования показали, что общий показатель микробной обсемененности и лейкоцитарная инфильтрация эпителиев и соединительной ткани были наиболее низкими в период 2-4 недель после завершения воспаления. Наибольшая пролиферативная активность эпителиев и клеток фибробластического дифферона соединительной ткани (на основе учёта их митотической активности) наблюдалась в барабанной перепонке с конца первой до конца второй недель после завершения противовоспалительного лечения, что свидетельствует о наиболее высокой репаративных потенциях тканей барабанной перепонки в этот период. Синтетическая активность фибробластов была наиболее выражена на второй неделе. Таким образом, оптимальные условия для восстановления целостности барабанной перепонки при миринопластике выявлены в случаях, когда миринопластика проводилась через 1-2 недели после стихания воспалительного процесса. У всех животных, которым миринопластика проводилась через 1 и 2 недели после завершения лечения, наблюдалось полное гистиотипическое восстановление целостности барабанной перепонки.

Ключевые слова: барабанная перепонка, гнойный средний отит, эпителий, соединительная ткань, миринопластика.

MORPHOFUNCTIONAL, MICROBIOLOGICAL AND SURGICAL ASPECTS OF REPARATIVE HISTOGENESIS IN THE TREATMENT OF INJURIES OF THE TYMPANIC MEMBRANE IN CONDITIONS OF REMISSION OF EXPERIMENTAL CHRONIC PURULENT OTITIS MEDIA

V.A. DOLGOV*, N.N. SHEVLYUK*, N.I. IVANOVA**, L.B. LUNKOVA**

* *Orenburg State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Sovetskaya Str., 6, Orenburg, 460000, Russia, e-mail: k_histology@orgma.ru*

** *Orenburg Regional Medical and Sports Clinic, Postnikov Str., 11, Orenburg, 460000, Russia, e-mail: k_histology@orgma.ru*

Abstract. The purpose of the study was to determine the optimal conditions for restoring the integrity of the tympanic membrane in animals at the stages of remission of chronic purulent otitis media. The subjects of the study were 30 mongrel dogs, which simulated chronic suppurative otitis media, leading to perforations of various sizes in the tympanic membrane. After the anti-inflammatory therapy, the animals were treated with myringoplasty using a nanostructured bioplastic material based on hyaluronic acid. According to the timing of myringoplasty, animals were divided into 5 groups. The animals of the first group of myringoplasty were given 1 week after completion of the treatment, the animals of the 2nd group - in 2 weeks, the animals of the 3rd group - in 3

weeks, the animals of the 4th group - in 4 weeks, the animals of the fifth group - after 12 weeks. The animals were withdrawn from the experiment 2 weeks after the myringoplasty. At terms 1, 2, 3, 4 and 12 weeks after the completion of antimicrobial therapy, the general microbial contamination of the middle ear mucosa was investigated. The obtained material was processed using histological, histochemical and morphometric methods of investigation. The results of the study showed that the overall index of microbial contamination and leukocyte infiltration of epithelium and connective tissue were the lowest in the period of 2 to 4 weeks after the end of the inflammation. The most pronounced proliferative activity of epithelia and fibroblastic connective tissue differon cells (based on their mitotic activity) was observed in the tympanic membrane from the end of the first to the end of the second week after completion of the anti-inflammatory treatment, which indicates the highest reparative potency of the tympanic tissues in this period. Synthetic activity of fibroblasts was most pronounced in the second week. Thus, the most optimal conditions for restoring the integrity of the tympanic membrane during myringoplasty were identified in cases. Myringoplasty was performed 1 to 2 weeks after the inflammation process. All animals that received myringoplasty 1 and 2 weeks after the end of treatment had complete histotypic restoration of the integrity of the tympanic membrane.

Key words: tympanic membrane, purulent otitis media, epithelium, connective tissue, myringoplasty.

Введение. Вопросы репаративных морфо- и гистогенезов в условиях взаимодействия про- и эукариот относятся к числу наиболее актуальных направлений медико-биологических исследований [11]. Однако, несмотря на значительное число работ, посвящённых этим вопросам, многие аспекты репаративных гистогенезов в условиях инфицирования организма продолжают оставаться дискуссионными и нуждаются в уточнении и дополнении [12, 13, 15]. К числу таким вопросов относятся и вопросы восстановления повреждений барабанной перепонки, возникающих в результате гнойного среднего отита. Результаты мирингопластики зависят от многих причин. Так, на результаты мирингопластики влияют состояние микробной обсеменённости барабанной полости, сроки проведения мирингопластики на стадиях ремиссии хронического гнойного среднего отита [2, 7, 12, 14]. В значительной степени определяет результаты мирингопластики и репаративные возможности тканей барабанной перепонки на разных сроках ремиссии хронического отита [3, 9, 10].

Цель исследования – определить оптимальные условия для мирингопластики исходя из состояния показателей микробной обсеменённости барабанной полости, активности регенеративных процессов тканей барабанной перепонки и сроков ремиссии хронического гнойного среднего отита.

Материалы и методы исследования. В работе использовались 35 подопытных собак. У 30 собак был воспроизведён экспериментальный хронический гнойный средний отит путём четырёхкратного инфицирования барабанной полости штаммом золотистого стафилококка из коллекции культур Оренбургского института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН. Первое введение 1,0 мл. 5 млрд. взвеси суточной культуры золотистого стафилококка производилось для воспроизведения отита, второе, третье и четвертое – на 10, 20 и 30 сутки наблюдения для создания хронического воспалительного процесса. В результате длительного гнойного воспалительного процесса у всех животных наблюдались повреждения барабанной перепонки (перфорации барабанной перепонки различной величины). Через 40 дней после воспроизведения отита у 5 животных производились гистологические исследования барабанной перепонки (для уточнения наличия хронического течения воспалительного процесса). После этого животных лечили до получения «сухого уха». Контрольную группу составили 5 здоровых собак.

У всех подопытных животных проводилось бактериологическое исследование материала со слизистой оболочки барабанной полости, определяли показатель микробной обсеменённости барабанной полости отдельными таксонами и общий показатель микробной обсеменённости [1, 4, 8]. После этого, при отсутствии в посевах из барабанной полости патогенных микроорганизмов и невысокого общего показателя микробной обсеменённости, подопытным животным производилась мирингопластика. В качестве трансплантата использовался наноструктурированный биопластический материал, созданный на основе гиалуроновой кислоты [6].

По срокам выполнения мирингопластики экспериментальные животные были разделены на 5 групп (по 5 собак в каждой группе). Первой группе животных мирингопластика выполнялась через 1 неделю после лечения и стихания воспалительных явлений в среднем ухе, второй – через 2 недели, третьей группе - через 3 недели, четвёртой – через 4 недели и пятой – через 12 недель «сухого уха».

Прооперированных животных выводили из опыта через 2 недели после мирингопластики. Операцию взятия материала (барабанную перепонку с трансплантатом) для дальнейшего гистологического исследования проводили под операционным микроскопом. Полученный материал фиксировали в 12% водном растворе нейтрального формалина, спирт-формоле, жидкости Боуэна. Парафиновые срезы толщиной 5-7 мкм окрашивали гематоксилином Майера и эозином, перйодатом калия и реактивом Шиффа по Мак Манусу [5]. В гистологических препаратах барабанной перепонки подсчитывали коли-

чество ряда клеточных элементов крови в соединительной ткани, в эпителии определяли митотическую активность, выраженную в количестве митозов на 1000 клеток.

Результаты и их обсуждение. Анализ гистологических препаратов слизистой оболочки барабанной полости подопытных животных через 40 дней отита показал наличие хронического воспалительного процесса в среднем ухе. На фоне небольшого отёка слизистой оболочки барабанной полости отмечены явления нарушения микроциркуляции, морфологическими эквивалентами которой являются стаз форменных элементов крови в капиллярах, и очаговая деструкция их стенки, выход форменных элементов крови из сосудов. В эпителии и соединительной ткани барабанной перепонки наблюдается лейкоцитарная инфильтрация, представленная преимущественно лимфоцитами и макрофагами. Как в многослойном так и в однослойном эпителиях барабанной перепонки выявляется очаговая деструкция эпителиальной ткани.

Анализ результатов бактериологического исследования посева из барабанной полости всех животных, после лечения и получения «сухого уха», установил отсутствие штаммов золотистого стафилококка, использованного для воспроизведения отита. У 12 собак посев был стерильным, у 18 – обнаружены ассоциации непатогенных микроорганизмов (*S.epidermidis*, *Corynebacterium spp.*, *Bacillus spp.*) с разными показателями микробной обсеменённости. У 14 из 18 животных на всех сроках ремиссии отита общий показатель микробной обсеменённости был незначительным и не превышал 1×10^3 колониеобразующих единиц на тампон (КОЕ/тампон), что согласно данным В.А. Долгова [2] не является противопоказанием для выполнения мирингопластики. Остальным 4 животным с общим показателем микробной обсеменённости барабанной полости более 1×10^3 КОЕ/тампон, мирингопластика была перенесена на более поздний срок после дополнительного санирования среднего уха.

В первой группе животных (5 собак) трансплантат прижился и закрыл дефект барабанной перепонки, но только у 3 наблюдалась полная эпителизация поверхности наноструктурированного биопластического материала как со стороны барабанной полости, так и наружного слухового прохода. Митотическая активность эпителиев барабанной перепонки была высокой (в среднем – 8 митозов на 1000 клеток в многослойном эпителии и 2,5 митоза на 1000 клеток в однослойном). То есть, в многослойном эпителии митозы выявлялись чаще, чем в однослойном. У остальных (двух собак) площадь трансплантата только на 2/3 была покрыта эпителием. В соединительной ткани, сохранившейся части барабанной перепонки, располагалось большое количество клеточных элементов фибробластического дифферона, с преобладанием дифференцированных фибробластов над малодифференцированными. Лейкоциты в соединительной ткани и в эпителии встречались редко. Было выявлена миграция клеток фибробластического дифферона из сохранившейся части барабанной перепонки в наноструктурированный биопластический материал, а также врастание кровеносных капилляров в трансплантат. Наличие большого количества как малодифференцированных, так и дифференцированных фибробластов указывало на высокие регенеративные возможности соединительной ткани.

Во второй группе животных (5 собак) трансплантат прижился и закрыл перфорацию барабанной перепонки у всех собак. Площадь прижившихся трансплантатов на 2/3 была покрыта эпителием с обеих сторон. Митотическая активность многослойного и однослойного эпителиев продолжала оставаться на высоком уровне (7,5 митоза на 1000 клеток в многослойном и 2,5 митоза на 1000 клеток в однослойном). Морфофункциональная характеристика эпителиа и структура соединительной ткани барабанной перепонки не отличалась от её строения в 1-й группе животных.

Из 5 животных 3-й группы только у 3 наблюдалось приживание пластины наноструктурированного биопластического материала и закрытие перфорации барабанной перепонки. У 2 собак трансплантат отторгся. У прижившихся трансплантатов только 1/2 часть площади была порята эпителием. Подсчёт числа митозов в эпителиальной и соединительной тканях показал, что пролиферативная активность эпителиа и клеток соединительной ткани была значительно ниже, чем у животных, которым мирингопластика выполнялась на более ранних сроках. Так, в многослойном эпителии барабанной перепонки митотическая активность составляла 4 митоза на 1000 клеток, а в однослойном – 1,5 митоза на 1000 клеток).

В 4-й и 5-й группе животных (по 5 собак в каждой) трансплантат прижился только у 6 собак (по 3 в каждой группе) и закрыл дефект в перепонке. У остальных 4 животных пластина наноструктурированного биопластического материала отторглась и превратилась в сухую корку. Только 1/3 поверхности, прижившихся трансплантатов, в 4-й группе животных была покрыта эпителием, а у прооперированных животных 5 группы (через 12 недель ремиссии) эпителий только начал наслаиваться с края перфорации перепонки. Пролиферативная активность эпителиоцитов и клеток соединительной ткани барабанной перепонки на этот срок ремиссии экспериментального хронического гнойного среднего отита была низкой. В многослойном эпителии барабанной перепонки она была равна 4 митоза на 1000 клеток, а в однослойном – 1,5. В соединительнотканной основе барабанной перепонки этих животных доля соединительнотканых клеток была уменьшена по сравнению с животными 1-3 групп. Среди клеточных элементов соединительной ткани преобладали фиброциты и дифференцированные фибробласты, а в межклеточном матриксе отмечено возрастание доли коллагеновых фибрилл по сравнению с животными 1-3 групп.

Заключение. Таким образом, одним из условий выполнения мирингопластики является отсутствие патогенных микроорганизмов в барабанной полости и невысокий общий показатель микробной обсеменённости условно - патогенных микроорганизмов биотопа, что согласно результатам наших исследований – на стадиях соответствовало начальному сроку ремиссии экспериментального среднего отита 2-4 недели от завершения противовоспалительного лечения. Вместе с тем, как показали наши результаты, наилучшие морфофункциональные результаты получены у животных, которым мирингопластика была произведена через 2 недели ремиссии экспериментального хронического гнойного среднего отита. Это связано с тем, что репаративные возможности эпителиев и соединительной ткани барабанной перепонки в эти сроки была наиболее выраженной. В этот период митотическая активность многослойного и однослойного эпителиев барабанной перепонки была наиболее высокой по сравнению с другими сроками эксперимента. А в соединительной ткани барабанной перепонки с конца первой до конца второй недели ремиссии экспериментального хронического среднего отита была высокой доля дифференцированных фибробластов, ведущих активный синтез фибриллярных структур и основного аморфного вещества. В результате сочетания комплекса позитивных факторов (низкий показатель микробной обсеменённости, высокая митотическая активность клеточных элементов эпителиальной и соединительных тканей, высокая синтетическая активность клеток фибробластического дифферона) у животных, которым мирингопластику проводили на сроках 1 и 2 недели ремиссии хронического среднего отита произошло полное восстановление целостности барабанной перепонки. Об этом свидетельствовал высокий процент (до 100%) эпителизации поверхности трансплантата в первые две недели ремиссии и формирование нового участка барабанной перепонки на месте её дефекта.

Литература

1. Биргер М.О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. Издание 3-е, перераб. и дополн. М.: Медицина, 1982. 464 с.
2. Долгов В.А. Роль микробного биоценоза слизистой оболочки носа, барабанной полости в патогенезе, прогнозировании среднего отита и выбора рациональной терапии мезотимпанита: дисс.... д.м.н. Оренбург, 2007. 253 с.
3. Иванова Н.И., Долгов В.А., Шевлюк Н.Н. Состояние регенеративной активности тканей барабанной перепонки и результаты мирингопластики на разных сроках ремиссии экспериментального среднего отита // Вестник оториноларингологии. 2014. № 5. С. 11–13.
4. Лабинская А.С., Костюкова Н.Н., Иванова С.М. Руководство по медицинской микробиологии. Частная медицинская микробиология и этиологическая диагностика инфекций. Кн. 2-я. М.: Бином, 2015. 1152 с.
5. Пирс Э. Гистохимия теоретическая и прикладная. М.: Изд. иностранной литературы, 1962. 962 с.
6. Рахматуллин Р.Р. Биопластический материал на основе гиалуроновой кислоты: биофизические свойства, аспекты фармакологических свойств // Фармация. 2011. №5. С. 36–39.
7. Усвяцов Б.Я., Паршута Л.И., Долгов В.А. Микробный биоценоз слизистых оболочек носа и среднего уха у больных гнойным отитом // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2000. № 4S. С. 85–88.
8. Фельдман Ю.М. Количественное определение бактерий в клинических материалах // Лабораторное дело. 1984. №10. С. 616–619.
9. Шевлюк Н.Н., Долгов В.А., Иванова Н.И., Лунькова Л.Б. Морфофункциональная характеристика тканей барабанной перепонки в процессе развития экспериментального среднего отита // Вестник новых медицинских технологий. 2016. Т. 23, № 3. С. 143–148.
10. Шевлюк Н.Н., Долгов В.А., Иванова Н.И., Лунькова Л.Б. Особенности репаративных гистогенезов в барабанной перепонке в условиях ремиссии экспериментального хронического гнойного среднего отита // Морфологические ведомости. 2016. Т. 24, № 3. С. 69–74.
11. Шевлюк Н.Н., Стадников А.А. Взаимодействие про- и эукариот и проблемы биологии тканей // Морфология. 2015. Т. 148, № 5. С. 7–13.
12. Щербакова Я.Л., Янов Ю.К., Кузовков В.Е., Мегрелишвили С.М. Нарушения слуха и методы их коррекции // Российская оториноларингология. 2014. № 6. С. 104–110.
13. Cureoglu S.S., Schachern P.A., Paparella M.M., Lindgren B.R. Changes in chronic otitis // Laryngoscope Journal. 2004. Vol. 114, № 4. P. 622–626.
14. Kuczkowski J., Sierszen W., Przewozny T. Diagnosis and treatment complications of chronic otitis media // Eur. Arch. Otorhinolaryngol. 2014. Vol. 271, № 2. P. 421–422.
15. Yorgancilar E., Yildirim M., Gun R., Bakir S., Tekin R., Gosmes C., MERIC F., Topsu J. Complications of chronic suppurative otitis media: a retrospective review // Eur. Arch. Otorhinolaryngol. 2013. Vol. 270, № 1. P. 69–76.

References

1. Birger MO. Spravochnik po mikrobiologicheskim i virusologicheskim metodam issledovaniya. Izdanie 3-e, pererab. i dopoln [Handbook of microbiological and virological research methods]. Moscow: Medicina; 1982. Russian.
2. Dolgov VA. Rol' mikrobnogo biocenoza slizistoj obolochki nosa, barabannoj polosti v patogeneze, prognozirovanii srednego otita i vybora racional'noj terapii mezotimpanita [the Role of the microbial biocenosis of the nasal mucosa, tympanic cavity in the pathogenesis and prognosis of otitis media and rational choice of therapy mezotimpanita][dissertation]. Orenburg (Orenburg region); 2007. Russian.
3. Ivanova NI, Dolgov VA, SHEvlyuk NN. Sostoyanie regenerativnoj aktivnosti tkanej barabannoj pereponki i rezul'taty miringoplastiki na raznyh srokah remissii ehksperimental'nogo srednego otita [The state of regenerative activity of tissues of the eardrum and the results of myringoplasty at different periods of remission of the experimental otitis media]. Vestnik otorinolaringologii. 2014;5:11-3. Russian.
4. Labinskaya AS, Kostyukova NN, Ivanova SM. Rukovodstvo po medicinskoj mikrobiologii. CHastnaya medicinskaya mikrobiologiya i ehtiologicheskaya diagnostika infekcij [Manual of medical Microbiology. Private medical Microbiology and etiological diagnosis of infections]. Kn. 2-ya. Moscow: Binom; 2015. Russian.
5. Pirs E. Gistohimiya teoreticheskaya i prikladnaya [the Histochemistry theoretical and applied]. Moscow. Izd. inostrannoj literatury; 1962. Russian.
6. Rahmatullin RR. Bioplasticheskiy material na osnove gialuronovoy kisloty: biofizicheskie svoystva, aspekty farmakologicheskikh svoystv [Bioplastic material based on hyaluronic acid]. Farmaciya. 2011;5:36-9. Russian.
7. Usvyacov BYA, Parshuta LI, Dolgov VA. Mikrobnyy biocenozy slizistyh obolochek nosa i srednego uha u bol'nyh gnojnym otitom [Microbial biocenosis of nasal and middle ear mucous membranes in patients with otitis media]. ZHurnal mikrobiologii, ehpidemiologii i immunobiologii. 2000;4S:85-8. Russian.
8. Fel'dman YUM. Kolichestvennoe opredelenie bakterij v klinicheskikh materialah [Quantitative determination of bacteria in clinical materials]. Laboratornoe delo. 1984;10:616-9. Russian.
9. SHEvlyuk NN, Dolgov VA, Ivanova NI, Lun'kova LB. Morfofunkcional'naya karakteristika tkanej barabannoj pereponki v processe razvitiya ehksperimental'nogo srednego otita [Morphofunctional characteristics of the tissues of the tympanic membrane in the process of development of experimental otitis media]. Vestnik novykh medicinskih tekhnologij. 2016;23(3):143-8. Russian.
10. SHEvlyuk NN, Dolgov VA, Ivanova NI, Lun'kova LB. Osobennosti reparativnykh gistogenezov v barabannoj pereponke v usloviyah remissii ehksperimental'nogo hronicheskogo gnojnego srednego otita [Peculiarities of reparative histogenesis in the eardrum in terms of remission of experimental chronic suppurative otitis media]. Morfologicheskie vedomosti. 2016;24(3):69-74. Russian.
11. SHEvlyuk NN, Stadnikov AA. Vzaimodejstvie pro- i ehukariot i problemy biologii tkanej [Interaction of Pro - and eukaryotes and problems of tissue biology]. Morfologiya. 2015;148(5):7-13. Russian.
12. SHCHerbakova YAL, YAnov YUK, Kuzovkov VE, Megrelishvili SM. Narusheniya sluha i metody ih korrekcii [hearing Impairment and methods of their correction]. Rossijskaya otorinolaringologiya. 2014;6:104-10. Russian.
13. Cureoglu SS, Schachern PA, Paparella MM, Lindgren BR. Changes in chronic otitis. Laryngoscope Journal. 2004;114(4):622-6.
14. Kuczkowski J, Sierszen W, Przewozny T. Diagnosis and treatment complications of chronic otitis media. Eur. Arch. Otorhinolaryngol. 2014;271(2):421-2.
15. Yorgancilar E, Yildirim M, Gun R, Bakir S, Tekin R, Gosmes C, Meric F, Topcu J. Complications of chronic suppurative otitis media: a retrospective review. Eur. Arch. Otorhinolaryngol. 2013;270(1):69-76.

Библиографическая ссылка:

Долгов В.А., Шевлюк Н.Н., Иванова Н.И., Лунькова Л.Б. Морфофункциональные, микробиологические и хирургические аспекты репаративных гистогенезов при лечении повреждений барабанной перепонки в условиях ремиссии экспериментального хронического гнойного среднего отита // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2018. №6. Публикация 3-16. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2018-6/3-16.pdf> (дата обращения: 17.12.2018). *

* номера страниц смотреть после выхода полной версии журнала: URL: <http://medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2018-6/e2018-6.pdf>