

УДК

<https://doi.org/10.18692/1810-4800-2021-6-75-81>

Влияет ли эктоин на высвобождение аллергенов из пыльцы ветроопыляемых растений?

Т. М. Желтикова¹, И. Г. Ахапкина¹, М. А. Мокроносова¹

¹ Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова, 105064, Москва, Россия

Does ectoin affect the release of allergens from pollen of wind-blown plants?

T. M. Zheltikova¹, I. G. Akharkina¹, M. A. Mokronosova¹

Проведено исследование влияния эктоина на высвобождение аллергенов из пыльцы ветроопыляемых растений. В работе использовали пыльцу березы, ольхи, лещины, тимофеевки и ежи сборной. Использовали иммунохимический анализ (ИФА) и морфологическое исследование пыльцы березы (с использованием светового микроскопа). Полученные данные свидетельствуют, что эктоин не способствует высвобождению аллергенов из пыльцы. Таким образом, эктоин не только улучшает барьерную функцию слизистой оболочки полости носа и вымывает пыльцу из полости носа, но и не нарушает их целостность и не влияет на высвобождение аллергенов.

Ключевые слова: эктоин, пыльца ветроопыляемых растений, пыльцевые аллергены.

Для цитирования: Желтикова Т. М., Ахапкина И. Г., Мокроносова М. А. Влияет ли эктоин на высвобождение аллергенов из пыльцы ветроопыляемых растений? *Российская оториноларингология*. 2021;20(6):75–81. <https://doi.org/10.18692/1810-4800-2021-5-75-81>

The effect of ectoin on the release of allergens from pollen grain of wind-blown plants was studied. The birch, alder, hazel, timothy and orchard grass pollen grains were used for this experiment. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and morphological examination of pollen grains by means of the light microscope were used. The data indicated that ectoin did not contributing for the allergen's release from the nasal cavity. In this regard, it can be assumed that ectoin improves the barrier function of the nasal mucosa and washes out the nasal cavity, but it does not influence on pollen grain integrity and contributing on releasing of allergen's molecules.

Keywords: ectoin, pollen of wind-blown plants, pollen allergens.

For citation: Korneenkov A. A., Levina E. A., Vyazemskaya E. E., Levin S. V., Skirpichnikov I. N. Spatial cluster modeling of access of elderly patients with hearing loss to medical services. *Rossiiskaya otorinolaringologiya*. 2021;20(6):8-12. <https://doi.org/10.18692/1810-4800-2021-6-8-12>

Во время сезона палинации ветроопыляемых растений в атмосфере значительно повышается концентрация основных аллергенных компонентов, вызывающих обострение у больных аллергическим ринитом, конъюнктивитом и бронхиальной астмой. В этот период количество пыльцевых зерен (п. з.) в воздухе может достигать высоких концентраций и значительно варьировать, как в различных климато-географических регионах, так и в разные периоды [1–3]. Для наиболее чувствительных пациентов достаточно всего 20 зе-

рен/м³, провоцирующих проявления первых клинических симптомов поллиноза [4]. В этой связи поиски эффективных, безопасных методов элиминации пыльцевых зерен из полости носа больных аллергическим ринитом остаются актуальными.

Пыльцевое зерно представляет собой мужской гаметофит, погруженный в цитоплазму вегетативной клетки (рис. 1). П. з. имеют консервативную, устойчивую к воздействиям факторов окружающей среды структуру, благодаря много-

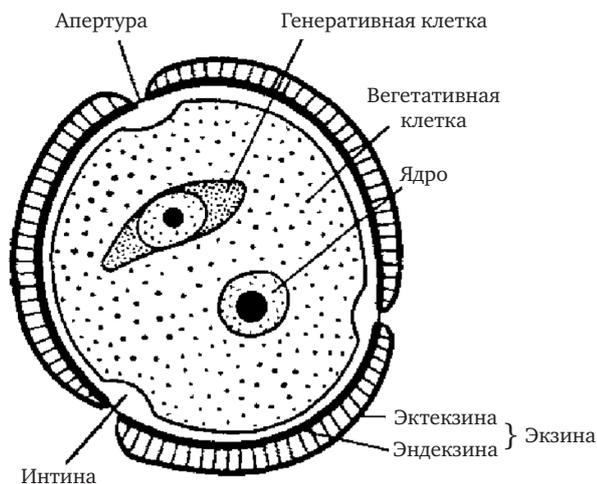


Рис. 1. Строение пыльцевого зерна [5]
Fig. 1. Structure of pollen grains [5]

слоистой оболочке – спородерме. Спородерма состоит из внешнего слоя – экзины (эктэксина + эндэксина) и внутреннего слоя – интины. В экзине п. з. имеются эластичные, тонкие или даже перфорированные места – апертуры, служащие для выхода пыльцевой трубки при прорастании [5].

Однако при попадании п.з. в полость носа и/или при разрушении экзины происходит высвобождение биологически активных веществ, в том числе и аллергенов. Одним из часто используемых средств для удаления аллергенов, в том числе и п. з. ветроопыляемых растений, из полости носа и гидратации ее слизистой оболочки, являются препараты из серии «Аква Марис», приготовленные из морской воды. В последнюю модификацию этого препарата в качестве активного компонента был включен компоненты «Эктоин».

Эктоин (2-метил-1,4,5,6-тетрагидропиримидин-4-карбоновая кислота) представляет собой водорастворимую циклическую аминокислоту и относится к классу бетаинов. Его продуцируют галофильные микроорганизмы. Естественная биологическая функция эктоина состоит в обеспечении резистентности бактерий к неблагоприятным факторам внешней среды (экстремальные температуры, засоление, УФ-излучения и др.). Впервые эктоин был выделен в 1977 из галофильных бактерий *Halorhodospira halochloris* (старое название *Ectothiorhodo spirahalochloris*, отсюда и название «эктоин»), которые обитают в соленом озере в Вади-Эль-Натрун, Египет (Скитская пустыня) [6].

В связи с тем, что эктоин способен стабилизировать клеточные мембраны, нами было выдвинуто предположение, что препарат может препятствовать высвобождению аллергенов из пыльцы.

Цель исследования

Изучить влияние эктоина на высвобождение аллергенов из пыльцы *in vitro*.

Материалы и методы исследования

В работе использовали пыльцу ветроопыляемых растений – ведущих аллергенов в средней полосе России: березы (*Betula pendula* Roth.), лещины (*Corylus avellana* (L.) H.KARST), ольхи (*Alnus glutinosa* (L.) GAERTN.), ежи сборной (*Dactylis glomerata* L.), тимофеевки луговой (*Phleum pratense* L.).

Препараты: раствор эктоина 1,3% (PARI ProtECT Inhalationslösung, Германия); «Аква Марис Эктоин» (спрей для носа) (Ядран-Галенски Лабораторий а. о., Хорватия), содержащий комбинацию эктоина и изотонического раствора морской соли; «Преднизолон Эльфа», 30 мг/мл для внутривенного и внутримышечного введения (АО «Научно-производственный центр «Эльфа», РФ).

Поликлональные антисыворотки кроликов (АС), полученные против пыльцевых аллергенов экстрактов («Allergopharma», Германия) березы, лещины, ольхи, ежи сборной и тимофеевки луговой.

Подготовка к ИФА. Были приготовлены по 16 навесок пыльцы каждого вида растений. Масса навески для проведения экстракции аллергенов в присутствии 1,3% раствора эктоина колебалась в пределах $2,3 \pm 0,4$ мг пыльцевых зерен. Масса навески для проведения экстракции аллергенов в присутствии преднизолона колебалась в пределах $1,5 \pm 0,45$ мг пыльцевых зерен. Для проведения экстракции к 3 навескам пыльцы каждого вида прибавили по 1 мл физиологического раствора и по 0,5 мл раствора эктоина, к следующим 3 навескам пыльцы каждого вида прибавили по 1 мл физиологического раствора и по 0,5 мл раствора преднизолона. К 10 навескам пыльцы каждого вида растений прибавили по 1,5 мл физиологического раствора. Экстракцию аллергенов из пыльцы проводили 30 минут при 37 °С, затем 60 минут при комнатной температуре при интенсивном встряхивании на шутеле.

Определение аллергенспецифической активности экстрактов пыльцы растений проводили непрямым способом иммуноферментного анализа (ИФА). Расчетное количество экстрактов, соответствующее 0,2 мг пыльцы в случае экстракции в присутствии эктоина и 0,1 мг пыльцы в случае экстракции в присутствии преднизолона, помещали в лунки 96 луночного планшета в трех повторностях. Прибавляли такое же количество карбонат-бикарбонатного буфера рН 9,4 (КББ). В следующие лунки помещали только КББ, в следующие 3 лунки помещали КББ и прибавляли 30% объема раствора эктоина (Э) или раствора преднизолона (П). Инкубировали 60 минут при 37 °С, затем 14 час при 40С. Удаляли жидкость из лунок, промывали фосфатно-солевым раствором с Tween-20 (ФСБ). В лунки помещали соответствующие специфические АС в разведении 1 : 1000.

Инкубировали 40 минут при 37 °С, удаляли жидкость из лунок, промывали ФСБ. В лунки помещали КК в разведении 1 : 2000, инкубировали 30 минут при 37 °С. Удаляли жидкость из лунок, промывали ФСБ. Прибавляли однокомпонентный раствор ТМБ, инкубировали при комнатной температуре в темноте. Реакцию останавливали разбавленным раствором серной кислоты. Оптическую плотность (ОП) реакционной массы определяли при 450 нм.

Морфологическое исследование пыльцы березы (с использованием светового микроскопа). В качестве модельного объекта была выбрана пыльца березы, поскольку в средней полосе России это один из ведущих пыльцевых аллергенов. Пыльцу березы (*Betula verrucosa* Ehrh. (*Betula pendula* Roth.) помещали в каплю (200 мкл) эктоина (Э) и физиологического раствора (положительный контроль) (Ф). Затем п.з. инкубировали при комнатной температуре и в динамике оценивали морфологические изменения, (деформацию, разрушение), происходившие с п.з. березы. Инкубацию проводили в течение 4 часов. Результаты оценивали до и через 30 мин, 1 час и далее через 1 час. Всего проведено 7 экспериментов и 2 эксперимента были проведены дополнительно, специально для фотосъемки. Подсчет деформированных п.з. проводили в 3-х кратной повторности. В работе для фотографирования п.з. использовали световой микроскоп Nikon (Eclipse E 200).

Статистическую обработку количественных данных выполняли с помощью статистических формул программы Microsoft Office Excel 2010 и Statistica 6.0

Результаты и анализ исследований

С целью исследования возможной стимуляции эктоина и кортикостероидного препарата

преднизолона на высвобождение аллергенов из п. з. мы выбрали две модели экспериментов *in vitro*: ИФА с экстрактами из пыльцы различных ветроопыляемых растений (березы, лещины, ольхи, ежи сборной и тимофеевки) в присутствии раствора эктоина и без него и морфологическое исследование п. з. березы (с использованием светового микроскопа) до и после воздействия препарата Аква Марис Эктоин. В качестве контроля использовали физиологический раствор.

Результаты ИФА представленные на рис. 2 и 3 свидетельствуют, что иммунохимическое связывание аллергенов пыльцы различных ветроопыляемых растений и АС в присутствии Эктоина или Преднизолона сопоставимы друг с другом и статистически достоверно не отличаются от контроля, когда экстракцию п.з. проводили только в физрастворе без препаратов. Особенно хорошо это показано в экспериментах с использованием эктоина (рис. 2).

Полученные результаты свидетельствует о том, что эктоин не влияет на высвобождение пыльцевых аллергенов, также как и физиологический раствор, и кортикостероидный препарат Преднизолон.

Было проведено морфологическое исследование п.з. березы (с использованием светового микроскопа) до и после воздействия эктоина (препарат Аква Марис Эктоин).

При инкубации п. з. с физиологическим раствором (контроль) на протяжении всего времени эксперимента (4 часа) морфология п.з. практически не изменялась (рис. 4). Клеточная стенка и апертуры были хорошо выражены; цитоплазма прозрачная; отслоения цитоплазмы от клеточной стенки на протяжении всего эксперимента не происходило, так же, как не наблюдалось и деформации п.з.

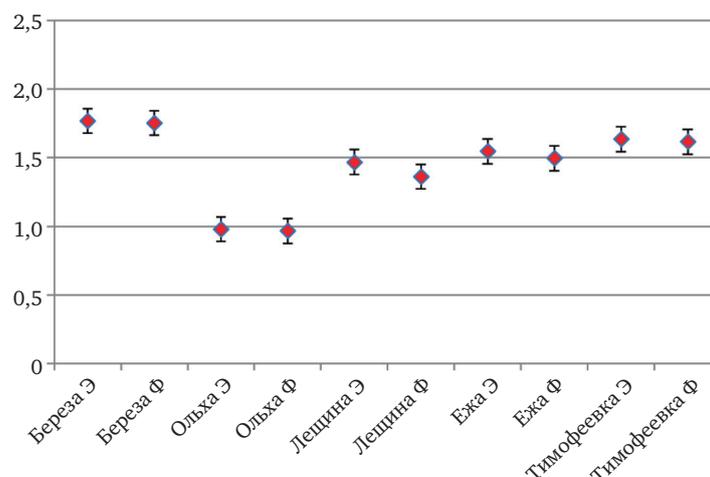


Рис. 2. Концентрация аллергенов (ОП), экстрагируемых из пыльцы различных ветроопыляемых растений физиологическим раствором в присутствии эктоина – Э и только физиологическим раствором – Ф

Fig. 2. Concentration of allergens (OD) extracted from pollen of various wind-pollinated plants with saline solution in the presence of ectoin – E and only with saline solution – S

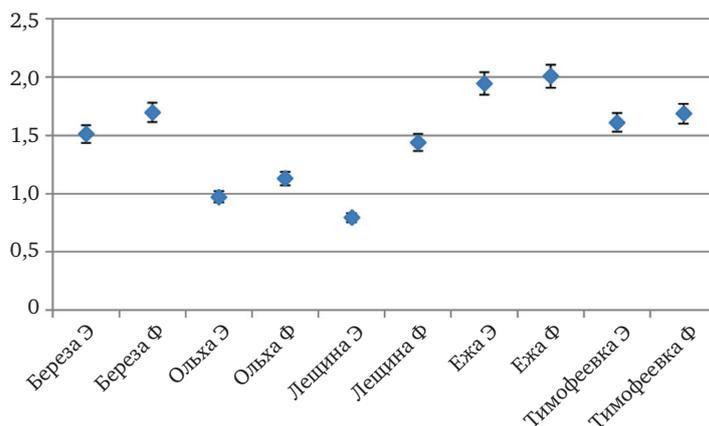


Рис. 3. Концентрация аллергенов (ОП), экстрагируемых из пыльцы различных ветроопыляемых растений физиологическим раствором в присутствии преднизолона – П и только физиологическим раствором – Ф
Fig. 3. Concentration of allergens (OD) extracted from pollen of various wind-pollinated plants with saline solution in the presence of prednisone – P and only with saline solution – S

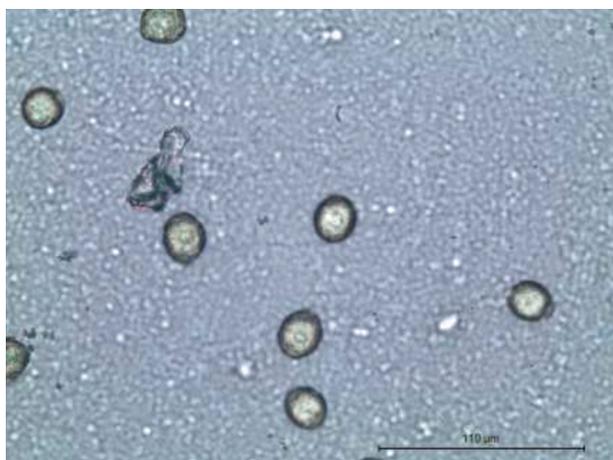


Рис. 4. Пыльцевые зерна *Betula verrucosa* Ehrh. (*Betula pendula* Roth.) при инкубации в физиологическом растворе (экспозиция 4 час, увеличение окуляр 10х/18, объектив 40х/1,25)
Fig. 4. Pollen grains *Betula verrucosa* Ehrh. (*Betula pendula* Roth.) During incubation in saline (exposure 4 hours, magnification eyepiece 10x/18, objective 40x/1,25)

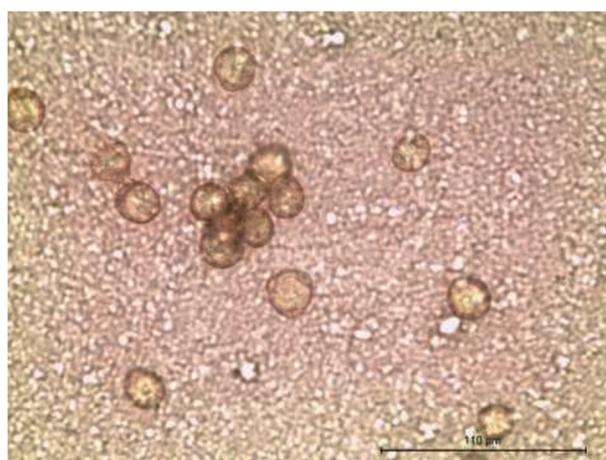


Рис. 5. Пыльцевые зерна *Betula verrucosa* Ehrh. (*Betula pendula* Roth.) при инкубации в Аква Марис Эктоин (экспозиция 4 час, увеличение окуляр 10х/18, объектив 40х/1,25)
Fig. 5. Pollen grains *Betula verrucosa* Ehrh. (*Betula pendula* Roth.) During incubation in Aqua Maris Ectoин (exposure 4 hours, eyepiece magnification 10x/18, objective 40x/1.25)

При инкубации с Э морфология п. з. на протяжении всего эксперимента была сопоставима с контролем (рис. 5).

Таким образом, проведенные эксперименты свидетельствуют о том, что присутствие эктоина, как средства неспецифической барьерной защиты, не влияет на высвобождение аллергенов из п.з. ветроопыляемых растений (березы, лещины, ольхи, ежи сборной и тимофеевки).

Механизм действия эктоина разнообразен и еще не до конца изучен. Молекула эктоина способна образовывать большое число водородных связей, поэтому может удерживать вокруг себя 4–5 молекул воды, образуя своего рода «водяной кокон» [7].

Многочисленные исследования доказали, что этот «водяной кокон» очень стабилен. Благодаря образованию слоя воды эктоин стабилизирует клеточные мембраны, улучшая их устойчивость

к воздействию стрессовых факторов. Сам эктоин не вступает в соединения с протеинами и липидами и не может проникать в клетки. Было доказано, что эктоин может оказывать гидропротективное воздействие на слизистую оболочку полости носа, создавая гидропленку на ее поверхности, ослабляя инфицирование и уменьшая воспалительные процессы [6, 8]. Все эти свойства эктоина были использованы для создания формулы лекарственного препарата, в котором это вещество используется для ингибирования дегидратации клеток эпителия слизистой оболочки верхних дыхательных путей и повышения стабильности липидных мембран [9–11]. Ранее проведенные исследования, в том числе и мета-анализ, продемонстрировали позитивный эффект у пациентов с аллергическим ринитом при применении назального спрея и глазных капель с содержанием эктоина [12–18].

Наше исследование показало, что эктоин не влияет на нарушение целостности п. з. и, таким образом, препятствует адгезии аллергенов на слизистой оболочке назальной полости больных аллергическим ринитом. Некоторыми исследователями также было показано, что эктоин может уменьшить аллергическую сенсибилизацию. В частности, эктоин, по-видимому, предотвращает миграцию нагруженных антигеном дендритных клеток в лимфатические узлы либо путем прямого воздействия на дендритные клетки, либо путем подавления нейтрофильного воспаления [13, 14]. Все это способствует стабилизации слизистых оболочек, укрепляет эпителиальный барьер, выстилающий полость носа, тем самым защищая пациента от проникновения аллергенов [14].

В наших экспериментах *in vitro* была использована пыльца различных ветроопыляемых растений: березы, ольхи, лещины, злаков, которые являются доминирующими пыльцевыми аллергенами в средней полосе России. Полученные данные свидетельствуют о том, что присутствие экто-

ина не провоцирует высвобождение аллергенов из пыльцы. Концентрация аллергенов в экстрактах из пыльцы различных ветроопыляемых растений (в том числе и из пыльцы березы) как в присутствии эктоина, так и просто физиологическом растворе без эктоина статистически достоверно не отличается. Каков механизм воздействия эктоина на спородерму, пока не ясно.

Заключение

Таким образом, помимо того, что эктоин стабилизирует структуру белков, нуклеиновых кислот, уменьшает выброс гистамина и других биологически активных веществ и купирует воспалительный процесс за счет «физического экранирования» внешних факторов, он не только эффективно вымывает п. з. из полости носа, но при этом не разрушает их целостности и не способствует выбросу аллергенов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Ziska L. H., Makra L., Harry S. K., Bruffaerts N. et al. Temperature-related changes in airborne allergenic pollen abundance and seasonality across the northern hemisphere: a retrospective data analysis. *Lancet Planet Health*. 2019;3(3):e124-e131. [https://doi.org/10.1016/S2542-5196\(19\)30015-4](https://doi.org/10.1016/S2542-5196(19)30015-4).
2. Jochner S., Lüpke M., Laube J., Weichenmeier I., Gudrun Pusch, Traidl-Hoffmann C., Schmidt-Weber C., Buters J. T. M., Menzel A. Seasonal variation of birch and grass pollen loads and allergen release at two sites in the German. *Alps. Atmospheric Environment*. 2015; 122:83-93.
3. Buters J. T. M., Antunes C., Galveias A., Bergmann K. C., Thibaudon M., Galán C., Schmidt-Weber C., Oteros J. Pollen and spore monitoring in the world. *Clin Transl Allergy*. 2018;8:9. <https://doi.org/10.1186/s13601-018-0197-8>.
4. Rapiejko P., Stanlaewicz W., Szczgielski K., Jurkiewicz D. Threshold pollen count necessary to evoke allergic symptoms. *Otolaryngol. Pol*. 2007; 61(4):591-594.
5. Принципы и методы аэропаллинологических исследований. Под ред. Н. Р. Мейер-Меликян, Е. Э. Северовой. 1999, 48 с. [Printsipy i metody aeropalinologicheskikh issledovaniy. Ed. N. R. Meier-Melikian, E. E. Severova. 1999, 48 p. (In Russ.)]
6. Bitop, Ectoin – The Natural Stress-Protection Molecule, Scientific Information, Witten, Germany. 2010; http://www.ectoin.net/data/download/bitop_basisbroschuere.pdf.
7. Smiatek J., Harishchandra R. K., Rubner O., Galla H.-J., Heuer A. Properties of compatible solutes in aqueous solution. *Biophysical Chemistry*. 2012; 160(1):62-68.
8. Кочеровец В. И. Эктоин – секрет природы с уникальным биотерапевтическим эффектом. Монография по продукту. Москва, 2020. 44 с. [Kocherovets V. I. *Ectoin – sekret prirody s unikal'nym bioterapevticheskim efektom. Monografiya po produktu*. Moscow, 2020. 44 p. (In Russ.)]
9. Harishchandra R. K., Sachan A. K., Kerth A., Lentzen G., Neuhaus T., Galla H.-J.. Compatible solutes: ectoine and hydroxyectoine improve functional nanostructures in artificial lung surfactants. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2011; 1808 (12): 2830–2840.
10. Dirschka T. Ectoin – Anwendung und Perspektiven für die Dermatologie. *Aktuelle Dermatologie*. 2008;34(4):115-118.
11. Lentzen G., Schwarz T. Extremolytes: natural compounds from extremophiles for versatile applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2006;72(4):623-634.
12. Eichel A., Bilstein A, Werkhäuser N., Mösges R. Meta-Analysis of the Efficacy of Ectoine Nasal Spray in Patients with Allergic Rhinoconjunctivitis. *J Allergy (Cairo)*. 2014;2014:292545. <https://doi.org/10.1155/2014/292545>.
13. Kroker M., U. Sydlik, A. Autengruber et al. Preventing carbon nanoparticle-induced lung inflammation reduces antigenspecific sensitization and subsequent allergic reactions in a mouse model. *Part Fibre Toxicology*. 2015;12:20. <https://doi.org/10.1186/s12989-015-0093-5>.
14. Casale M., Moffa A., Carbone S., Fraccaroli F., Costantino A., Sabatino L., Lopez MA, Baptista P., Cassano M., Rinaldi V. Topical Ectoine: A Promising Molecule in the Upper Airways Inflammation – A Systematic Review. *Biomed Res Int*. 2019; 7150942. <https://doi.org/10.1155/2019/7150942>.

15. Salapatek A. M., Werkhäuser N., Basma I., Mösges R., Raskopf E., Bilstein A. Effects of ectoine containing nasal spray and eye drops on symptoms of seasonal allergic rhinoconjunctivitis. *Clin Transl Allergy*. 2021;11(1): e12006. <https://doi.org/10.1002/ct2.12006>.
16. Nosch D. S., Joos R. E., Job M. Prospective randomized study to evaluate the efficacy and tolerability of Ectoin® containing Eye Spray (EES09) and comparison to the liposomal Eye Spray Tears Again® (TA) in the treatment of dry eye disease. *Cont Lens Anterior Eye*. 2020;101318. <https://doi.org/10.1016/j.clae.2020.04.003>.
17. Werkhäuser N., Bilstein A., Sonnemann U. Treatment of allergic rhinitis with ectoine containing nasal spray and eye drops in comparison with azelastine containing nasal spray and eye drops or with cromoglycic Acid containing nasal spray. *J Allergy (Cairo)*. 2014;2014:176597. <https://doi.org/10.1155/2014/176597>.
18. Мокроносова М. А., Желтикова Т. М., Арефьева А. С., Тарасова Г. Д. Терапевтический эффект препарата Аква Марис эктоин у больных с аллергическим интермиттирующим ринитом. *Российская оториноларингология*. 2017;87(2):142–148 [Therapeutic effect of the preparation Aqua Maris®Ectoin in patients with allergic intermittent rhinitis. *Rossiiskaya otorinologiya*. 2017;87(2):142–148 (In Russ.)]. <https://doi.org/10.18692/1810-4800-2017-2-142-148>

Информация об авторах

Желтикова Татьяна Михайловна – доктор биологических наук, заведующая лабораторией алергодиагностики, Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова (105064, Россия, Москва, Малый Казенный переулок, д. 5А); e-mail: t-zheltikova@yandex.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5394-7132>

Ахапкина Ирина Гавриловна – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова (105064, Россия, Москва, Малый Казенный переулок, д. 5А); e-mail: isun17@yandex.ru

Мокроносова Марина Адольфовна – доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник, Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова (105064, Россия, Москва, Малый Казенный переулок, д. 5А); e-mail: mmokronosova@mail.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2123-8440>

Information about authors

Tat'yana M. Zheltikova – Doctor of Biological Sciences, Head of laboratory; Mechnikov Research Institute of Vaccines and Serum (5A, 105064, Moscow, Russia. e-mail: t-zheltikova@yandex.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5394-7132>

Irina G. Akhapkina – leading researcher, Ph.D., Mechnikov Research Institute of Vaccines and Serum, 105064, Moscow, Russia. E-mail: isun17@yandex.ru

Marina A. Mokronosova – Professor, Doctor of medical Sciences, leading researcher; Mechnikov Research Institute of Vaccines and Serum, 105064, Moscow, Russia; e-mail: mmokronosova@mail.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2123-8440>