

**МОЛЕКУЛЯРНО-КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ
ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ ПЕЛОИДОВ**

ГУ Научный центр клинической и экспериментальной медицины СО РАМН, Новосибирск,
Новосибирская государственная медицинская академия МЗ РФ

Биологически активные компоненты пелоидов в условиях пелоидотерапии активно проникают через неповрежденную кожу и запускают клеточные реакции по типу асептического иммунного воспаления, активно влияя как на клетки-эффекторы воспаления, так и на состояние иммунологической реактивности организма в целом. Биологически активный липидный компонент пелоидов обладает антиоксидантными свойствами, проявляющимися как в условиях *in vitro*, так и в условиях *in vivo*, в виде торможения индуцированной хемилюминесценции нейтрофилов крови.

Ключевые слова: пелоиды, кожа, воспаление

Известно, что для всех типов пелоидов характерны общие механизмы реализации их позитивного воздействия за счет органоминерального состава, наличия биологически активных, гормоноподобных и антиоксидантных веществ [1, 4, 8]. Особую роль в фармакологической активности отводят сложным липидным комплексам, в частности липидным антиоксидантам [5], содержащимся в лечебных грязях. Именно с ними во многом связывают противовоспалительное, иммуностимулирующее и рассасывающее действие пелоидов [2, 7].

Согласно доминирующей в настоящее время нейрорефлекторной теории, пелоиды реализуют свое действие через термические, химические и механические факторы с первичным вовлечением в процесс эпидермиса и дермы или слизистых (в зависимости от области аппликации) с последующим каскадом нейрорефлекторных и нейрогуморальных эффектов [10, 12].

Роль кожи в реализации действия лечебных физических факторов многопланова и своеобразна: адсорбция химических веществ из лечебной среды; образование кожного депо веществ, компоненты которого действуют на различные структуры кожи, процессы микроциркуляции и рефлекторно — на многие органы и ткани в соответствии с тропностью и рефлекторными связями [10].

Контактируя с различными агентами внешней среды, кожа фактически является самостоятельным органом иммунной системы, в реализации механизмов которой участвуют непосредственно клетки эпидермиса (кератиноциты, клетки Лангерганса), а также иммунологически значимые клетки, локализующиеся в дерме (нейтрофилы, макрофаги, лимфоциты, эндотелий кровеносных и лимфатических сосудов).

Воздействие биологически активного компонента пелоидов в условиях пелоидотерапии можно рассматривать как проникновение их через неповрежденную кожу и эффективное влияние, за счет этого, как на клетки-эффекторы воспаления, так и на нейроэндокринную систему с изменением состояния иммунологической реактивности организма в целом [3, 5, 9]. Таким образом, понимание молекулярно-клеточных механизмов противовоспалительного влияния пелоидов, как и особенности их влияния на кожу и подкожные структуры, является важным этапом в оптимизации пелоидотерапии и повышении их лечебной эффективности при комплексной терапии больных хроническими заболеваниями внутренних органов и кожи.

Пелоиды озера «Островное» Краснозерского района Новосибирской области относят к илово-сульфидным. Ранее в клинических исследованиях было показано, что они обладают более выраженными антиоксидантными и противовоспалительными свойствами, чем другие изученные нами пелоиды, и эффективны в лечении и реабилитации больных остеохондрозом и артрозами [2, 4]. С целью выявления молекулярно-клеточных механизмов лечебного (противовоспалительного) влияния пелоидов было выделено несколько этапов работы. На первом этапе мы провели сравнительное изучение физико-химических свойств липидных экстрактов различных видов пелоидов по их спектральным характеристикам. На втором этапе в условиях *in vitro* оценивали антиоксидантные свойства липидных экстрактов из пелоидов по их способности ингибировать индуцированную хемилюминесценцию нейтрофилов крови. На третьем этапе мы изучали морфологические изменения в коже экспериментальных животных при аппликации пелоидов.

Материалы и методы исследования

При оценке физико-химических свойств пелоидов мы изучали спектральные характеристики липидных экстрактов пелоидов санатория «Краснозерский», «Озеро Карачи» и «Мертвого моря» в видимой области спектра, с целью выявления наличия в них каротиноидов, являющихся активными жирорастворимыми антиоксидантами. Обоснованием для изучения содержания в липидных экстрактах каротиноидов послужили проведенные нами ранее исследования [5], в которых было показано, что при пелоидотерапии больных остеохондрозом наиболее показательными среди изученных жирорастворимых антиоксидантов были изменения именно этой группы соединений.

При получении липидных экстрактов пелоидов были использованы одинаковые навески пелоидов и стандартные методы выделения по Фольчу.

Методика оценки биотропных свойств пелоидов заключалась в изучении люминол- или люцигенинзависимой хемилюминесценции лейкоцитов при добавлении экстрактов пелоидов. К 0,7 мл раствора Хэнкса без фенолового красного добавляли 0,1 мл лейкоцези доноров, 0,1 мл стандартной концентрации люминола или люцигенина. После термостатирования в течение 5 мин. в кювету вносили по 0,1 мл экстракта грязей и сразу начинали регистрировать хемилюминесценцию при 37 °С. Результаты выражали в количестве импульсов/гранулоцит/мин. на пике световой эмиссии. После регистрации хемилюминесценции в течение 15 мин. в те же кюветы вносили 0,1 мл зимозана в концентрации 10 мг/мл и регистрировали ХЛ еще в течение 30 мин. Оценку влияния экстрактов проводили относительно показателей ХЛ ответа нейтрофилов без экстрактов.

Изучение морфологических изменений в коже экспериментальных животных было выполнено на мышах-самцах линии С57В1/6 2-месячного возраста, массой тела 20-22 г, разводки питомника Института цитологии и генетики СО РАН.

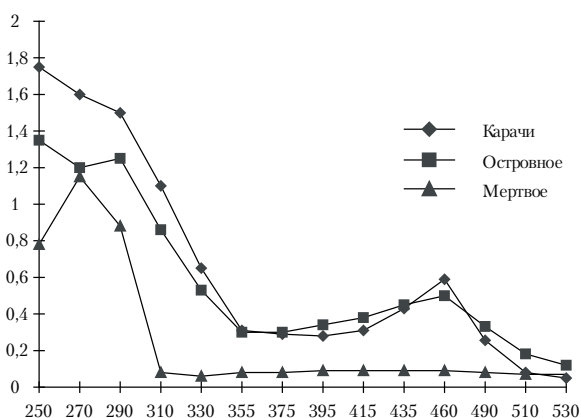


Рис. 1. Спектральные характеристики липидных экстрактов из грязей оз. «Карачи», оз. «Островное» и Мертвого моря

Животные были разделены на три группы. Первая (интактные) служила контролем. Животным второй и третьей групп через день делали аппликации торфа и пелоидов соответственно на поясничную область на 15 минут при температуре 38-40 °С.

Для морфологического исследования в каждой группе использовали по 12 мышей. Животных умерщвляли путем дислокации позвонков в шейном отделе. Гистологические образцы кожи брали в поясничной области в месте аппликации исследуемых веществ (торфа и пелоидов). В контрольной группе придерживались той же локализации.

Для светооптического исследования полученный материал фиксировали в 10% растворе формалина, обезвоживали в серии спиртов возрастающей концентрации и заключали в парафин. На санном микротоме готовили срезы толщиной 5-6 мкм и окрашивали гематоксилином Майера и эозином [6]. Морфометрию осуществляли с помощью окулярной сетки из 25 точек. Подсчитывали численную плотность и клеточный состав инфильтратов в дерме.

Результаты исследования и их обсуждение

Липидные экстракты грязей «Озеро Карачи» и «Островное» обладают близкими спектральными характеристиками в области 460 нм, обусловленными, как нами было показано с использованием

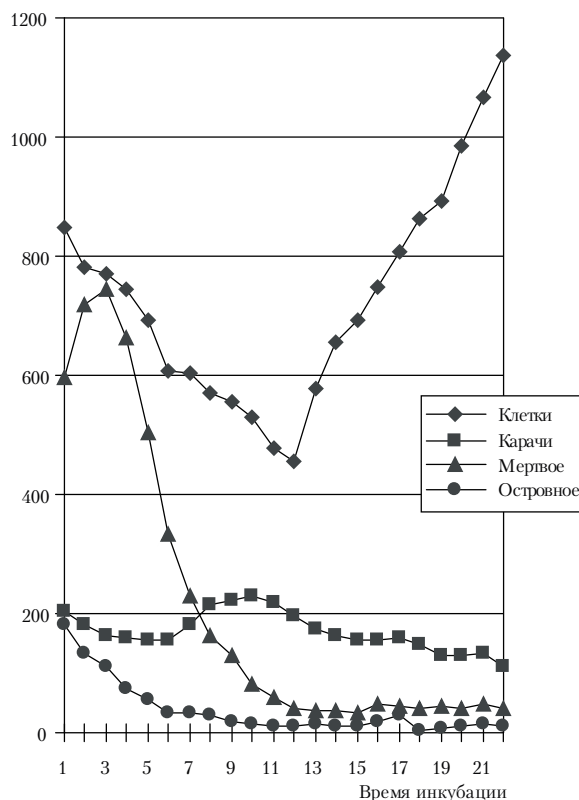


Рис. 2. Влияние липидных экстрактов пелоидов «Озера Островное» на хемилюминесценцию нейтрофилов крови человека в динамике

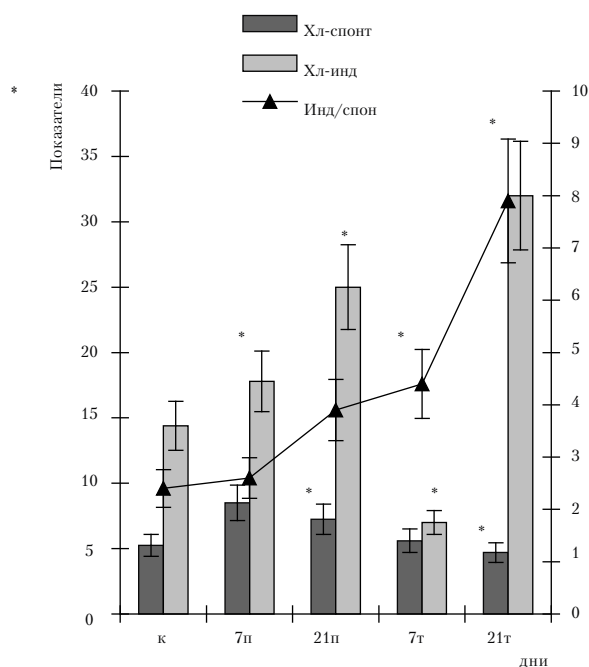


Рис. 3. Сравнительная оценка хемилюминесценции крови экспериментальных животных при воздействии на них пелоидов озера «Островное» (опыт) и торфа (контроль).

Хл-спонт — спонтанная хемилюминесценция нейтрофилов крови экспериментальных животных, Хл-инд — хемилюминесценция индуцированная при добавлении в инкубационную среду зимозана, Инд/спонт — безразмерный коэффициент, характеризующий степень прироста хемилюминесценции индуцированной по отношению к спонтанной. * — достоверность отличий (при $P < 0,05$) между соответствующими группами в контроле и опыте.

соответствующих свидетелей, каротиноидам и их аналогам. Липидные экстракты из грязей Мертвого моря практически не поглощают в области 460 нм, что видно на *рисунке 1*.

Как видно из представленного *рисунка 2*, все использованные экстракты оказывали ингибирующее влияние на микробицидную функцию нейтрофилов крови. Поскольку микробицидная функция гранулоцитов определяется скоростью внутриклеточной генерации активированных кислородных метаболитов, то из полученных данных можно сделать вывод о том, что экстракты пелоидов, обладая антиоксидантными свойствами, оказывают также противовоспалительное действие за счет торможения микробицидной функции нейтрофилов крови. Антиоксидантные свойства пелоидов проявляются и в экспериментах на животных, что

видно из *рисунка 3*. Как видно из представленных данных, снижение хемилюминесцентного ответа нейтрофилов крови экспериментальных животных было достоверно более выражено при аппликации пелоидов по сравнению с аппликацией торфа. Особенно убедительно это видно из расчетных коэффициентов (К), оцениваемых как отношение ХЛ-индуцированной к ХЛ-спонтанной.

Результаты исследования по оценке влияния пелоидов на кожу экспериментальных животных показали, что в первых двух группах (контроль и торф) во все сроки наблюдения в коже не отмечали существенных морфологических изменений, кроме полнокровия сосудов кожи и слабовыраженного отека дермы при аппликации торфа (*фото 1*), по-видимому, связанных с воздействием температурного и стрессорного факторов.

При аппликации пелоидов у животных третьей группы через неделю в эпидермисе наблюдали межклеточный отек, гидропическую дистрофию эпителиоцитов, преимущественно в зернистом слое, слабовыраженную пролиферативную активность в ростковой зоне с расширением базального и шиповатого слоев.

В дерме и подкожной клетчатке определяли отек, набухание эндотелия сосудов, полнокровие, очаговые периваскулярные скопления нейтрофилов, лимфоцитов, макрофагов (*фото 2*).

Через 3 недели от начала воздействия пелоидами значительно уменьшился отек как в эпидермисе, так и в дерме, снизилось количество вакуолизированных эпителиоцитов. Уменьшились численная плотность и размеры периваскулярных инфильтратов, изменился их качественный состав, в котором преобладали макрофаги и лимфоциты с уменьшением количества нейтрофилов в 2,2 раза (*таблица 1; фото 3*).

Полученные данные, по-видимому, можно объяснить тем, что липидные комплексы и иные биологически активные вещества в составе пелоидов [13, 14] обладают повышенной проникающей способностью даже и через неповрежденную кожу, запуская клеточные реакции по типу асептического иммунного воспаления, и активируя системный нейрогуморальный ответ [4].

Возможно, первыми, кто вступает в контакт с пелоидами, являются кератиноциты, которые в отсутствие повреждающих и стимулирующих воз-

Таблица 1

Клеточный состав инфильтратов в коже мышей при воздействии пелоидов ($M \pm m$)

Сроки воздействия	Клеточный состав инфильтратов (%)			
	Макрофаги	Лимфоциты *	Нейтрофилы*	Фибробласты*
1 неделя	47,24±1,02	28,7±0,91	15,5±0,84	8,56±0,89
3 неделя	48,15±1,2	31,95±0,85	7,04±0,93	12,86±0,65

Примечание: Все клетки инфильтрата приняты за 100%. * — достоверность отличий между клеточным составом инфильтрата в коже мышей между первой и третьей неделями эксперимента (при $P < 0,05$)

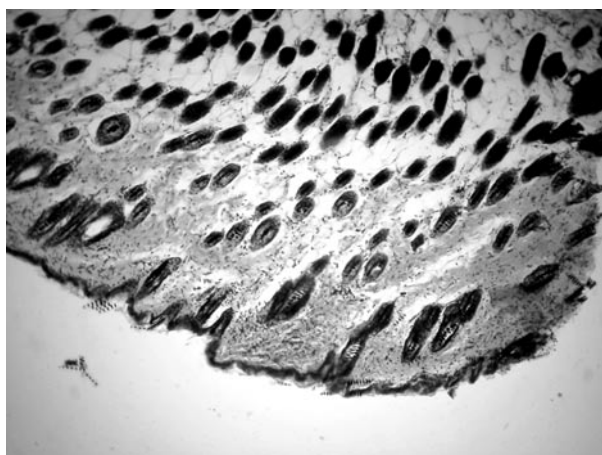


Фото 1. Участок кожи мыши через одну неделю от начала воздействия торфом: в дерме выраженный отек, полнокровные сосуды. Увеличение 200. Окраска гематоксилином и эозином.

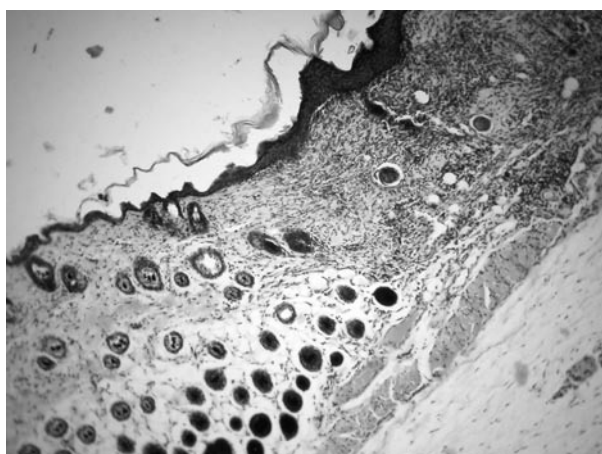


Фото 2. Участок кожи мыши через одну неделю от начала воздействия пелоидами: в дерме отек и выраженная периваскулярная инфильтрация, полнокровные сосуды. Увеличение 150. Окраска гематоксилином и эозином.

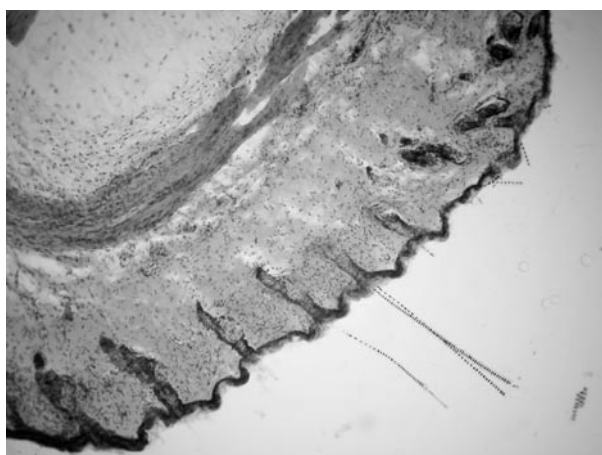


Фото 3. Участок кожи мыши через три недели от начала воздействия пелоидами: единичные скопления лимфоцитов. Увеличение 150. Окраска гематоксилином и эозином.

действий наряду с протеогликанами [20] выполняют барьерную функцию. В ответ на активацию разнообразными агентами внешней среды они начинают продуцировать различные цитокины [11], являясь, например, основным источником ИЛ-1 в коже. Кератиноциты выделяют хемокины, привлекающие в кожу циркулирующие клетки — Т-лимфоциты, клетки Лангерганса, активно участвуя, за счет этого, в регуляции процессов взаимодействия между дерматансульфатом, протеогликанами и фибробластами [19]. Возможно, именно с этим связан запуск системного ответа на бальнеотерапию, в частности, на пелоидотерапию, проявляющегося в изменении метаболизма как внеклеточного матрикса соединительной ткани, так и коллагена [2]. Считается, что в регуляции процесса экспрессии генов, участвующего в регуляции синтеза коллагена типа I и III, важная роль может принадлежать металлопротеиназам, активность которых определяется фибробластами кожи [24].

Учитывая уменьшение количества и размеров инфильтратов в дерме к концу эксперимента и снижение количества нейтрофилов в них, чьи антибактериальные свойства связывают с генерацией кислородных метаболитов, обладающих способностью к активации реакций перекисного окисления липидов [17], можно предположить, что противовоспалительные эффекты пелоидов сопряжены с антиоксидантными свойствами липотропных веществ, входящих в их состав, что было нами показано в условиях *in vitro* по торможению интенсивности хемилюминесценции нейтрофилов крови.

Оценка спектральных характеристик липидных экстрактов пелоидов показала, что выявленный эффект торможения хемилюминесцентного ответа может быть обусловлен каротиноидами, обладающими спектрами поглощения в области 450-470 нм. Наличие этих биологически высокоактивных соединений в пелоидах обусловлено специфическими особенностями их этногенеза, чем и можно объяснить высокие лечебные свойства грязей при заболеваниях дистрофической и воспалительной природы. Действительно, обладая выраженными антиоксидантными и антигипоксантами свойствами, каротиноиды эффективно регулируют физико-химические свойства биологических мембран и активность мембранолокализованных и фосфолипидзависимых ферментов, за счет чего достигается их высокий терапевтический эффект [22]. В последние годы каротиноиды, в частности бетакаротин, успешно используют в профилактике опухолевых заболеваний, ИБС, коррекции неблагоприятного влияния факторов окружающей среды на организм, поскольку они стимулируют защитные силы организма в целом и активируют системы гуморального и клеточного иммунитета.

Иммуномодулирующими свойствами обладают и ретиноиды, что открывает интересные перспективы не только в антипролиферативной и иммуномодулирующей стратегии терапии опухолевых метастазов и профилактике злокачественных новообразований [16], но и эффективные регуляторы антиоксидантного статуса организма в целом [15]. Вероятно, за счет антиоксидантных свойств ретиноиды обладают способностью эффективно вмешиваться и в процессы регуляции процессов микроциркуляции [18], нарушения которой являются одним из основных факторов нарушения тканевой трофики у больных остеохондрозом. Эта регулирующая роль процессов микроциркуляции ретиноидами во многом реализуется за счет их способности ингибировать активность нитрат-редуктазы [18].

Таким образом, на основании полученных данных можно сделать вывод о высокой проникающей способности пелоидов даже через неповрежденную кожу, где они потенцируют первоначально воспалительную реакцию асептического характера, а при дальнейшем воздействии оказывают противовоспалительный эффект, преимущественно за счет антиоксидантных свойств липотропных веществ, входящих в их состав.

Molecular-cellular mechanisms anti-inflammatory effect of peloids

O.Yu. Verba, O.V. Potapova, V.N. Kurnjavkin, E.A. Kurnjavkina, N.G. Luzgina, V.Yu. Kulikov

At peloidotherapy, biologically active peloids' components penetrate through an intact skin and cause cellular reactions like aseptic immune inflammation, influencing both effector cells of inflammation and organism immunological reactivity state in a whole. Peloids' biologically active lipid components possesses some anti-oxidative properties, manifesting both in vitro and in vivo as inhibition of induced chemiluminescence of blood neutrophils.

Литература

1. Вайсфальд Д.Н. Лечебное применение грязей / Д.Н. Вайсфальд, Т.Д. Голуб. — Киев, 1980. — 144 с.
2. Верба О.Ю. Особенности эндокринно-метаболической регуляции у больных остеохондрозом в динамике пелоидотерапии: Автореф. дис. ... канд. мед. наук / О.Ю. Верба. — Новосибирск, 2001.
3. Дунаева М.В. Оценка эффективности пелоидотерапии в комплексном лечении помутнений роговой оболочки: Автореф. дис. ... канд. мед. наук / М.В. Дунаева. — Одесса, 1996. — 17 с.
4. Куликов В.Ю. Адаптогенные и лечебные свойства пелоидов / В.Ю. Куликов. — Новосибирск, 2001. — 219 с.
5. Курнявкина Е.А. Саногенетические механизмы пелоидотерапии при остеохондрозе: Автореф. дис. ... канд. мед.

- наук / Е.А. Курнявкина. — Новосибирск, 1999. — 130 с.
6. Меркулов Г.А. Курс патогистологической техники / Г.А. Меркулов. — Л., 1969. — 645 с.
7. Низкодубова С.В. Грязевые препараты / С.В. Низкодубова, А.А. Табацкая, Г.М. Нечай // Бюл. эксперим. биологии и медицины. — 1982. — № 7. — С. 54-55.
8. Низкодубова С.В. Препараты из лечебной грязи и рапы / С.В. Низкодубова, А.А. Табацкая, Г.Г. Долгих. — Томск. — 1993. — С. 22-26.
9. Павлова Е.С. Механизмы иммунитета / Е.С. Павлова, Л.И. Позднякова // Тез. докл. респ. науч. конф. — Киев, 1985. — С. 178-179.
10. Улащик В.С. Введение в теоретические основы физической терапии / В.С. Улащик. — Минск, 1963. — 115 с.
11. Хаитов Р.М. Физиология иммунной системы / Р.М. Хаитов. — М., 2001. — 390 с.
12. Царфис П.Г. Биохимические основы физической терапии / П.Г. Царфис, И.Д. Френкель. — М., 1991. — 158 с.
13. Шинкаренко А.Л. Органические вещества лечебных грязей и их роль в механизме лечебного действия на организм: Метод. рекомендации / А.Л. Шинкаренко, Н.Г. Миленина. — Пятигорск, 1973. — 27 с.
14. Шинкаренко А.Л. Грязевые препараты / А.Л. Шинкаренко, Н.Г. Миленина. — Томск, 1991.
15. Beta-carotene supplementation increases antioxidant capacity of plasma in older women / M. Meydani, A. Martin, L.D. Ribayamercado et al. // Journal of Nutrition. — 1994 (Dec.). — Vol. 124. — № 12. — P. 2397-2403
16. Gille J.J.P. Mutagenicity of metabolic oxygen radicals in mammalian cell cultures / J.J.P. Gille, C.G.M. Vanberkel, H. Joenje // Carcinogenesis. — 1994. — Vol. 15. — № 12. — P. 2695-2699.
17. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems — Source, biochemistry, and role in human disease / B. Halliwell // Amer. J. Med. — 1991. — Vol. 91. — Suppl. 3C. — P. S14-S22.
18. Inhibition of nitrate reductase by water stress and oxygen in detached oat leaves: a possible mechanism of action / J.D. Kenis, M.B. Rouby, M.O. Edelman, S.T. Silvente // Journal of Plant Physiology. — 1994. — Vol. 144. — № 6. — P. 735-739.
19. Interaction of small dermatan sulfate proteoglycan from fibroblasts with fibronectin / G. Schmidt, H. Robenek, B. Harrach et al. // J. Cell Biol. — 1987. — Vol. 104. — P. 1683-1691.
20. Interactions between thrombospondin and the small proteoglycan decorin: interference with cell attachment / M. Winnemoller, P. Schon, P. Vischer, H. Kresse // Eur. J. Cell Biol. — 1992. — Vol. 59. — P. 47-55.
21. Kuroda K. Gene expression of types I and III collagen, decorin, matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in skin fibroblasts from patients with systemic sclerosis / K. Kuroda, H. Shinkai // Arch. Dermatol. Res. — 1997. — Vol. 289. — P. 567-572.
22. Nakagawa K. β -Carotene as a high potency antioxidant to prevent the formation of phospholipid hydroperoxides in red blood cells of mice / K. Nakagawa, K. Fujimoto, T. Miyazawa // Biochim. et Biophys. Acta. — 1996. — Vol. 1299. — P. 110-116