

И.И. ГОРНОСТАЙ¹, О.А. ЮДИНА², Л.Г. ПЕТРОВА³

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ХРЯЩЕВОЙ ТКАНИ, ИСПОЛЬЗУЕМОЙ В ВОССТАНОВИТЕЛЬНОЙ ХИРУРГИИ ПЕРФОРАЦИЙ БАРАБАННОЙ ПЕРЕПОНКИ

¹*ГУ «РНПЦ оториноларингологии»;*

²*ГУ РКМЦ Управделами Президента Республики Беларусь; ³ГУО «БелМАПО»
Минск, Республика Беларусь*

Хронический гнойный средний отит является одной из причин тугоухости, глухоты и внутричерепных осложнений, которые представляют собой важную социально-экономическую медицинскую проблему. Частота заболеваемости хроническими гнойными формами средних отитов, по данным ряда авторов, составляет от 8,4 до 39,2 случаев на 1000 человек [8, 15, 19]. В большинстве случаев заключительным этапом хирургического лечения пациентов с хроническим средним отитом является мирингопластика. От эффективности восстановления целостности барабанной перепонки зависит функциональный и анатомический результат [9, 14, 22]. По данным многих авторов, рецидивы перфорации достигают от 10 до 30% случаев [1, 11, 25, 33, 36, 39]. Проблема выбора трансплантата для закрытия дефекта барабанной перепонки при хронических гнойных средних отитах остается актуальной по настоящее время [3, 5, 6, 17].

Выбор трансплантата зависит от множества факторов, одним из которых является размер перфорации. Как известно, на сегодняшний день в мире наиболее широко применяемыми трансплантатами для мирингопластики являются фасция височной мышцы и хрящ из ушной раковины [12]. У каждого из этих трансплантатов есть свои положительные и отрицательные качества в функциональном и морфологическом аспектах. В публикациях последних лет большинство отечественных и зарубежных

оториноларингологов приходят к выводу, что существенной разницы между фасцией и хрящевыми трансплантатами в функциональном плане не отмечается [2, 18, 26, 30, 32, 35, 37]. Первостепенную важность играет приживаемость трансплантата. В литературе встречается мало научных исследований, в которых рассматриваются механизмы питания трансплантата. Считается, что питательные вещества, вода поступают к нему диффузно из тканей, на которых он расположен и которыми прикрыт. При тотальных и субтотальных перфорациях не всегда удается прикрыть трансплантат меатотимпальным лоскутом большой площади и оставшийся трансплантат находится между двумя воздушными пространствами наружного слухового прохода и барабанной полостью, что значительно затрудняет его питание [7,10,13].

Известно, что эластический хрящ ушной раковины состоит из округлых клеток (хондроцитов), не имеющих отростков, клетки располагаются в капсулах поодиночке или образуют изогенные группы из нескольких ядер, окруженных одной капсулой. Хондроциты можно подразделить по степени зрелости на молодые и зрелые. Молодые сохраняют черты строения хондробластов, они имеют продолговатую форму, развитую гранулярную эндоплазматическую сеть, крупный аппарат Гольджи, способны образовывать белки для коллагеновых и эластических волокон и сульфатиро-

ванные гликозаминогликаны, гликопротеины. Зрелые хондроциты имеют овальную или округлую форму, синтетический аппарат развит в меньшей степени по сравнению с молодыми хондроцитами. В цитоплазме происходит накопление гликогена и липидов. Хондроциты погружены в межклеточное вещество – матрикс. Межклеточное вещество представлено эластическими волокнами (до 95%), пронизывающими его во всех направлениях, коллагеновыми волокнами, протеогликанами и интерстициальной водой. Эластические волокна построены из белка эластина, коллагеновые волокна (до 5%) состоят из коллагена II типа, расположены неупорядоченно. Протеогликаны, составляющие 5-10% от массы хряща, представлены сульфатированными гликозаминогликанами, гликопротеинами, которые связывают воду и волокна. Протеогликаны хряща препятствуют его минерализации. Интерстициальная вода (65-85%) обеспечивает несжимаемость хряща, является амортизатором. Вода способствует эффективному обмену веществ в хряще, переносит соли, питательные вещества, метаболиты.

Известно что, внешняя оболочка клетки является полупроницаемой мембраной. Поэтому мембраны клеток пропускают через себя определенные вещества-растворители, а частицы растворенного вещества оставляют снаружи. Такой процесс называется осмотической реакцией через полупроницаемую мембрану. В 19 веке было замечено, что воду, как универсальный растворитель, клеточные мембраны пропускают через себя с большей скоростью, чем другие растворители. Еще в середине 20 века ученые понимали, что клетки не просто пропускают воду через свою мембрану из межклеточной среды. Вода в клетку поступает со стремительной скоростью. Механизм происходящего оставался неясен. В 2003 г. молекулярный биолог Питер Эгр (Peter Agre) и биохимик Родерик Мак Киннон (Roderick Mac Kinnon) получили Нобелевскую премию в области химии за открытие системы особых протеинов аквапоринов (AQP) – белков, регулирующих межклеточный транспорт воды в тканях. Эти специальные белковые каналы – водопроводящие поры (от лат. aqua и греч. poros – проход,

отверстие) отвечают за «вход» и «выход» воды в клетках [16, 21].

Аквапорины обнаружены во всех клетках внутренних органов, крови и мозга. У млекопитающих они по своему строению и функциям разделяются на 13 групп, обозначаемых как AQP0, AQP1, AQP12 [16, 21, 28, 29, 40-43]. Каждая клетка имеет свой набор аквапоринов, который определяется эволюцией органа и его функцией, но главная функция аквапоринов – трансмембранный транспорт воды по осмотическому градиенту [16, 23, 28, 29, 38, 43]. Проницаемость клеточной мембраны для воды определяется числом аквапоринов в мембране [43]. Аквапорины могут, кроме воды, транспортировать аммиак и другие мелкие молекулы [16, 20]. В зависимости от водной селективности, субстратной специфичности и аминокислотного состава аквапорины делятся на 2 группы. В каждой из групп имеется максимальная схожесть аминокислотной последовательности [16, 21, 28, 29, 40, 41]. Аквапорины первой группы (собственно аквапорины) пропускают только воду. К этой группе относятся AQP0, AQP1, AQP2, AQP4, AQP5, AQP6 и AQP8. Аквапорины AQP6 и AQP8 имеют очень схожий аминокислотный состав и поэтому отнесены в эту группу. AQP6 проницаем как для воды, так и для некоторых анионов, а при низких значениях pH (менее 5,5) может осуществлять транспорт хлоридов. Аквапорин AQP8 проницаем как для воды, так и для мочевины. Вторую группу аквапоринов составляют AQP3, AQP7, AQP9 и AQP10. Они называются акваглицеропоринами, так как проницаемы не только для воды, но и для глицерина и мочевины.

Важно отметить, что аквапорины играют важную роль в поддержании нормальной осмолярности цитоплазмы и принимают участие в увеличении размера и росте клеток растяжением, регулируя трансмембранный поток воды в клетку [31].

В научной литературе сведений о роли аквапоринов в питании трансплантатов при миринопластике не найдено. Имеются данные об открытии AQP1 и AQP3 в хряще коленного сустава и хрящей позвоночника, хрящей верхних дыхательных путей [24, 27, 34]. Каких-либо других аквапоринов в хрящевой ткани достоверно не выявлено.

Мы изучили особенности питания трансплантата, используемого нами при мирингопластике. Для этой цели мы применили фрагментированный хрящевой трансплантат [4].

Материалы и методы

Хрящ козелка тупо выделялся из окружающей соединительной ткани. После забора хрящевая пластинка истончалась при помощи хрящетома до 0,5 мм. Затем между браншами зажимов Бильрот или Кохера в дистальном их отделе помещалась пластинка из набора хрящетома толщиной 0,2 мм, в проксимальном отделе находилась хрящевая пластинка. Таким образом, пластинка толщиной 0,2 мм являлась своеобразным ограничителем толщины раздавливания хряща. Хрящ раздавливался в поперечном и продольном направлениях с сохранением общей фрагментарной целостности до 0,2-0,3 мм. Полученный таким способом хря-

щевой трансплантат, состоящий из мелких фрагментов хряща, связанных между собой «тонкими нитями» получил название фрагментированного хрящевого трансплантата [4]. Правильно отмоделированный хрящ тонкий, подвижный и легко сгибается в любых направлениях.

Для определения возможности втягивания жидкости в хрящевой трансплантат был проведен эксперимент.

Масса подготовленных для тимпанопластики фрагментированных хрящевых аутооттрансплантатов, имеющую одинаковую площадь, с помощью электронных весов модели AS60|220|C|2NRADWG измерялась до и после погружения их в физиологический раствор. Было отмечено увеличение массы трансплантата после смачивания его в физиологическом растворе. Данные эксперимента представлены в табл. 1 и на рис. 1.

Таблица 1

Изменение массы фрагментированного хряща с одинаковой площадью и разной толщиной до и после смачивания в физиологическом растворе

Толщина трансплантата, h, мм	Масса трансплантата до смачивания, m ₁ , грамм	Масса трансплантата после смачивания, m ₂ , грамм	m ₂ /m ₁
0,2	0,03236	0,04271	1,31980
0,2	0,02596	0,03318	1,27830
0,2	0,02756	0,03724	1,35250
0,2	0,03125	0,04079	1,30430
0,3	0,04645	0,06017	1,29670
0,3	0,03309	0,04342	1,31220
0,3	0,05161	0,06944	1,34550
0,3	0,03983	0,05359	1,26880

Статистическая обработка проводилась с использованием пакета Statistica 8.0, лицензия №STA82D175437Q. Выявлена высокая теснота связи между толщиной трансплантата и массой трансплантата до ($r_s=0,87$) и после ($r_s=0,87$) смачивания. Анализ проводился непараметрическим методом Spearman r_s при выбранном уровне статистической значимости $p<0,05$.

При касании фрагментированным хрящом поверхности крови или какой-либо другой контрастной жидкости отмечался подъем уровня этой жидкости по хрящу.

Данное явление в природе называется капиллярным эффектом. Нефраgmentированные хрящевые пластинки таким свойством не обладали. Фраgmentированный хрящ приобретает это свойство, так как после раздавливания его структура становится пористой. Он способен не только втягивать в себя окружающую жидкость, но и удерживать ее. Площадь контакта хряща с жидкостью увеличивается за счет пор, возникающих после его фрагментации. Данное явление улучшения доставки и удержания питательной среды хрящом после его фраг-

ментации обусловлено капиллярным эффектом.

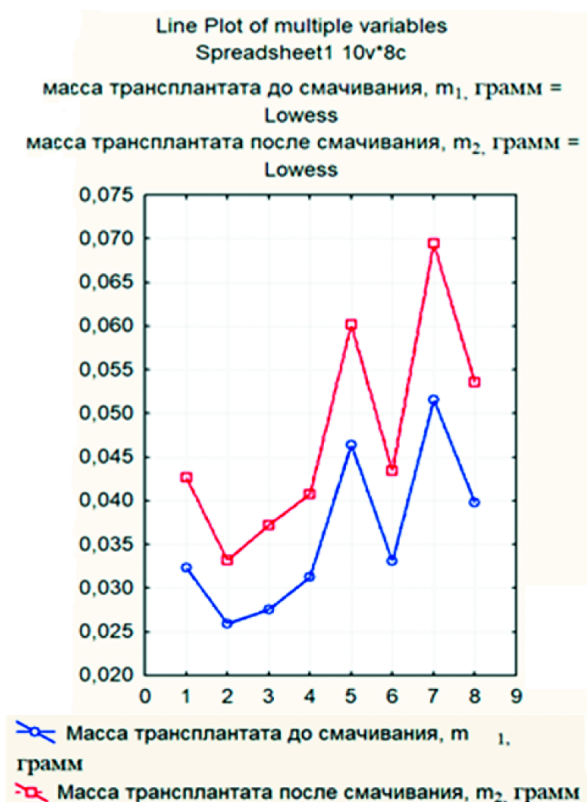


Рис 1. Динамика изменения массы трансплантата до и после смачивания.

Были проведены морфологические и иммуногистохимические исследования, целью которых являлся анализ поступления воды в свободно лежащий трансплантат.

Всего для проведения патогистологического исследования было отобрано 30

случаев, разделенных на 3 группы: нативный хрящ, раздавленный (фрагментированный) и гидратированный физиологическим раствором раздавленный хрящ. Гистологический материал составил 90 образцов ткани. Для оценки морфологических характеристик хрящей из всех кусочков были изготовлены гистологические препараты. Для этого исследуемый материал фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине в течение 24 часов. Гистологическую проводку материала осуществляли в автоматическом режиме с использованием гистопроцессора карусельного типа Leica TP 1020 по стандартной методике (спирты-ксил-парафиновая среда). Адекватность фиксации и проводки материала являлась важнейшим фактором получения достоверного результата дальнейшего иммуногистохимического исследования. Материал заливали в парафиновую среду для микротомирования. Из парафиновых блоков делали срезы толщиной 3 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином. Затем материал подвергали световой микроскопии.

Для выявления локализации эндогенных водных каналов в хряще ушной раковины и выявления роли и транспортной функции аквапоринов также было проведено иммуногистохимическое исследование с антителами к аквапоринам (AQP 1, AQP 3 и AQP 8). С помощью предварительной отработки методики окрашивания нами были выбраны следующие концентрации для каждого антигена (табл. 2).

Таблица 2

Характеристика антител для проведения иммуногистохимического исследования

Антиген	Первичное Антитело	Клон, производитель	Разведение	Позитивный контроль
AQP 1 типа	Rabbit Polyclonal Anti-Aquaporin 1	Abcam	1:2000	Аорта
AQP 3 типа	Rabbit Polyclonal Anti-Aquaporin 3	Abcam	1:500	Аорта
AQP 8 типа	Rabbit Polyclonal Anti-Aquaporin 8	Abcam	1:500	Аорта

Окрашено 288 образцов ткани с учетом отработки методики. Во всех случаях были получены качественные и достоверные результаты иммуногистохимического

исследования. В качестве хромогена применялся DAB 3-диаминобензидин тетрагидрохлорид (Thermo). В качестве внешнего контроля проведения иммуногистохимической реак-

ции были использованы парафиновые блоки тканей, рекомендованных производителем для используемых первичных антител. Окрашенные препараты исследовались в проходящем свете с помощью микроскопа LeicaDM 2500, микрофотосъемка проводилась с увеличением $\times 400$ микрофотокамерой Leica DFC 425. Позитивное окрашивание оценивалось полуколичественно по его локализации в клеточных структурах, распространенности и интенсивности. Критерии балльной оценки степени интенсивности окрашивания: 0 баллов – негативное окрашивание, 1 балл – слабая интенсивность, 2 балла – умеренная интенсивность, 3 балла – сильная интенсивность.

Результаты

Проведен гистологический анализ материала. При световой микроскопии образцов группы нераздавленных хрящей (НХ) выявляли четкие границы хондроцитов и изогенных групп с узкими межклеточными пространствами с выраженной эозинофилией основного вещества. В ядрах хондроцитов визуализируются четкие довольно крупные ядрышки. В части полей зрения клетки имеют зубчатый «географический» контур (рис. 2).

В группе раздавленных хрящей (РХ) изменялся как размер и контур самих хондроцитов и изогенных групп, так и объем и восприятие красителей основным веществом межклеточного матрикса. Клетки частично лишаются части цитоплазмы, сохранившиеся набухают, перинуклеарно появ-

ляется кольцевидная конденсация цитоплазмы. Цитоплазма – со склонностью к базофилии. Ядра в большинстве хондроцитов не прослеживаются. В этих же полях зрения отмечается визуальная интеграция межклеточного вещества и цитоплазматического содержимого (рис. 3).

В группе гидратированных раздавленных хрящей (ГРХ) четко прослеживается уменьшение размеров хондроцитов, анизоцитоз и анизонуклеоз в сравнении с НХ и РХ. Контур клеток размыт, в части полей зрения клетки совершенно не имеют границ и «анастомозируют» друг с другом. Пространства между единичными сохранными клетками заполнены обильным неравномерной плотности базофильным основным веществом с «обломками» менее базофильной цитоплазмы разрушенных хондроцитов (рис. 4).

Следует отметить, что после раздавливания хряща площадь межклеточного пространства увеличивается с одновременным уменьшением количества неповрежденных клеток, что способствует улучшению условий питания последних.

При оценке локализации и выраженности экспрессии AQP 1 в группе НХ, РХ и ГРХ отмечена экспрессия в хондроцитах, в перинуклеарной и перинуклеолярной зонах в виде тонких бледных колец (рис. 5 А). При раздавливании хряща диаминобензидин ярко и широко прокрашивает те же зоны, что и в нативном хряще (рис. 5 Б и В).

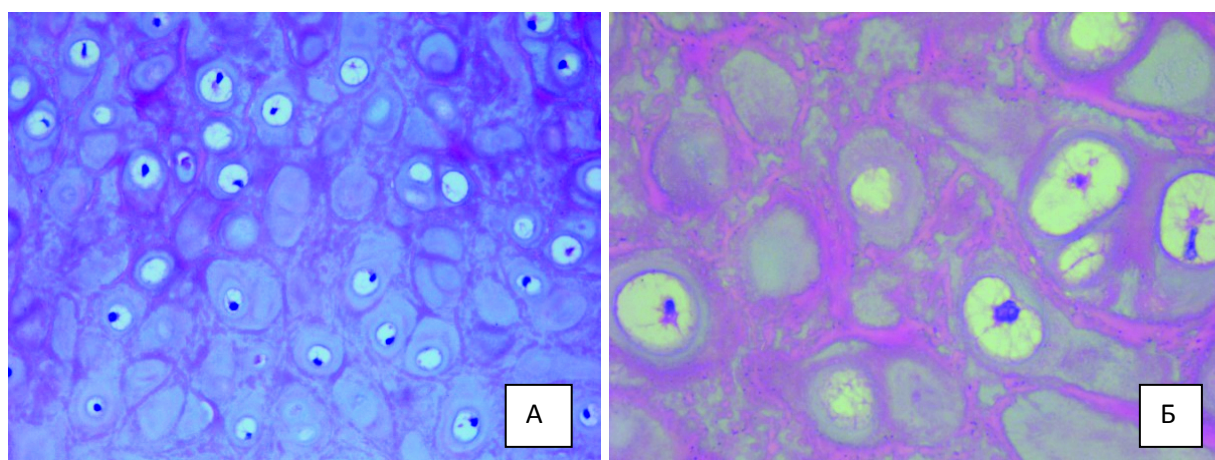


Рис. 2. Микроскопические особенности эластического хряща: А, Б – нативный хрящ. Окрашка гематоксилином и эозином. Ув. $\times 100-400$.

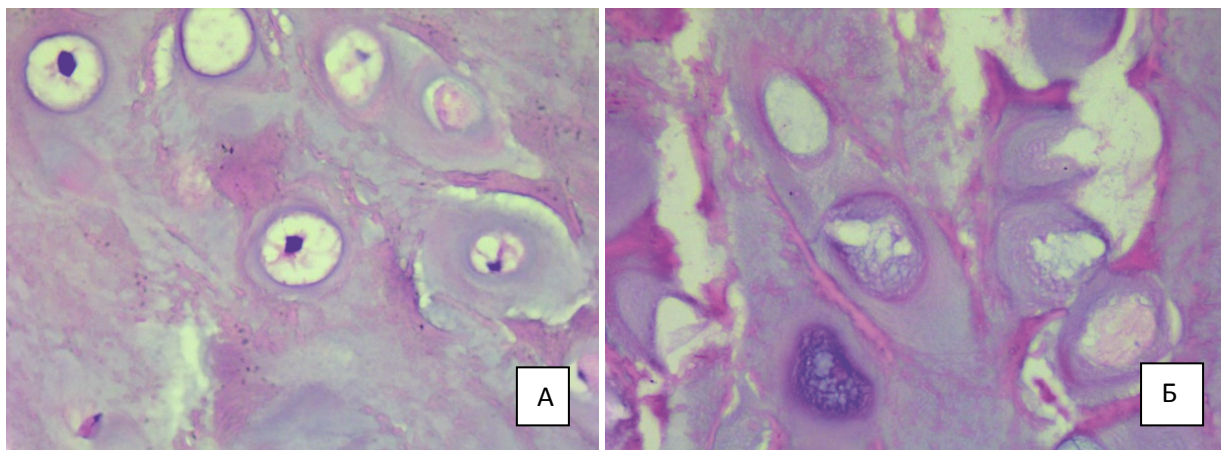


Рис. 3. Микроскопические особенности эластического хряща: А, Б – механически раздавленный хрящ. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. х 100-400.

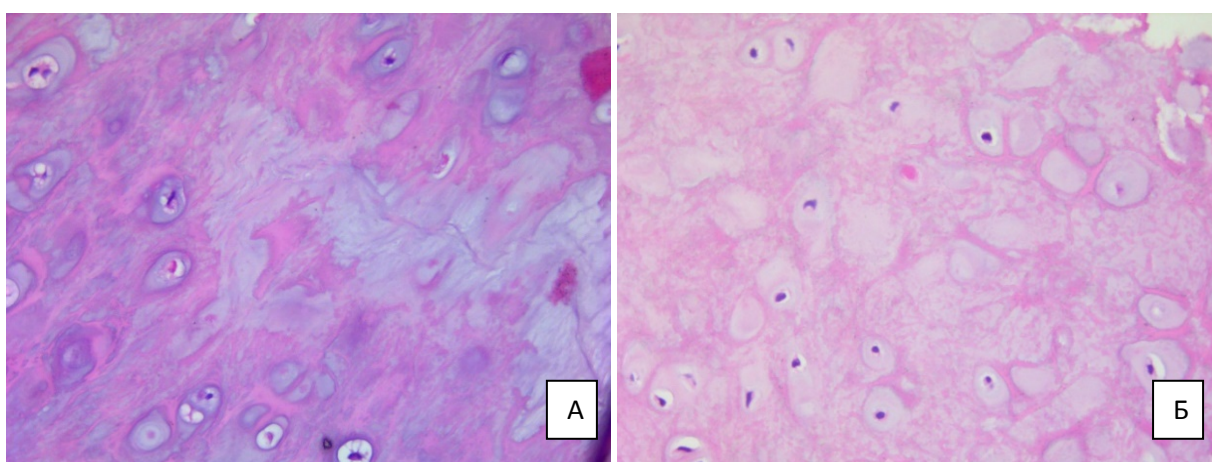


Рис. 4. Микроскопические особенности эластического хряща: А, Б – гидратированный раздавленный хрящ. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. х 100-400.

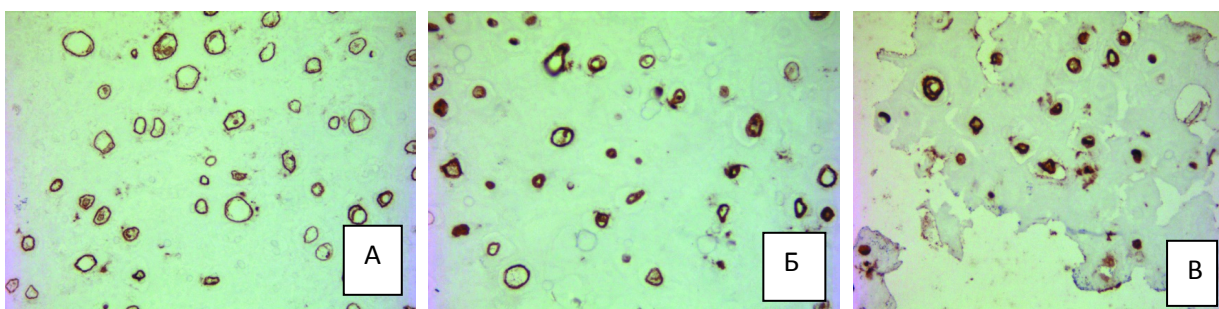


Рис. 5. Иммуногистохимические особенности экспрессии AQP 1: А – в нативном хряще, Б – в механически раздавленном хряще; В – в гидратированном раздавленном хряще. Ув. х 400. Окраска диаминбензидином.

При иммуногистохимическом исследовании во всех исследованных группах при положительном внешнем контроле AQP 3 не визуализировался в клеточных и межклеточных структурах (рис. 6 А, Б и В).

Наиболее интересные, на наш взгляд, результаты получены при иммуно-

гистохимическом исследовании для AQP 8. Выявлена экспрессия в межклеточном веществе и перинуклеарно в виде глыбок, пластинок, мелкоточечных и точечных композитов (рис. 7 А и Б). Яркость окраски и ее объем нарастают в группе ГРХ (рис. 7 В и Г).

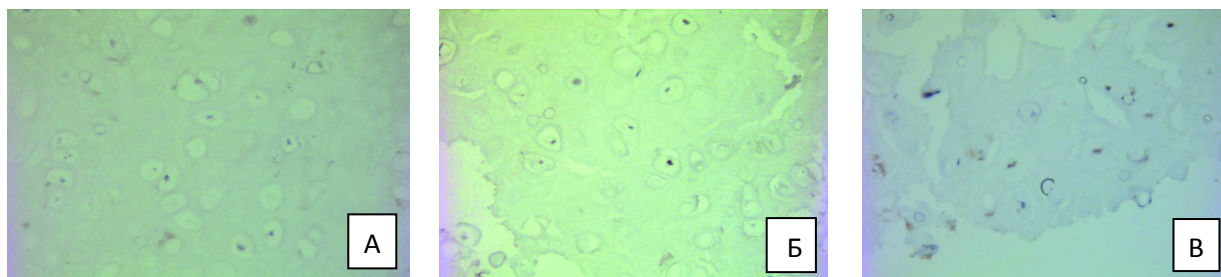


Рис. 6. Иммуногистохимические особенности экспрессии AQP 3: А – в нативном хряще, Б – в механически раздавленном хряще; В – в гидратированном раздавленном хряще. Окраска диаминобензидином. Ув. x 100-400.

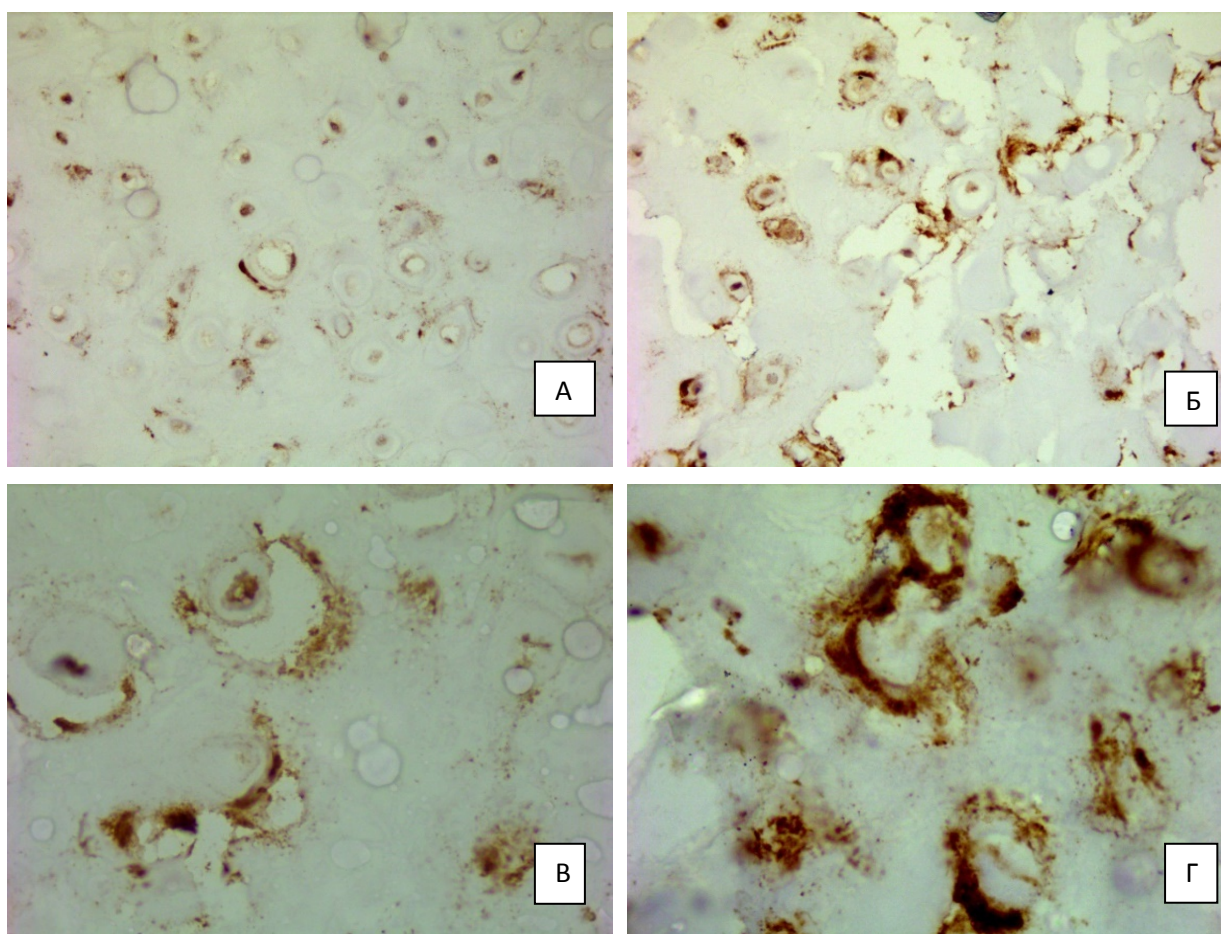


Рис. 7. Иммуногистохимические особенности экспрессии AQP 8: А – в нативном хряще, Б – механически раздавленный хрящ; В, Г – гидратированный раздавленный хрящ. Окраска диаминобензидином. Ув. x 100-400.

Иммуногистохимическое исследование позволило установить тканевую, клеточную и субклеточную локализацию аквапоринов, а также уровень экспрессии водных каналов в нативном и поврежденном хряще до и после гидратации. Во всех исследованных группах локализация аквапоринов характеризовалась стабильностью

для клеточных структур: AQP1 и AQP8 экспрессировались в межклеточных пространствах и хондроцитах. Наличие антигенов аквапоринов определялось в виде мембранной, нуклеарной и цитоплазматической локализации в описанных клеточных структурах в виде глыбок, пластинок и мелкоочечных точечных композитов.

Выводы

1. Фрагментированный хрящевой трансплантат имеет большие возможности получения питания за счет диффузии по сравнению с нативным хрящом по причине появления «капиллярного эффекта».

2. Установлено, что повреждение хряща активизирует водные каналы, что проявляется увеличением экспрессии аквапоринов во фрагментированном хряще.

3. Впервые определена локализация аквапорина AQP8 в хрящевой ткани ушной раковины.

Литература

1. Борисова КЗ. Причины неудач тимпаноластики и профилактики осложнений. Материалы Российской научно-практич. конф. оториноларингологов «Проблемы и возможности микрохирургии уха». 2002; 44-6..
2. Бороноев ОА, Рябов МП, Бороноев БА. Сравнительная оценка результатов тимпаноластики с использованием различных трансплантатов при хроническом гнойном среднем отите. Бюл. ВСНЦ СО РАМН. 2009;(3):35-8.
3. Вишняков ВВ. Результаты тимпаноластики при хроническом гнойном среднем отите и его последствиях. Матер. 16 съезда оториноларингологов РФ. 2001; 59-62.
4. Горностай ИИ, Петрова ЛГ, Михасев ГИ, Шилько СВ, Гавриленко СЛ. Результаты использования фрагментированного хрящевого трансплантата для восстановления целостности барабанной перепонки. Оторинолар. Вост. Евр. 2019; 9(1): 33-42.
5. Дискаленко ВВ, Курмашова ЛМ. Повышение эффективности тимпаноластики при обширных дефектах. Вестн. оториноларингол. 2008; (4): 54-56.
6. Кротов ЮА. Мирингопластика при обширных перфорациях барабанной перепонки. Вестн. оториноларингол. 2001; (5): 57-59.
7. Кротов ЮА. Способ мирингопластики при обширных перфорациях барабанной перепонки. Матер. 17-го съезда оториноларингологов РФ. Санкт-Петербург; 2006: 111-2.
8. Миронов АА. Проблемы диагностики и лечения хронического гнойного среднего отита. Материалы Российской научно-практической конференции оториноларингологов «Современные проблемы заболеваний верхних дыхательных путей и уха»; Москва; 2002; 97-9.
9. Пятакина ОК. Функциональная хирургия при хронических средних отитах. Материалы Российской научно-практической конференции оториноларингологов «Проблемы и возможности микрохирургии уха»; Оренбург; 2002, с. 25-28.
10. Поматиллов АА. Заживление посттравматического дефекта барабанной перепонки методом трансплантации аллофибробластов человека [диссертация]. Москва; 2001. 22 с.
11. Семенов ФВ, Волик АК. К вопросу о тактике хирургического лечения больных хроническим гнойным средним отитом при различных формах патологического процесса в среднем ухе. Вестн. оториноларингол. 1998; (5):15-7.
12. Ситников ВП, Кин ТИ, Александровский ЮК. Способ мирингопластики с обширными дефектами барабанной перепонки. Вестн. оториноларингол. 1992; (3):31-3.
13. Солдатов ИБ. Руководство по оториноларингологии. Москва: Медицина; 1997. 608 с.
14. Сушко ЮА. Трехэтапная тимпаноластика при фиксации стремени у больных хроническим гнойным средним отитом. Журн. ушных, носовых и горловых болезней. 1982; (6): 61-2.
15. Тарасов ДИ., Федорова ОК., Быкова ВП. Заболевания среднего уха. М.: Медицина; 1988. 288 с.
16. Титовец ЭП. Аквапорины человека и животных: фундаментальные и клинические аспекты. Минск: Белорус. наука; 2007. 239 с.
17. Тос М. Руководство по хирургии среднего уха. Т. 1. Подходы, мирингопластика, осиккулопластика и тимпаноластика: хирургия среднего уха. Томск; Сибирский гос. мед. ун-т: Клинический ринологический центр, 2005. 412 с.
18. Хоров ОГ, Плавский ДМ. Тимпаноластика с применением хрящевых пластин при обширных дефектах барабанной перепонки. Новости хирургии. 2010; 18(1): 108-13.
19. Янов ЮК, Усков АЕ, Кузовков ВЕ. Качество жизни больных хроническим гнойным средним отитом. Материалы Российской научно-практической конференции оториноларингологов «Проблемы и возможности микрохирургии уха». Оренбург; 2002; 256-9.
20. Agemark M, Kowal J, Kukulski W, Nordén K, Gustavsson N, Johanson U, et al. Reconstitution of water channel function and 2D-crystallization of human aquaporin 8. Biochim Biophys Acta. 2012;1818(3):839-50. doi: 10.1016/j.bbame.2011.12.006.
21. Agre P. Nobel Lecture. Aquaporin water channels. Biosci Rep. 2004 Jun;24(3):127-63. doi: 10.1007/s10540-005-2577-2.
22. Chang CY, Gray LC. Pressed scar tissue for tympanic membrane grafting in revision tympanoplasty. Otolaryngol Head Neck Surg. 2005 Jan;132(1):30-6. doi: 10.1016/j.otohns.2004.09.086.
23. Crane JM, Verkman AS. Long-range nonanomalous diffusion of quantum dot-labeled aquaporin-1 water channels in the cell plasma membrane. Biophys J. 2008 Jan 15;94(2):702-13. doi: 10.1529/biophysj.107.115121.
24. Day RE, Kitchen P, Owen DS, Bland C, Marshall L, Conner AC Human aquaporins: Regulators of transcellular water flow. Biochim Biophys Acta. 2014 May;1840(5):1492-506. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.09.033.
25. Fayad J, Bairo T, Parisier S. Preliminary results with the use of AlloDerm in chronic otitis media. Laryngoscope.

- 2003 Jul;113(7):1228-30. doi: 10.1097/00005537-200307000-00022.
26. Gamra OB, Mbarek C, Khammassi K, Methlouthi N, Ouni H, Hariga I, et al. Cartilage graft in type I tympanoplasty: audiological and otological outcome. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2008 Jul;265(7):739-42. doi: 10.1007/s00405-008-0645-5.
27. Hagiwara K, Shinozaki T, Matsuzaki T, Takata K, Takagishi K. Immunolocalization of water channel aquaporins in human knee articular cartilage with intact and early degenerative regions. *Med Mol Morphol*. 2013 Jun;46(2):104-8. doi: 10.1007/s00795-013-0014-3.
28. Harris HW Jr, Zeidel ML. Water Channels. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 1993 Sep;2(5):699-707.
29. Hirano Y, Okimoto N, Kadohira I, Suematsu M, Yasuoaka K, Yasui M. Molecular mechanisms of how mercury inhibits water permeation through aquaporin-1: understanding by molecular dynamics simulation. *Biophys J*. 2010 Apr 21;98(8):1512-9. doi: 10.1016/j.bpj.2009.12.4310.
30. Jalali MM, Motasaddi M, Kouhi A, Dabiri S, Soleimani R. Comparison of Cartilage With Temporalis Fascia Tympanoplasty: A Meta-Analysis of Comparative Studies. *Laryngoscope*. 2017 Sep;127(9):2139-2148. doi: 10.1002/lary.26451.
31. Johansson I, Karlsson M, Johanson U, Larsson C, Kjellbom P. The role of aquaporins in cellular and whole plant water balance. *Biochim Biophys Acta*. 2000 May 1;1465(1-2):324-42. doi: 10.1016/s0005-2736(00)00147-4.
32. Kim JY, Oh JH, Lee HH. Fascia versus cartilage graft in type I tympanoplasty: audiological outcome. *J Craniofac Surg*. 2012 Nov;23(6):e605-8. doi: 10.1097/SCS.0b013e31826c7b55.
33. Kotecha B, Fowler B, Topham J. Myringoplasty: a prospective audit study. *Clin Otolaryngol Allied Sci*. 1999 Apr;24(2):126-9.
34. Meli R, Pirozzi C, Pelagalli A. New Perspectives on the Potential Role of Aquaporins (AQPs) in the Physiology of Inflammation. *Front Physiol*. 2018 Feb 16;9:101. doi: 10.3389/fphys.2018.00101.
35. Mohamad SH, Khan I, Hussain SS. Is cartilage tympanoplasty more effective than fascia tympanoplasty? A systematic review. *Otol Neurotol*. 2012 Jul;33(5):699-705. doi: 10.1097/MAO.0b013e318254fbc2.
36. Perkins R, Bui H. Tympanic membrane reconstruction using formaldehyde-formed autogenous temporalis fascia: twenty years experience. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1996 Mar;114(3):366-79. doi: 10.1016/S0194-59989670205-X.
37. Pradhan P, Anant A, Venkatachalam VP. Comparison of Temporalis Fascia and Full-Thickness Cartilage Pali-sades in Type-I Underlay Tympanoplasty for Large/Subtotal Perforations. *Iran J Otorhinolaryngol*. 2017 Mar;29(91):63-8.
38. Preston GM, Jung JS, Guggino WB, Agre P. The mercury-sensitive residue at cysteine 189 in the CHIP28 water channel. *J Biol Chem*. 1993 Jan 5;268(1):17-20.
39. Sarac S, Curse S. Use of homograft dehydrated temporal fascia in tympanoplasty. *Otol Neurotol*. 2002 Jul;23(4):416-21.
40. Shi Z, Zhang T, Luo L, Zhao H, Cheng J, Xiang J, et al. Aquaporins in human breast cancer: Identification and involvement in carcinogenesis of breast cancer. *J Surg Oncol*. 2012 Sep 1;106(3):267-72. doi: 10.1002/jso.22155.
41. Verkman AS. Aquaporins in clinical medicine. *Annu Rev Med*. 2012;63:303-16. doi: 10.1146/annurev-med-043010-193843.
42. Wakayama Y. Aquaporin expression in normal and pathological skeletal muscles: a brief review with focus on AQP4. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:731569. doi: 10.1155/2010/731569.
43. Zeidel ML, Nielsen S, Smith BL, Ambudkar SV, Maunsbach AB, Agre P. Ultrastructure, pharmacologic inhibition, and transport selectivity of aquaporin channel-forming integral protein in proteoliposomes. *Biochemistry*. 1994 Feb 15;33(6):1606-15.

References

1. Borisova K. [Causes of tympanoplasty failure and the prevention of complications]. [Proceeding of Russian Scientific and Practical conference of Otolaryngologists «Problems and possibilities of the ear microsurgery»]. 2002; 44-6. [Article in Russian].
2. Boronoev O, Ryabov M, Boronoev B. [Comparative evaluation of tympanoplasty results with using of various transplant at chronic purulent otitis media]. *Acta Biomedica Scientifica*. 2009;(3):35-8. [Article in Russian].
3. Vishnyakov V. [The results of tympanoplasty in chronic suppurative otitis media and its consequences]. [The 16th congress of otorhinolaryngologists of the Russian Federation: Materials]. 2001; 59-62. [Article in Russian].
4. Gornostay I, Petrova L, Mikhasev G, Shil'ko S, Gavrilenko S. [Results of using afragmented cartilage graft to restore the integrity of the eardrum]. *Otorinolaryngology. Eastern Europe*. 2019; 9(1): 33-42. [Article in Russian].
5. Diskalenko V, Kurmashova L. [The improving of the tympanoplasty efficiency for large defects]. *Vestn Otorinolaringol*. 2008; (4): 54-56. [Article in Russian].
6. Krotov Yu. [Myringoplasty for large eardrum perforations]. *Vestn Otorinolaringol*. 2001; (5): 57-59. [Article in Russian].
7. Krotov Yu. [The method of myringoplasty for large eardrum perforations]. [Proceeding of the 17th congress of otorhinolaryngologists of the Russian Federation]. St. Petersburg; 2006: 111-2. [Article in Russian].
8. Mironov A. [Problems of diagnosis and treatment of chronic purulent otitis media]. [Proceeding of Russian Scientific and Practical conference of Otolaryngologists "Modern problems of upper respiratory tract and ear diseases"]. Moscow; 2002; 97-9. [Article in Russian].
9. Patyakina O. [The functional surgery of chronic otitis media]. [Proceeding of Russian Scientific and Practical conference of Otolaryngologists "Problems and possibilities of the ear microsurgery"]. Orenburg; 2002; 25-8. [Article in Russian].
10. Pomatillov A. [The healing of post-traumatic eardrum defect by the method of human alloblast transplantation]. Moscow; 2001. 22 p. [In Russian].
11. Semenov F, Volik A. [To the question of the surgical treatment tactics of patients with chronic suppurative otitis media in various forms of the pathological process in the middle ear]. *Vestn Otorinolaringol*. 1998; (5):15-7. [Article in Russian].

12. Sitnikov V, Kin T, Aleksandrovskij Yu. [The method of myringoplasty for large eardrum defects]. *Vestn Otorinolaringol.* 1992; (3):31-3. [Article in Russian].
13. Soldatov I. [Otorhinolaryngology manual]. Moscow: Medicina; 1997. 608 p. [In Russian].
14. Sushko Yu. [Three-stage tympanoplasty in the stapes fixation in patients with chronic suppurative otitis media]. *Zhurnal. ushnyh, nosovyh i gorlovyh boleznej.* 1982; (6): 61-2. [Article in Russian].
15. Tarasov D, Fedorova O, Bykova V. [Middle ear diseases; the guideline for doctors]. Moscow: Medicina; 1988. 288 p. [In Russian].
16. Titovec E. [Aquaporins of humans and animals: fundamental and clinical aspects]. Minsk: Belorus. Nauka; 2007. 239 p. [In Russian].
17. Tos M. [Guide to middle ear surgery. Vol. 1. Approaches, myringoplasty, ossiculoplasty and tympanoplasty]. Tomsk: Siberian State Medical University; 2004. 412 p. [In Russian].
18. Khorov O, Plavskij D. [Tympanoplasty with cartilage plates using for large eardrum defects]. *Novosti khirurgii.* 2010; 18(1): 108-13. [Article in Russian].
19. Yanov Yu, Uskov A, Kuzovkov V. [The life quality in patients with chronic suppurative otitis media]. [Proc. Of Russian Scientific and Practical conference of Otolaryngologists "Problems and possibilities of the ear microsurgery"]. Orenburg; 2002; 256-9. [Article in Russian].
20. Agemark M, Kowal J, Kukulski W, Nordén K, Gustavsson N, Johanson U, et al. Reconstitution of water channel function and 2D-crystallization of human aquaporin 8. *Biochim Biophys Acta.* 2012 Mar;1818(3):839-50. doi: 10.1016/j.bbame.2011.12.006.
21. Agre P. Nobel Lecture. Aquaporin water channels. *Biosci Rep.* 2004 Jun;24(3):127-63. doi: 10.1007/s10540-005-2577-2.
22. Chang CY, Gray LC. Pressed scar tissue for tympanic membrane grafting in revision tympanoplasty. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2005 Jan;132(1):30-6. doi: 10.1016/j.otohns.2004.09.086.
23. Crane JM, Verkman AS. Long-range nonanomalous diffusion of quantum dot-labeled aquaporin-1 water channels in the cell plasma membrane. *Biophys J.* 2008 Jan 15;94(2):702-13. doi: 10.1529/biophysj.107.115121.
24. Day RE, Kitchen P, Owen DS, Bland C, Marshall L, Conner AC Human aquaporins: Regulators of transcellular water flow. *Biochim Biophys Acta.* 2014 May;1840(5):1492-506. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.09.033.
25. Fayad J, Baino T, Parisier S. Preliminary results with the use of AlloDerm in chronic otitis media. *Laryngoscope.* 2003 Jul;113(7):1228-30. doi: 10.1097/00005537-200307000-00022.
26. Gamra OB, Mbarek C, Khammassi K, Methlouthi N, Ouni H, Hariga I, et al. Cartilage graft in type I tympanoplasty: audiological and otological outcome. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2008 Jul;265(7):739-42. doi: 10.1007/s00405-008-0645-5.
27. Hagiwara K, Shinozaki T, Matsuzaki T, Takata K, Takagishi K. Immunolocalization of water channel aquaporins in human knee articular cartilage with intact and early degenerative regions. *Med Mol Morphol.* 2013 Jun;46(2):104-8. doi: 10.1007/s00795-013-0014-3.
28. Harris HW Jr, Zeidel ML. Water Channels. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 1993 Sep;2(5):699-707.
29. Hirano Y, Okimoto N, Kadohira I, Suematsu M, Yasuoka K, Yasui M. Molecular mechanisms of how mercury inhibits water permeation through aquaporin-1: understanding by molecular dynamics simulation. *Biophys J.* 2010 Apr 21;98(8):1512-9. doi: 10.1016/j.bpj.2009.12.4310.
30. Jalali MM, Motasaddi M, Kouhi A, Dabiri S, Soleimani R. Comparison of Cartilage With Temporalis Fascia Tympanoplasty: A Meta-Analysis of Comparative Studies. *Laryngoscope.* 2017 Sep;127(9):2139-2148. doi: 10.1002/lary.26451.
31. Johansson I, Karlsson M, Johanson U, Larsson C, Kjellbom P. The role of aquaporins in cellular and whole plant water balance. *Biochim Biophys Acta.* 2000 May 1;1465(1-2):324-42. doi: 10.1016/s0005-2736(00)00147-4.
32. Kim JY, Oh JH, Lee HH. Fascia versus cartilage graft in type I tympanoplasty: audiological outcome. *J Craniofac Surg.* 2012 Nov;23(6):e605-8. doi: 10.1097/SCS.0b013e31826c7b55.
33. Kotecha B, Fowler B, Topham J. Myringoplasty: a prospective audit study. *Clin Otolaryngol Allied Sci.* 1999 Apr;24(2):126-9.
34. Meli R, Pirozzi C, Pelagalli A. New Perspectives on the Potential Role of Aquaporins (AQPs) in the Physiology of Inflammation. *Front Physiol.* 2018 Feb 16;9:101. doi: 10.3389/fphys.2018.00101.
35. Mohamad SH, Khan I, Hussain SS. Is cartilage tympanoplasty more effective than fascia tympanoplasty? A systematic review. *Otol Neurotol.* 2012 Jul;33(5):699-705. doi: 10.1097/MAO.0b013e318254fbc2.
36. Perkins R, Bui H. Tympanic membrane reconstruction using formaldehyde-formed autogenous temporalis fascia: twenty years experience. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1996 Mar;114(3):366-79. doi: 10.1016/S0194-59989670205-X.
37. Pradhan P, Anant A, Venkatachalam VP. Comparison of Temporalis Fascia and Full-Thickness Cartilage Palisades in Type-I Underlay Tympanoplasty for Large/Subtotal Perforations. *Iran J Otorhinolaryngol.* 2017 Mar;29(91):63-8.
38. Preston GM, Jung JS, Guggino WB, Agre P. The mercury-sensitive residue at cysteine 189 in the CHIP28 water channel. *J Biol Chem.* 1993 Jan 5;268(1):17-20.
39. Sarac S, Curse S. Use of homograft dehydrated temporal fascia in tympanoplasty. *Otol Neurotol.* 2002 Jul;23(4):416-21.
40. Shi Z, Zhang T, Luo L, Zhao H, Cheng J, Xiang J, et al. Aquaporins in human breast cancer: Identification and involvement in carcinogenesis of breast cancer. *J Surg Oncol.* 2012 Sep 1;106(3):267-72. doi: 10.1002/jso.22155.
41. Verkman AS. Aquaporins in clinical medicine. *Annu Rev Med.* 2012;63:303-16. doi: 10.1146/annurev-med-043010-193843.
42. Wakayama Y. Aquaporin expression in normal and pathological skeletal muscles: a brief review with focus on AQP4. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:731569. doi: 10.1155/2010/731569.
43. Zeidel ML, Nielsen S, Smith BL, Ambudkar SV, Maunsbach AB, Agre P. Ultrastructure, pharmacologic inhibition, and transport selectivity of aquaporin channel-forming integral protein in proteoliposomes. *Biochemistry.* 1994 Feb 15;33(6):1606-15.

Поступила в редакцию 10.06.2019.

© И.И. Горностай, О.А. Юдина, Л.Г. Петрова, 2019

МОРФОЛОГІЧНІ І ІМУНОГІСТОХІМІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ХРЯЩОВОЇ ТКАНИНИ, ВИКОРИСТАНОЇ У ВІДНОВЛЮВАЛЬНІЙ ХІРУРГІЇ ПЕРФОРАЦІЇ БАРАБАННОЇ ПЕРЕТИНКИ

¹Горностай ІІ, ²Юдіна ОА, ³Петрова ЛГ.

¹ДУ «РНПЦ оториноларингології»; ²ДУ РКМЦ справами Президента Республіки Білорусь;

³ДУО «БелМАПО»; Мінськ, Республіка Білорусь

e-mail: ivan23121971@gmail.com

А н о т а ц і я

Актуальність: Проблема вибору трансплантата для закриття дефекту барабанної перетинки при хронічних гнійних середніх отитах залишається актуальною по теперішній час. В літературі зустрічається мало наукових досліджень, в яких розглядаються механізми живлення трансплантата.

Метою даного дослідження було вивчення особливостей надходження води до фрагментованого хрящового трансплантату, який використовується нами при мірингопластиці.

Матеріали і методи: маса підготовлених для тимпаноластики фрагментованих хрящових ауто трансплантатів, що мають однакову площу, за допомогою електронних ваг вимірювалася до занурення і після занурення їх у фізіологічний розчин. Відзначено збільшення маси трансплантата після змочування його в фізіологічному розчині. Були проведені морфологічні та імуногістохімічні дослідження 30 хрящових трансплантатів, розподілених на 3 групи: нативний хрящ, роздавлений (фрагментований) і гідратований фізіологічним розчином роздавлений хрящ. Гістологічний матеріал склав 90 зразків тканини. Для оцінки морфологічних характеристик хрящів з усіх шматочків були виготовлені гістологічні препарати. Для виявлення локалізації ендогенних водних каналів в хрящі вушної раковини і виявлення ролі і транспортної функції аквапоринів також було проведено імуногістохімічне дослідження з антитілами до аквапоринів (AQP 1, AQP 3 і AQP 8).

Результати: Доведено, що живлення вільного фрагментованого хряща поліпшується за рахунок капілярного ефекту після його роздавлення, абсорбція рідини хрящовою тканиною збільшується за рахунок активності аквапоринів. Вперше визначено локалізацію аквапоринів AQP8 в хрящовій тканині вушної раковини.

Ключові слова: тимпаноластика, фрагментований хрящ, аквапорини, живлення хряща, капілярний ефект.

MORPHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL FEATURES OF CARTILAGE TISSUE USED IN RECONSTRUCTIVE SURGERY OF THE PERFORATIONS OF THE TYMPANIC MEMBRANE

¹Gornostay I, ²Yudina O, ³Petrova L.

¹Republican scientific and practical centre of otorhinolaryngology;

²Republican Clinical Medical Center of the Office of the President of the Republic of Belarus;

³Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education

Minsk, Republic of Belarus

e-mail: ivan23121971@gmail.com

Abstract

Relevance: The problem of graft choosing to close the eardrum defect in chronic purulent otitis media remains relevant today. In the literature there are few scientific studies that examine the graft nutrition mechanisms.

The purpose of this study was to study water flow features in the free lying fragmented cartilage graft used by us in myringoplasty.

Materials and methods: The mass of fragmented cartilage autotransplants prepared for tympanoplasty, having the same area, was measured using electronic scales before immersing them in a physiological solution and after immersion. An increase of the transplant mass was after wetting it in a physiological solution. Morphological and immunohistochemical studies were carried out in 30 cases grouped into three groups: native cartilage, crushed (fragmented) cartilage and crushed cartilage hydrated by physiological solution. The histological material was 90 tissue samples. The histological preparations were made from all the pieces to assess the morphological characteristics of the cartilage. An immunohistochemical study was also conducted with antibodies to aquaporins (AQP 1, AQP 3 and AQP 8) to identify the localization of endogenous water channels in the auricle cartilage and to identify the role and transport function of aquaporins.

Results: It is proved that the nutrition of loosely lying fragmented cartilage improves due to the capillary effect after crushing it, the adsorption of fluid by cartilage tissue increases due to the activation of aquaporins. For the first time, the localization of aquaporin AQP8 in the auricle cartilage was determined.

Keywords: tympanoplasty, fragmented cartilage, aquaporins, cartilage nutrition, capillary effect.