

*В.В. Шишкина<sup>1,2</sup>, Н.Ю. Самодурова<sup>1</sup>, Е.Е. Иванова<sup>1,2</sup>,  
О.Д. Жилыева<sup>1</sup>, С.Н. Золотарева<sup>1</sup>*

## **КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА ВОДНОГО РАСТВОРА МОЛЕКУЛЯРНОГО ВОДОРОДА В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ ПОЛЛИНОЗА**

*<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко» г. Воронеж, Россия*

*<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт экспериментальной биологии и медицины ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко», г. Воронеж, Россия*

*Целью данного исследования стала оценка морфологических изменений в тканях слизистой оболочки полости носа крыс-самцов линии Wistar, которые подвергались воздействию пылевых и химических агентов в течение 55 дней. В результате проведенного исследования выявлены количественные и качественные изменения в слизистой оболочке полости носа, проявляющиеся значительной активацией тучных клеток в группах изолированного и комбинированного воздействия пылевых и химических агентов. Кроме того, было подтверждено лечебное и профилактическое действие водного раствора, обогащенного молекулярным водородом, что проявлялось снижением количества дегранулирующих форм тучных клеток.*

**Ключевые слова:** *экстракт аллергена пыльцы, поллиноз, химический агент, тучные клетки, молекулярный водород*

*V.V. Shishkina, N.Y. Samodurova, E.E. Ivanova,  
O.D. Zhilyaeva, S.N. Zolotareva*

## **CLINICAL AND MORPHOLOGICAL ASSESSMENT OF THE THERAPEUTIC AND PROPHYLACTIC EFFECT OF AN AQUEOUS SOLUTION OF MOLECULAR HYDROGEN IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF POLLINOSIS**

*The aim of this study was to evaluate morphological changes in the nasal mucosa tissues of male Wistar rats exposed to pollen and chemical agents for 55 days. The study revealed quantitative and qualitative changes in the nasal cavity mucosa, manifested by significant activation of mast cells in the groups of isolated and combined exposure to pollen and chemical agents. In addition, the therapeutic and prophylactic effect of aqueous solution enriched with molecular hydrogen was confirmed, which was manifested by a decrease in the number of degranulating forms of mast cells.*

**Keywords:** *pollen allergen extract, hay fever, chemical agent, mast cells, molecular hydrogen.*

**Введение.** В структуре аллергопатологии лидирующее место по распространенности занимает аллергический ринит, основным этиологическим агентом которого является пыльца растений. Прямые и косвенные затраты здравоохранения на лечение аллергического ринита

характеризуются ростом год от года. Ретроспективное эпидемиологическое исследование заболеваемости населения поллинозами показало их распространение в пределах 25-50% на территориях высокого и среднего риска. Воздействие аллергенных компонентов вызывает активацию воспалительных элементов, влечет за собой дисфункцию эпителиальных клеток и выделение активных форм кислорода (АФК). Нитраты и нитриты, являясь окислителями, воздействуют на цепь внутриклеточных химических реакций, что приводит к дополнительной нагрузке АФК и утяжелению течения воспалительного процесса при комбинированном воздействии аллергических и химических агентов [1,2].

В качестве маркера оценки воздействия поллютантов и химических загрязнителей на слизистую носа животных в экспериментальных исследованиях используются тучные клетки (ТК). Локализация ТК различна и уникальна в специфическом тканевом микроокружении, их распределение в организме весьма вариабельно: они обнаруживаются практически во всех органах человека, особенно велико их количество в местах, контактирующих с окружающей средой [3]. Наибольшее содержание тучных клеток выявляется в коже, органах желудочно-кишечного тракта, органах дыхательной системы, преимущественно в слизистой и подслизистой оболочках. Во время дегрануляции ТК происходит высвобождение предварительно сформированных медиаторов, таких как гистамин, гепарин, протеазы, катепсин G и др., а также высвобождение *de novo* синтезированных медиаторов: цистеиниллейкотриенов, цитокинов, хемокинов и факторов роста, которые, несомненно, играют важную роль в патогенезе развития реакции гиперчувствительности [4].

Возможности таргетного влияния на функциональную активность ТК фармакологическими препаратами, а также поиск новых эффективных методов, как с терапевтическим, так и профилактическим эффектами, представляют особый интерес. В качестве эффективного молекулярного агента, реализующего противовоспалительные, регуляторные, антиапоптотические, адаптивные, гомеостатические эффекты, используется молекулярный водород [5]. Таким образом, исследование морфологических особенностей комбинированного воздействия пылевых и химических агентов позволит разработать обоснованный подход к профилактическим мероприятиям.

**Цель исследования:** морфологическая оценка количественного состава ТК при изолированном и комбинированном воздействии пылевых и химических агентов, а также морфологическое обоснование применения водного раствора, обогащенного молекулярным водородом, для вторичной профилактики поллиноза.

**Материалы и методы.** Экспериментальное моделирование поллиноза с последующим воздействием нитратных загрязнителей и водного раствора молекулярного водорода проводилось на базе НИИ

экспериментальной биологии и медицины ФГБОУ ВО ВГМУ им. Н.Н. Бурденко Минздрава России с соблюдением этических норм. В эксперименте, продолжительностью 55 дней, приняли участие 204 половозрелых самцов крыс (34 группы,  $n=6$ ) линии Wistar массой  $200\pm 10$  грамм. Моделирование поллиноза проводилось с применением аллергена из пыльцы в концентрации 10000 PNU (АО «НПО «Микроген», Россия). В качестве химических агентов были использованы нитрат ( $\text{NaNO}_3$ ) и нитрит натрия ( $\text{NaNO}_2$ ) в дозах, равных 1/10, 1/20 и 1/30 величины полулетальной дозы. За действующим веществом следовал период воздействия водного раствора молекулярного водорода ( $\text{H}_2$ ), концентрация которого достигала 8.0 ppm.

Выведение животных из эксперимента осуществлялось передозировкой ингаляционного наркоза (Изофлуран) в течение 20 минут, с констатацией факта гибели животного. Для морфологического исследования извлекали участки слизистой оболочки носовой полости с последующей фиксацией в 10% забуференном формалине. После проведения процедуры стандартной пробоподготовки изготавливали срезы толщиной 4 мкм для окрашивания гематоксилином и эозином, раствором Гимза. Оценивали общее количество ТК, дегрануляцию, межклеточное взаимодействие и наличие свободнолежащих гранул. Для детекции триптаза-позитивных ТК использовали первичные моноклональные мышиные антитела (Abscam, каталожный номер ab2378, разведение 1:4000, производство Великобритания). Морфометрический анализ гистологических микропрепаратов проводился с использованием микроскопа ZEISS AxioImager.A2, анализировалось не менее 40 полей зрения на объективе x40 с дальнейшим пересчетом количества клеток на  $1 \text{ мм}^2$ . Для статистической обработки данных использовалась программа Statistica 12.0. Для оценки достоверности различий использован параметрический критерий Стьюдента для независимых числовых выборок.

**Результаты.** Выявлено, что в процессе базовой стимуляции в течение первых 14-ти дней у животных экспериментальных групп не наблюдалось никаких симптомов. После начала интраназального введения аллергенов пыльцы, у животных всех групп отмечалось чихание частотой до 18 раз в день, корки вокруг носа, прозрачные выделения. Симптомы аллергического ринита сохранялись на протяжении всего периода интраназального введения и 3-4 дня после его завершения до 30-37 дня эксперимента. Во всех экспериментальных группах с воздействием аллергенов количество эозинофилов превышало показатели контрольной группы, составляя  $7,56\pm 1,42$  и  $3,25\pm 0,68$ , соответственно.

Результаты гистологического и иммуногистохимического исследования слизистой оболочки носовой полости в экспонированных группах выявили ряд особенностей. ТК слизистой оболочки группы контроля характерно располагались периваскулярно и вокруг клеток жировой ткани, преимущественно либо без признаков дегрануляции, либо

слабой выраженности. При воздействии аллергенов и химических контаминантов происходила активная миграция ТК в локусы воздействия и увеличение численности клеточной популяции с признаками их активации и высвобождения медиаторов. Оценка микропрепаратов, окрашенных раствором Гимза, показала достоверное увеличение количества ТК с метакромазией до 3 раз во всех исследуемых группах по отношению к контролю ( $p < 0,05$ ).

Метакромазия ТК основана на наличии таких представителей секретома как гистамин, гепарин и сульфатированные гликозаминогликазы. При развитии аллергического состояния происходит IgE-опосредованная активация тучных клеток, при которой секретом направлен на синтез и продукцию данных биологических веществ. В группе воздействия химическими контаминантами количество ТК также достоверно превышало контрольные значения ( $p < 0,05$ ), однако, выявить характерные особенности при данном окрашивании не удалось.

Селективный метод оценки секретома ТК позволил выявить увеличение метакроматичных ТК, содержащих триптаза-позитивные гранулы, заполняющие цитоплазму на 1/3 и 2/3 при воздействии аллергенов пыльцы березы и амброзии, по сравнению с группой контроля. Отмечалась активизация секреции и высвобождения триптазы ТК с заполнением гранул триптазой на 1/3, 2/3 и 3/3 цитоплазмы в группе с комбинированным воздействием аллергенами и нитратами, как проявление формирования провоспалительного фона. Наибольшим эффектом, активизирующим синтез и высвобождение триптазы, обладало воздействие с комбинацией введения аллергена амброзии и химических агентов, что вызывало повышение протеазы в 2,9 раз по сравнению с группой контроля.

Воздействие водного раствора, обогащенного молекулярным водородом, приводило к снижению степени дегрануляции тучных клеток, снижению активной миграции, способствовало приобретению клетками более округлой формы, снижению их количества на 5-30% в группах с различными комбинациями аллергенов и химических веществ ( $p < 0,05$ ).

#### **Выводы:**

1. Морфометрическая оценка выявила активацию ТК по отношению к увеличению экспрессии триптазы в группах изолированного воздействия аллергенов и, особенно, комбинации с химическими загрязнителями.
2. Возможный профилактический эффект водного раствора молекулярного водорода вне зависимости от способа его введения способствовал достоверному ( $p < 0,05$ ) уменьшению численности метакроматичных и триптаза-позитивных ТК, снижению их дегрануляции, что может свидетельствовать о стабилизирующем влиянии водорода на процесс активации ТК.

## Литература

1. Berger M., Bastl M., Bouchal J., Dirr L., Berger U. The influence of air pollution on pollen allergy sufferers // *Allergol Select.* – 2021. – №5. – pp.345–348.
2. Красникова А.А., Самодурова Н.Ю. Заболеваемость аллергическим ринитом (поллинозом) на территории Воронежской области за 10 лет // *Санитарный врач.* – 2023. – Т.20, № 3(230). – С.181-185.
3. Sies H., Belousov V.V., Chandel N.S. et al. Defining roles of specific reactive oxygen species (ROS) in cell biology and physiology // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2022; – №23(7). – pp. 499-515.
4. Шишкина В.В., Ключкова С.В., Алексеева Н.Т. и др. Триптазный профиль популяции тучных клеток кожи крыс при раневом процессе // *Журнал анатомии и гистопатологии.* – 2020. –Т. 9, №4. – С.84-89.
5. Nguyen SMT, Rupprecht CP, Haque A, Pattanaik D, Yusin J, Krishnaswamy G. Mechanisms Governing Anaphylaxis: Inflammatory Cells, Mediators, Endothelial Gap Junctions and Beyond // *Int J Mol Sci.* – 2021. – №21, №22 (15).
6. Atiakshin D., Kostin A., Volodkin A. et al. Mast Cells as a Potential Target of Molecular Hydrogen in Regulating the Local Tissue Microenvironment // *Pharmaceuticals.* – 2023. – pp. 816-817.