

Surface activity and lipid peroxidation in washout of the mucous membranes of rabbits in the normal case of catarrhal and allergic inflammation
Kalmatov R.¹, Dzhumaeva L.², Belov G.³ (Republic of Kyrgyzstan)

Поверхностная активность и перекисное окисление липидов в смывах слизистых оболочек у кроликов в норме, при катаральном и аллергическом воспалениях
Калматов Р. К.¹, Джумаева Л. М.², Белов Г. В.³ (Кыргызская Республика)

¹Калматов Романбек Калматович / Kalmatov Romanbek – кандидат медицинских наук, доцент, декан;

²Джумаева Лазокат Мадаминовна / Dzhumaeva Lazokat - заместитель декана, международный медицинский факультет;

³Белов Георгий Васильевич / Belov Georgii – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой, кафедра морфологических дисциплин,

Ошский государственный университет, г. Ош, Кыргызская Республика

Аннотация: на экспериментальных животных отработана методика получения субстрата для анализа поверхностной активности и состояния перекисного окисления липидов со слизистых носоглотки, глаза, внутреннего уха, влагалища. Получены показатели их поверхностной активности у кроликов в норме, при затравке формалином и на модели аллергического воспаления с яичным белком. Показаны преимущества определения сурфактантов слизистых биофизическим методом по сравнению с существующими способами.

Abstract: the authors developed a technique to obtain a substrate for analysis of surface activity with the mucous nasopharynx, eyes, inner ear, vagina in experimental animals. Obtain indicators of surface activity in rabbits normally, when the seed of formalin model of allergic inflammation with egg albumin. The advantages of determining biophysical surfactant mucous method over existing

Ключевые слова: поверхностная активность, перекисное окисление липидов, слизистые оболочки, экспериментальные животные, аллергическое воспаление.

Keywords: surface activity, lipid peroxidation, mucosal, experimental animals, allergic inflammation.

В последние десятилетия в связи с экологическим прессингом увеличивается частота аллергических респираторных заболеваний. Определенную роль в этом играет поломка локальных механизмов защиты органов дыхания, в частности сурфактантной системы легких и антиоксидантной защиты. Известно, что при бронхиальной астме развивается дефицит сурфактанта [6, 15]. Сурфактант легких играет важную роль в физиологии и патологии органов дыхания и представляет собой липопротеид [3, 4]. Протеины сурфактанта относятся к классу коллектинов и выявляются биохимическими, иммунологическими и иммуноморфологическими методами [7, 14, 26]. В начале 21 века в слизистой внутреннего уха, евстахиевой трубы и придаточных полостях носа коллектины, схожие с протеинами сурфактанта легких [17, 18, 23]. Это позволило по-новому взглянуть на многочисленные работы по исследованию поверхностной активности такой неинвазивной среды как назофарингиальные смывы – раньше их рассматривали как сурогат бронхоальвеолярных смывов, полагая, что их свойства обусловлены отработанным сурфактантом легких, теперь понятно, что они могут иметь самостоятельное диагностическое значение. Далее СП-А был обнаружен в слизистой белковой оболочке глаза, желудочно-кишечного тракта, капсуле Боумана, мочевыводящих путей, цервикального канала [16, 20, 25]. Высказывается мнение, что сурфактантные протеиды - универсальный инструмент для большинства слизистых оболочек и даже дирижер инструментов местной регуляции иммунитета и метаболизма [7, 14].

Появились экспериментальные и клинические работы, показывающие, что дефицит СП-А и СП-Д приводит к развитию отитов, гайморитов и риносинуситов, выявлено участие коллектинов в важнейших механизмах патогенеза этих заболеваний, влияние коллектинов на назофарингеальную и отогенную микрофлору [17, 22, 25]. Показано, что изменение коллектинов может носить системный характер, способствующий развитию бронхиальной астмы и появлению детей, часто болеющих острыми респираторными заболеваниями [11, 15].

Подтверждением ведущей роли нарушений сурфактантных белков в патогенезе отитов, и риносинуситов стали экспериментальные и клинические данные об их успешном лечении интраназальным введением модификаторов сурфактанта [9, 12, 13, 19, 21].

Однако при этом отсутствуют методы экспресс-анализа состояния сурфактанта слизистых, такие как применяются для анализа сурфактанта легких в бронхоальвеолярном смыве (БАС) и конденсате выдыхаемого воздуха (КВВ).

Цель исследования разработать методики определения поверхностной активности сурфактанта слизистых глаза, полости носа, среднего уха, влагалища у экспериментальных животных и оценить их адекватность при моделировании катарального и аллергического воспаления.

Методы исследования

Исследования проведены на 24 кроликах женского пола породы Шиншила. Животным контрольной группы (n-8) никаких воздействий не проводили. Другой группе кроликов воздействовали на шерсть мордочки формалином (10 мл) и оставляли на 1 час в тесной непрветриваемой камере.

Третью группу животных сенсибилизировали введением внутрибрюшинно 0,3 мг сухого яичного белка и 30мг гидроксида алюминия, растворенных в 2 мл физиологического раствора. На 14 - 18 день после этого закапывали в каждую ноздрю раствор яичного белка и на 5 день после этого получали модель аллергического воспаления, подтвержденного цитологически и гистологически. На сегодняшний день эта модель аллергического воспаления является общепризнанной [8, 24].

Прижизненно собирался смыв конъюнктивы, путем закапывания физраствора пипеткой в конъюнктивальный мешок и последующего отсасывания, а также конденсат выдыхаемого воздуха.

Кроликов забивали кровопусканием из яремной вены под гексеналовым наркозом с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». Смывы внутреннего уха, полости носа и влагалища собирали посмертно, вводя физиологический раствор порциями до получения 1 мл жидкости. БАС получали промыванием доли легкого физраствором из расчета 10 мл на 1 г веса легких. Смыв внутреннего уха получали путем прокола барабанной перепонки.

Использовано измерение динамического изменения поверхностного натяжения (ПН) при моделировании дыхательного цикла по методу Clements, которое является наиболее информативным методом определения поверхностной активности жидкостей. Поверхностную липидную пленку сжимают в кювете поверхностных весов изменении от 100% площади поверхности к 20% и обратно, фиксируя величину ПН максимального и минимального, и на их основе рассчитывая индекс стабильности (ИС).

При классическом исследовании требуется 100 мл анализируемой жидкости – смыва, экстракта, возможно разбавление 10 мл до 100 мл.

Ранее мы предлагали использовать метод монослоев с изопропиловым спиртом, требующий около 1 мл субстрата для анализа [1]. К анализируемой жидкости добавляется равное количество изопропилового спирта, смесь встряхивается и анализируется на тензиоспектрометре [3].

Возможность исследования ПА сурфактанта легких и перекисного окисления липидов в ККВ у экспериментальных животных (кроликов) была впервые показана нами с соавторами в 1992 году [2]. КВВ собирался при помощи резиновой маски с клапаном и выпускником в нижней части. Кроликов фиксировали на животе. Воздух из выпускника через полимерную трубку направлялся в конденсатор, помещенный в сосуд со льдом. В течение 10 - 15 минут удается собрать 1 - 2 мл конденсата.

Добившись того, чтобы величина ПН физиологического раствора равнялась 71-73 мН/м и при сжатии поверхностного слоя не менялась более чем на 1 мН/м, на поверхность физиологического раствора при помощи пастеровской пипетки с оттянутым носиком наслаивается анализируемая смесь каплями, следя, чтобы ПН субфазы снизилось до 50 мН/м и далее не возрастало.

Количество капель может быть дополнительным показателем, указывающим на концентрацию ПАВ в анализируемом субстрате.

На спектрофотометре СФ-48 проводили определение в анализируемых субстратах оптической плотности суммарных липидов и гидроперекисей, кетонных диенов по методике Гаврилова В.Б., Мишкорудной М.И. [5].

Из кусочков слизистых с подлежащими тканями готовились замороженные срезы, окрашиваемые на липиды суданом черным и кофеин-бензпиреном по Бергу, и парафиновые срезы, окрашиваемые гематоксилином-эозином.

Полученные результаты

Показатели поверхностной активности в различных анализируемых субстратах у кроликов контрольной группы представлены в табл.1.

Таблица 1. Показатели поверхностной активности в различных анализируемых субстратах у кроликов контрольной группы (n-8)

Субстрат	Число капель	ПН мин	ПН макс	ИС
Бронхоальвеолярный смыв	5,3±1,2	21,1±0,93	55,3±1,3	0,90±0,04
Эндоnazальный смыв	24,2±2,2	31,9±0,6	57,2±1,2	0,57±0,03
Смыв внутреннего уха	27,3±2,5	36,4±1,2	59,2±1,5	0,48±0,03
Смыв влагалища	32,3±2,8	41,4±0,9	62,1±0,9	0,4±0,03
Конъюнктивальный смыв	38,1±3,1	39,2±0,7	58,1±1,2	0,39±0,04
КВВ	38,7±2,1	49,9±0,7	61,4±1,6	0,21±0,02

Смывы всех исследуемых слизистых обладают определенной поверхностной активностью сравнимой с таковой для бронхоальвеолярного смыва, но менее выраженной. Снижение ИС шло по направлению конъюнктивальный смыв < смыв влагалища < смыв внутреннего уха < эндоназальный смыв < бронхоальвеолярный смыв.

При окраске замороженных срезов слизистой капельки липидов обнаруживались в альвеолярных макрофагах бронхоальвеолярного смыва, в нейтрофилах и макрофагах эндоназального смыва, пылевидное свечение липидов наблюдалось в клетках слизистой внутреннего уха, влагалища и глаз.

При затравке животных формалином через 1 час морфологически отмечался катаральный синусит, трахеит, бронхит, конъюнктивит с повышенным выделением слез и серозной жидкости из носа, что соответствует описаниям Doyle IR. [10]. В смывах слизистой конъюнктивы, полости носа, бронхоальвеолярном смыве достоверно снижалось количество общих липидов, белок наоборот имел тенденцию к повышению. Поверхностная активность бронхоальвеолярного, эндоназального и конъюнктивального смыва достоверно снижается (табл. 3), что коррелирует с изменениями общих липидов.

Таблица 3. Показатели ИС в различных анализируемых субстратах у кроликов в норме, при катаральном и аллергическом воспалениях

Субстрат	Контроль	Формалин	Яичный альбумин
Бронхоальвеолярный смыв	0,90±0,04	0,75±0,03 *	0,62±0,03 *
Эндоназальный смыв	0,57±0,03	0,43±0,03 *	0,35±0,03 *
Смыв внутреннего уха	0,48±0,03	0,44±0,03	0,38±0,03 *
Конъюнктивальный смыв	0,4±0,03	0,23±0,02 *	0,21±0,02 *
Смыв влагалища	0,39±0,04	0,39±0,02	0,33±0,02
КВВ	0,21±0,02	Не исследовано	0,15±0,02 *

Примечание: критерий различия с контролем $p < 0,05$

При моделировании аллергического воспаления предварительно сенсibilизированных кроликов закапыванием раствора яичного белка на 18 день эксперимента (пятый день закапывания аллергена) у кроликов наблюдалась резкая гиперемия слизистых оболочек носоглотки и конъюнктивы глаза, повышенное слезоотделение и выделение серозной жидкости из носа.

Микроскопически на пятый день закапывания аллергена отмечена резкая инфильтрация слизистых придаточных полостей носа, конъюнктивы эозинофильными и нейтрофильными лейкоцитами. Слизистая трахеи и бронхов резко полнокровна, местами десквамирована. Отмечается спазм мелких бронхов, дистелектазы респираторного отдела легких.

При аллергическом воспалении ПА достоверно снизилась во всех изучаемых субстратах за исключением смывов влагалища. В бронхоальвеолярном смыве на 31,1%, в эндоназальном – на 38,6%, в смыве внутреннего уха на 21,8%, в конъюнктивальном – 47,5%. В смыве влагалища снижение было не достоверным - на 15,4% ($p > 0,05$). В КВВ также наблюдалось достоверное снижение ИС на 28, 4% ($p < 0,05$). Одновременное снижение ПА во всех изучаемых субстратах свидетельствует о том, что сурфактанты слизистых составляют общую систему и со схожими механизмами реагирования на аллергическое воспаление.

Спектрофотометрическое исследование продуктов перекисного окисления липидов в различных анализируемых жидкостях выявило наличие суммарных липидов во всех субстратах (табл.4). Также во всех субстратах в норме определялись гидроперекиси с той же направленностью: конъюнктивальный смыв < смыв влагалища < смыв внутреннего уха < эндоназальный смыв < бронхоальвеолярный смыв. В КВВ гидроперекиси определялись на пределе спектрофотометрического метода.

Катаральное воспаление характеризовалось снижением суммарных липидов в конъюнктивальном смыве, сдвиги ПОЛ в других субстратах при этом оказались недостоверными.

Таблица 4. Показатели оптической плотности суммарных липидов и гидроперекисей в различных анализируемых субстратах у кроликов в норме, при катаральном и аллергическом воспалениях

Субстрат	Контроль	Формалин	Яичный альбумин

	СЛ	ГП	СЛ	ГП	СЛ	ГП
Бронхоальвеолярный смыв	0,176 ±0,010	0,106 ±0,007	0,158 ±0,01 0	0,113 ±0,006	0,136 * ±0,010	0,167 * ±0,007
Эндоназальный смыв	0,104 ±0,007	0,095 ±0,005	0,097 ±0,00 6	0,099 ±0,005	0,077 ±0,007	0,084 ±0,005
Смыв внутреннего уха	0,076 ±0,005	0,052 ±0,004	0,076 ±0,00 6	0,055 ±0,005	0,062 ±0,005	0,064 * ±0,004
Конъюнктивальный смыв	0,022 ±0,003	0,018 ±0,003	0,009 ±0,00 * 3	0,019 ±0,003	0,011 * ±0,003	0,021 ±0,003
Смыв влажной слизистой	0,074 ±0,007	0,046 ±0,006	0,078 ±0,00 7	0,049 ±0,006	0,068 ±0,008	0,052 ±0,007
КВВ	0,018 ±0,002	0,01 ±0,002	Не исследовано		0,010 * ±0,002	0,016 * ±0,002

Примечание: критерий различия с контролем $p < 0,05$

Аллергическое воспаление характеризовалось достоверным снижением суммарных липидов в БАС и конъюнктивальном смыве, а также достоверным ростом гидроперекисей в КВВ. В БАС и смыве внутреннего уха отмечено снижение гидроперекисей, но по отношению к снижению суммарных липидов снижение было значительно меньше. Это свидетельствует об активации процессов ПОЛ при аллергическом воспалении, что соответствует данным других авторов, исследовавших процессы пероксидации при аллергическом воспалении иными методами [8].

Выводы:

1. Предложенная методика позволяет определять через изменения поверхностной активности состояние сурфактанта слизистых глаза, полостей носа, внутреннего уха, влажной слизистой, где до этого определяли только белки сурфактанта иммуногистохимически и хроматографическим методом. Определение биофизическим методом менее затратное и гораздо быстрее.

2. Эксперименты с моделированием катарального и аллергического воспаления показали адекватность методики и характеризовались снижением функции сурфактанта слизистых глаза, полости носа, трахеи, бронхов, а также активацией ПОЛ.

Литература

1. Белов Г. В., Арбузов А. А. Методы исследования сурфактантной системы легких на секционном материале, в эксперименте и клинике / Методические рекомендации. Фрунзе, 1986. 28 с.
2. Белов Г. В., Бримкулов Н. Н., Давлеталиева Н. Е., Акматов К. Т. Сравнение поверхностной активности конденсата выдыхаемого воздуха и смывов легких на экспериментальных моделях // Сурфактантная система легких в норме и патологии. Ялта, 1992. С. 12-14.
3. Белов Г. В., Арбузов А. А., Бримкулов Н. Н. Оценка состояния сурфактантной системы легких // Бишкек, 2005. 104 с.
4. Ерохин В. В., Романова Л. К. Клеточная биология легких в норме и при патологии. – Москва: Медицина, 2000. 496 с.
5. Гаврилов В. Б. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови / В. Б. Гаврилов, М. И. Мишкорудная // Лаб. Дело, 1983. № 3. С. 33-36.
6. Миррахимов М. М., Бримкулов Н. Н., Лямцев В. Т., Белов Г. В. Изменения поверхностной активности и клеточного состава бронхоальвеолярного смыва у больных бронхиальной астмой // Тер. Архив, 1987. № 3. С.31- 36.
7. Синюкова Т. А., Коваленко Л. В. Сурфактантные белки и их роль в функционировании дыхательной системы // Вестник СурГУ. Медицина, 2011. № 9. С. 48-54.
8. Al-Harbi N. O., Nadeem A., Al-Harbi M. M. et al. Oxidative airway inflammation leads to systemic and vascular oxidative stress in a murine model of allergic asthma // Int Immunopharmacol, 2015 May; 26 (1): 237-45.

9. *Chandrasekhar S. S., Mautone A. J.* Otitis media: treatment with intranasal aerosolized surfactant // *Laryngoscope*, 2004. Mar;114 (3):472-85.
10. *Doyle I. R., Kamata E., Nakadate M.* Effects of formaldehyde vapor on the nasal cavity and lungs of F-344 rats // *Journal of Environmental Pathology, Toxicology & Oncology*. 15 (1): 1-8, 1996.
11. *Erpenbeck V. J., Krug N., Hohlfeld J. M.* Therapeutic use of surfactant components in allergic asthma // *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2009. Mar; 379 (3): 217-24.
12. *Feng L., Chen W., Cong R., et al.* An experimental study on the therapeutic effects of eustachian tube surfactant in barotitis media // *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi*, 2002. Nov; 16 (11):613-5.
13. *Ghadiali S. N., Banks J., Swarts J. D.* Effect of surface tension and surfactant administration on Eustachian tube mechanics // *J Appl Physiol*, 2002. Sep; 93 (3):1007-14.
14. *Hawgood S., Poulain F. R.* The pulmonary collectins and surfactant metabolism // *Annu Rev Physiol*, 2001; 63:495-519.
15. *Hohlfeld J. M.* The role of surfactant in asthma // *Respir Res*, 2002; 3:4.
16. *Kankavi O., Ata A., Gungor O.* Surfactant proteins A and D in the genital tract of mares // , 2007, Apr.- Vol. 98.- № 3 - 4. P. 259-70.
17. *Lee H. M., Kang H. J., Woo J. S. et al.* Upregulation of surfactant protein A in chronic rhinosinusitis // *Laryngoscope*, 2006. Feb;116 (2): 328-30.
18. *Ma J., Lu H.* Histopathological and ultracytochemical observation of mucosa on the eustachian tube and middle ear with experimental secretory otitis media // *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi*. 2003 Jun;17(6):359-61
19. *Ma Z., Dai C., Yang S., Li M., Qi L.* Protective effect of pulmonary surfactant on cilia of Eustachian tube in otitis media with effusion // *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2007 Oct 1;
20. *MacNeill C., Umstead T. M., Phelps D. S. et al.* Surfactant protein A, an innate immune factor, is expressed in the vaginal mucosa and is present in vaginal lavage fluid // *Immunology*, 2004. Jan.; 111 (1): 91-9.
21. *Mautone.* Composition and method for treatment of otitis external // *United States Patent*. 7,064, 132 June 20, 2006.
22. *McGuire J. F.* Surfactant in the middle ear and eustachian tube: a review // *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2002. Oct. 21; 66 (1): 1-15.
23. *Phelps D. S.* Presence of surfactant lamellar bodies in normal and diseased sinus mucosa. // *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*, 2005.
24. *Subhashini, Chauhan P. S, Singh R.* Ovalbumin-induced allergic inflammation lead to structural alterations in mouse model and protective effects of intranasal curcumin: A comparative study // *Allergol Immunopathol (Madr)*, 2016. May-Jun.;44 (3): 246-56.
25. *van Rozendaal B. A., van Golde L. M., Haagsman H. P.* Localization and functions of SP-A and SP-D at mucosal surfaces. // *Pediatr Pathol Mol Med.*, 2001. Jul.-Aug., 20(4): 319-39.
26. *Woodworth B. A., Lathers D., Neal J.G. et al.* Immunolocalization of surfactant protein A and D in sinonasal mucosa // *Am J Rhinol*, 2006. Jul.-Aug.; 20 (4): 461-5.