

На правах рукописи

Селянина Галина Алексеевна

**Влияние минеральной воды "Уралочка" на состояние
иммунной системы и стресс-реактивность**

14.00.36 - аллергология и иммунология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Челябинск 2000

На правах рукописи

Селянина Галина Алексеевна

**Влияние минеральной воды "Уралочка" на состояние
иммунной системы и стресс-реактивность**

14.00.36 - аллергология и иммунология

**АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Челябинск 2000

Работа выполнена в Челябинской государственной медицинской академии.

Научный руководитель:

Заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук,
профессор Долгушин И.И.

Официальные оппоненты:

- Доктор медицинских наук, профессор

Смолягин А.И.

- Доктор медицинских наук, профессор

Чукичев А.В.

Ведущее учреждение – Научно-исследовательский институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН (г. Пермь).

Защита диссертации состоится 31 октября
2000 года в 15⁰⁰ часов на заседании диссертационного ученого совета Д.084.04.02. Челябинской государственной медицинской академии по адресу: 454092, г. Челябинск, ул. Воровского 64.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Челябинской государственной медицинской академии.

Автореферат разослан 26 сентября 2000 г.

Ученый секретарь Специализированного ученого совета, доктор медицинских наук, профессор
А.В. Зурочка

Введение

Актуальность проблемы Одним из актуальных направлений современной медицины является иммунореабилитация, развитие которой началось в 80-е годы нашего столетия. Это направление разрабатывалось с учетом тесных взаимосвязей иммунной системы с нервной, эндокринной и другими системами организма. В понятие иммунореабилитации вкладывается не только восстановление нарушенных функций иммунной системы, но и выздоровление больного при остром течении заболевания или достижение стойкой ремиссии при хронической патологии (Сепиашвили Р.И., 1999). В последние годы показано, что не существует практически ни одного заболевания, при котором не проявлялись бы дисфункции иммунной системы (Черешнев В.А. и соавт., 1999), а различные формы иммунодефицитных состояний могут возникать как при воздействии стресса или внешней среды так и при работе на вредном производстве (Ковальчук Л.В., Пинегин Б.В., 1999; Ожерелков С.В. и соавт., 1985; Петрова С.М. и соавт., 1999; Andriesh L.P. et al., 1994; Aripova T.U. et al., 1994; Bochanovsky V.A. et al., 1994; Khomyakov Y.N. et al., 1994; Sata F. et al., 1997; Vorobyev A.A. et al., 1994; Zaitseva I.A., 1994). Эти факты делают проблему иммунореабилитации еще более важной.

Необходимо учитывать, что обязательным этапом иммунореабилитационных мероприятий является санаторно-курортное лечение с применением немедикаментозных методов иммунокоррекции, а именно курортных и преформированных физических факторов. При этом одним из важных курортных факторов являются питьевые минеральные воды, которые используются в терапии весьма широкого спектра заболеваний.

Литературные данные свидетельствуют, что различные питьевые минеральные воды обладают иммуномодулирующим действием (Дзвонковский Т.М. и соавт., 1990; Середюк Н.Н., 1978; Бобров Л.Л. и соавт., 1999).

В то же время применение питьевых минеральных вод (МВ) вызывает системную реакцию, которая включает в себя активацию гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси и симпатико-адреналовой системы (Кулиев А.Х. и соавт., 1982; Полушкина Н.Д. и соавт., 1994; 1996). Поскольку вышеописанные сдвиги являются типичными для стресс-реакции (Селье Г., 1960; 1977; Cannon W.B., 1935; Kvetnansky R.

et al., 1995; Munck A. et al., 1984), можно констатировать, что прием МВ является стрессорным фактором. Однако в доступной нам литературе мы не обнаружили сведений о влиянии МВ на чувствительность организма к стрессорам.

В последние годы из скважины 4638, расположенной на территории санатория "Урал" (с. Хомутинино Челябинской области), была получена минеральная вода, оценка биологической активности которой ранее не проводилась. Учитывая это, мы сочли актуальным провести изучение состояния иммунной системы и стрессорной реактивности на фоне применения данной МВ.

Цель исследования Изучить влияние гидрокарбонатно-хлоридной натриевой минеральной воды "Уралочка" на состояние иммунной системы и стресс-реактивность животных.

Задачи исследования

1. Оценить характер действия минеральной воды "Уралочка" на иммунную систему крыс.
2. Исследовать влияние минеральной воды "Уралочка" на систему крови.
3. Изучить воздействие минеральной воды "Уралочка" на некоторые биохимические показатели и уровень электролитов.
4. Оценить влияние минеральной воды "Уралочка" на чувствительность организма крыс к стрессорному воздействию.

Научная новизна Установлено, что двухнедельный прием гидрокарбонатно-хлоридной натриевой минеральной воды "Уралочка" оказывает благоприятное воздействие на состояние иммунной системы. Это выражается в стимуляции гуморального иммунного ответа на эритроциты барана и активации фагоцитарной способности перitoneальных макрофагов.

Показано, что использование минеральной воды "Уралочка" не оказывает негативного воздействия на биохимические показатели и функции почек экспериментальных животных.

Впервые продемонстрировано, что курсовое применение минеральной воды "Уралочка" вызывает снижение чувствительности организма крыс к действию стрессорного фактора. Установлено, что минеральная вода отменяет развитие гематологических проявлений стрес-

са, постстрессорной депрессии клеточного иммунного ответа и предотвращает сокращение числа клеток в брюшной полости после однократного плавания в холодной воде. Показано, что иммуностимулирующее действие минеральной воды на гуморальный иммунный ответ и фагоцитарную способность перитонеальных макрофагов сохранялось и в случае сочетанного влияния стресса и минеральной воды "Уралочка".

Теоретическая и практическая значимость работы

Установлено, что гидрокарбонатно-хлоридная натриевая минеральная вода "Уралочка" обладает иммуностимулирующим действием и снижает стресс-реактивность. Полученные данные могут быть полезными при разработке алгоритмов применения указанной минеральной воды в терапевтических целях. Материалы работы используются в практике работы санатория "Урал", Областного центра реабилитации пострадавших от радиации и городской клинической больницы № 10 г. Челябинска.

Апробация работы Основные положения работы были доложены на Российской конференции "Дни иммунологии в Санкт-Петербурге'99" (Санкт-Петербург, 1999), Международном конгрессе "Курортология, физиотерапия, восстановительная медицина XXI века" (Пермь, 2000), XIV Российской конференции "Факторы клеточного и гуморального иммунитета при различных физиологических и патологических состояниях" (Челябинск, 2000), I Всероссийской научно-практической конференции "Безопасность жизнедеятельности на пороге третьего тысячелетия" (Челябинск, 2000) и на совместном заседании кафедры микробиологии и иммунологического отдела ЦНИЛ Челябинской государственной медицинской академии.

Положения выносимые на защиту

1. Двухнедельный курс гидрокарбонатно-хлоридной натриевой минеральной воды "Уралочка" стимулирует гуморальный иммунный ответ и фагоцитарную способность перитонеальных макрофагов.
2. Минеральная вода "Уралочка" не изменяет биохимические параметры и не оказывает негативного влияния на функции почек.
3. Курсовое использование минеральной воды "Уралочка" снижает стресс-реактивность организма крыс. При этом иммуностимулирую-

щее действие минеральной воды на гуморальный иммунный ответ и фагоцитарную способность перитонеальных макрофагов сохранялось и в случае сочетанного влияния стресса и минеральной воды "Уралочка".

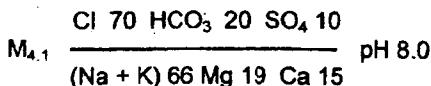
Публикации По теме диссертации опубликовано 4 печатных работы.

Объём и структура диссертации Диссертационная работа изложена на 124 страницах печатного текста и состоит из введения, обзора литературы, характеристики материала и методов исследования, трех глав собственных исследований, заключения, выводов, списка литературы и приложения. Диссертация иллюстрирована 15 таблицами и 13 рисунками. Список литературы содержит 216 источников, из которых 131 опубликован в отечественных и 85 в зарубежных изданиях.

Материалы и методы исследования

Исследование выполнено на 349 крысах самцах линии Вистар массой 190 - 300 г, полученных из питомника лабораторных животных РАМН "Рапполово". Животных содержали в пластмассовых клетках на стандартном пищевом рационе при свободном доступе к воде. В соответствии с общепринятыми этическими нормами все болезненные манипуляции проводили под эфирным наркозом.

В работе была использована минеральная вода (МВ) скважины 4638, расположенной на территории санатория "Урал" (с. Хомутинино Челябинской области), называемая в дальнейшем минеральная вода "Уралочка". Согласно заключению Екатеринбургского Медицинского научного центра профилактики и охраны здоровья рабочих промпредприятий от 28 апреля 1998 года в основном ионном составе воды преvalируют хлорид-, гидрокарбонат- ионы и катионы натрия, что позволяет классифицировать МВ "Уралочка" как гидрокарбонатно-хлоридную натриевую. Минерализация воды составляет 4.13 г/дм³. Основной химический состав воды описывается следующей формулой:



Согласно ГОСТ 13273-88 "Воды минеральные питьевые лечебные и лечебно-столовые" МВ "Уралочка" относится к XXIII группе гидрокарбонатно-хлоридных натриевых вод и по химическому составу наиболее близка к минеральным водам типа "Айвазовский". Рассматриваемая вода в качестве лечебно-столовой показана при лечении хронических гастритов, язвенной болезни желудка и 12-перстной кишки, хронических колитов и энтероколитов, хронических заболеваний печени и желчевыводящих путей, хронических панкреатитов, болезней обмена веществ, хронических заболеваний мочевыводящих путей и железодефицитных анемий. Крысы опытных групп получали МВ "Уралочка" *ad libitum* в качестве питьевой в течение 14 суток. Контрольные животные пили водопроводную воду, которую предварительно отстаивали в течение суток.

Отдельные группы животных подвергали действию стресса. В качестве стрессирующего воздействия использовали однократное плавание в течение десяти минут при температуре 16 – 17⁰ С. Стressирование проводили за сутки либо до иммунизации животных, либо до определения активности макрофагов и состояния системы крови.

Объектами исследования являлись кровь и кроётворные органы (тимус, селезенка, костный мозг - КМ).

Гематологические методы Исследовали состояние периферической крови, тимуса, селезенки и КМ. Общепринятыми методами определяли уровень гемоглобина, гематокрита, количество лейкоцитов, эритроцитов, спленокариоцитов и число ядросодержащих клеток (ЯСК) в тимусе и КМ, а также изучали состав клеток крови, селезенки и КМ (Горизонтов П.Д. и соавт., 1983; Лабораторные методы..., 1987).

Иммунологические методы Гуморальный иммунный ответ оценивали по числу антителообразующих клеток (АОК) в селезенке животных после иммунизации эритроцитами барана (ЭБ) (Jerne N.K., Nordin A.A., 1963; Cunningham A.J., 1965). Для оценки клеточного иммунного ответа применялось изучение интенсивности реакции повышенной чувствительности замедленного типа (ПЧЗТ) (Langrade P.H. et al., 1974, 1980).

Функциональную активность фагоцитирующих клеток исследовали по способности к поглощению частиц латекса и показателям НСТ-теста (Долгушин И.И. и соавт., 1992; Маянский А.Н. и соавт., 1977; Park B.N. et al., 1968). Активность лизоцима оценивали по способности сыворотки крови лизировать *Micrococcus lysodeicticus* (Бухарин О.В., Ва-

сильев Н.В., 1974). Уровень комплемента определяли методом титрования по 50% гемолизу (Резникова Л.С., 1967). Содержание циркулирующих иммунных комплексов в сыворотке крови определяли общепринятым методом (Медицинские лабораторные..., 1999).

Биохимические методы исследования Все эксперименты проводили с сывороткой крови крыс. Общий белок определяли рефрактометрически на рефрактометре "RZ-2" (Польша) (Лабораторные методы..., 1987). Содержание холестерина, триглицеридов, железа, общую железосвязывающую способность сыворотки крови, альбуминов в сыворотке крови определяли с помощью наборов фирмы "Olvez Diagnosticum" (г. Санкт-Петербург). Уровень глюкозы оценивали глюкозоксидазным методом с помощью прибора "Эксан-Г" (ЛитССР). Концентрацию креатинина определяли с помощью набора "LaChema" (Чехия). Содержание микроэлементов изучали методом атомно-абсорбционной спектрофотометрии на анализаторе "AAC-1" (Карл Цейс Йена, ГДР). Уровень общего кальция определяли по эмиссии в пропанововоздушном пламени. Концентрацию меди, цинка и магния определяли по абсорбционному способу (Хавезов И. и соавт., 1983).

Статистическая обработка результатов Результаты исследований обработаны методами вариационной статистики (Гублер Е.В., 1978; Лакин Г.Ф., 1990). Оценка достоверности различий осуществлялась при помощи параметрических (критерий Стьюдента) и непараметрических (критерии Вилкоксона-Манна-Уитни, Колмогорова-Смирнова, точный критерий Фишера) методов статистического анализа.

Результаты исследования

На первом этапе работы была проведена оценка состояния различных звеньев ИС крыс на фоне употребления гидрокарбонатно-хлоридной натриевой МВ "Уралочка". При проведении подобных исследований рекомендуется изучить воздействие исследуемых соединений на различные компоненты ИС (Николаев А.И. и соавт., 1984; Утешев Б.С., 1984). В соответствии с этим подходом работа включала в себя: а) определение интенсивности клеточного (T_{H1} -зависимого) и гуморального (T_{H2} -зависимого) иммунного ответа на эритроциты барана; б) исследование функциональной активности перитонеальных макрофагов (ПМф) по способности к фагоцитозу частиц латекса и восстановлению нитросинего тетразолия; в) изучение активности лизоцима, комплемента и уровня циркулирующих иммунных комплексов в сыво-

ротке крови.

Курсовое применение МВ "Уралочка" не изменило интенсивности реакции ПЧЗТ (таблица 1). Противоположная ситуация была отмечена при изучении количества АОК после иммунизации крыс эритроцитами барабана на фоне употребления МВ (таблица 1). Минеральная вода вызвала увеличение абсолютного числа АОК (в расчете на селезенку) на 95.96% по сравнению с контрольной группой. При этом обращает на себя внимание тот факт, что одновременно статистически достоверно возросло (на 45.5%) и относительное количество АОК (в расчете на миллион спленокардиоцитов).

В то же время количество кардиоцитов в селезенке иммунизированных животных несколько повысилось, однако разница с контролем не достигла статистически значимого уровня. В связи с этим можно предположить, что курсовое употребление МВ способствует повышению эффективности кооперации иммунокомпетентных клеток при формировании гуморального иммунного ответа.

Таблица 1.
Влияние минеральной воды на интенсивность клеточного и гуморального иммунного ответа

Показатель	Контроль	Опыт	P
Интенсивность ПЧЗТ ($\text{см}^3 \times 10^{-1}$)	3.375 ± 0.233 n = 10	3.85 ± 0.211 n = 10	> 0.05
Число АОК / 10^6 спленокардиоцитов	717.44 ± 128.82 n = 11	1043.72 ± 103.12 n = 11	= 0.018 TKF
Число АОК /на селезенку ($\times 10^3$)	309.21 ± 43.94 n = 11	605.62 ± 86.31 n = 11	< 0.01 t
Количество спленокардиоцитов ($\times 10^6$)	472.28 ± 38.44 n = 11	634.72 ± 101.7 n = 11	> 0.05

Примечания к таблице 1.: 1) n – число животных в группе; 2) при расчете достоверности различий с контролем использован критерий Стьюдента (t) и точный критерий Фишера (TKF).

Учитывая важную роль, которую играют фагоцитирующие клетки в поддержании иммунологического гомеостаза (Фрейдлин И.С., 1984), мы сочли необходимым оценить влияние МВ "Уралочка" на перитонеальные макрофаги (ПМф). С этой целью мы исследовали фагоцитоз

микросфер латекса и активность кислородзависимого метаболизма ПМф после курсового применения МВ.

Минеральная вода оказала стимулирующее воздействие на способность ПМф поглощать чужеродные частицы. Как видно из таблицы 2, активность фагоцитоза возросла в опытной группе на 48.27% относительно контроля, а интенсивность фагоцитоза увеличилась в 1.62 раза. Таким образом, двухнедельное применение МВ увеличивает как количество макрофагов, вступивших в процесс фагоцитоза, так и число частиц, поглощенных одной клеткой.

В тоже время способность макрофагов к инактивации фагоцитированных объектов не изменилась на фоне использования МВ "Уралочка". Об этом свидетельствует тот факт, что активность и интенсивность спонтанного НСТ-теста в контрольной и опытной группах не отличаются друг от друга (таблица 2).

Таблица 2.
Влияние минеральной воды на функциональную активность перитонеальных макрофагов

Показатель	Контроль	Опыт	P
Активность фагоцитоза (%)	24.26 ± 1.69 n = 9	35.97 ± 2.08 n = 8	< 0.001 t
Интенсивность фагоцитоза (у.е.)	30.39 ± 2.43 n = 9	49.27 ± 3.91 n = 8	< 0.001 t
Активность спонтанного НСТ-теста (%)	64.39 ± 5.46 n = 9	62.55 ± 6.38 n = 8	> 0.05
Интенсивность спонтанного НСТ-теста (у.е.)	72.92 ± 6.67 n = 9	75.47 ± 10.72 n = 8	> 0.05
Активность индуцированного НСТ-теста (%)	78.51 ± 5.26 n = 9	76.83 ± 4.63 n = 8	> 0.05
Интенсивность индуцированного НСТ-теста (у.е.)	100.14 ± 7.44 n = 9	99.52 ± 9.49 n = 8	> 0.05

Примечания к таблицам 2. и 3.: n - число животных в группе.

Показатели индуцированного НСТ-теста ПМф (активность и интенсивность) в контрольной и опытной группах также не отличаются друг от друга. Это свидетельствует, что после употребления МВ мак-

рофаги сохраняют способность адекватно реагировать на дополнительные стимулы.

Хорошо известно, что в неспецифических защитных реакциях важную роль играют и гуморальные факторы. Так, система комплемента обеспечивает формирование мембраноатакующего комплекса, способствует стимуляции иммунокомпетентных клеток, обладает опсонизирующим и хемоаттрактантным действием. В свою очередь, лизоцим повреждает клеточную стенку грамположительных микроорганизмов, оказывает опсонизирующий эффект. Учитывая это, мы определили активность комплемента и содержание лизоцима в сыворотке крови крыс, получавших МВ "Уралочка". Поскольку употребление МВ способствует активации антителогенеза, мы также обратили внимание на уровень циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК). Полученные данные представлены в таблице 3.

**Таблица 3.
Влияние минеральной воды на активность комплемента, лизоцима и содержание циркулирующих иммунных комплексов в сыворотке крови крыс**

Показатель	Контроль <i>n</i> = 11	Опыт <i>n</i> = 11	<i>P</i>
Комплемент (CH50)	69.45 ± 4.67	63.55 ± 3.66	> 0.05
Лизоцим (мг/мл)	2.44 ± 0.22	2.05 ± 0.23	> 0.05
ЦИК (у.е.)	76.09 ± 15.12	93.91 ± 19.61	> 0.05

Уровень лизоцима и комплемента не претерпел достоверных изменений. Концентрация ЦИК проявила тенденцию к увеличению, которая, однако, не достигла статистически значимого уровня.

Учитывая, что иммунная система тесно связана с системой крови, нервной и эндокринной системами, мы сочли целесообразным изучить влияние МВ на состояние системы крови и некоторые биохимические показатели. На этом этапе оценивали массы тимуса и селезенки, количество ядросодержащих клеток (ЯСК) в тимусе, костном мозге (КМ) и периферической крови, а также определяли состав клеток в КМ и периферической крови.

Двухнедельное применение МВ "Уралочка" не оказалось влияния на массу тимуса и тимический индекс. Количество ЯСК в вилочковой

железе проявляло тенденцию к некоторому увеличению (таблица 4.). Иная картина отмечена при изучении селезенки. Масса этого лимфоидного органа снизилась на 21.3% относительно контроля. Селезеночный индекс уменьшился в 1.22 раза (таблица 4.). Эти сдвиги напоминают изменения, которые отмечались в селезенке при действии стрессорных агентов (Горизонтов П.Д. и соавт., 1983). Обращает на себя внимание тот факт, что стресс-реакция сопровождалась достоверным снижением количества спленокариоцитов. Однако в наших экспериментах число кариоцитов в селезенке, хотя и несколько сократилось, недостоверно отличалось от контрольной группы.

Таблица 4.

Влияние минеральной воды на массу крыс, тимус и селезенку

Показатель	Контроль n = 11	Опыт n = 10	P
Масса крыс (г)	281.09 ± 10.04	269.30 ± 9.61	> 0.05
Масса тимуса (мг)	218.27 ± 16.76	209.60 ± 12.93	> 0.05
Тимический индекс (мг/г)	0.786 ± 0.069	0.786 ± 0.051	> 0.05
Число кариоцитов в тимусе ($\times 10^6$)	206.73 ± 23.09	235.80 ± 42.54	> 0.05
Масса селезенки (мг)	1081.64 ± 58.55	851.70 ± 28.01	< 0.01 t
Селезеночный индекс (мг/г)	3.891 ± 0.267	3.190 ± 0.128	< 0.05 t
Число кариоцитов в селезенке ($\times 10^6$)	751.89 ± 65.11	658.97 ± 36.60	> 0.05

Примечания к таблицам 4. и 5.: а) n – число животных в группе; б) при определении достоверности различий с контролем использованы критерий Стьюдента (t), точный критерий Фишера (TKF), критерий Вилкоксона-Манна-Уитни (U) и критерий Колмогорова-Смирнова (λ).

На следующем этапе изучали состояние периферической крови после двухнедельного применения МВ "Уралочка". Полученные результаты свидетельствуют, что такие показатели красной крови как число эритроцитов, уровень гемоглобина и гематокрита не отличались от контрольной группы.

При оценке количества лейкоцитов было обнаружено, что исполь-

зование МВ сопровождается достоверным снижением этого показателя на 22.5% относительно контрольной группы (таблица 5.). Изучение лейкоцитарной формулы показало, что уменьшение количества циркулирующих лейкоцитов связано с падением числа нейтрофильных гранулоцитов, поскольку относительное и абсолютное содержание моноцитов, эозинофилов и лимфоцитов в опытной и контрольной группах оставалось на одном уровне (таблица 5.).

Таблица 5.
Влияние минеральной воды на состав лейкоцитов периферической крови

Показатель	Контроль n = 11	Опыт n = 10	P
Количество лейкоцитов ($\times 10^9/\text{л}$)	11.52 ± 0.70 n = 11	10.08 ± 1.22 n = 10	< 0.05 λ
Палочкоядерные нейтрофилы (%)	2.97 ± 0.56	3.51 ± 0.91	> 0.05
Палочкоядерные нейтрофилы ($\times 10^9/\text{л}$)	0.324 ± 0.050	0.416 ± 0.148	> 0.05
Сегментоядерные нейтрофилы (%)	13.03 ± 2.91	7.69 ± 0.75	< 0.05 U
Сегментоядерные нейтрофилы ($\times 10^9/\text{л}$)	1.618 ± 0.512	0.791 ± 0.153	< 0.05 U
Общее число нейтрофилов (%)	16.01 ± 2.86	11.22 ± 1.04	< 0.05 U
Общее число нейтрофилов ($\times 10^9/\text{л}$)	1.941 ± 0.510	1.208 ± 0.267	< 0.05 U
Моноциты (%)	2.45 ± 0.56	1.57 ± 0.26	> 0.05
Моноциты ($\times 10^9/\text{л}$)	0.285 ± 0.063	0.158 ± 0.031	> 0.05
Эозинофилы (%)	1.03 ± 0.60	1.14 ± 0.51	> 0.05
Эозинофилы ($\times 10^9/\text{л}$)	0.119 ± 0.070	0.093 ± 0.040	> 0.05
Лимфоциты (%)	80.51 ± 2.91	86.10 ± 1.07	> 0.05
Лимфоциты ($\times 10^9/\text{л}$)	9.17 ± 0.49	8.62 ± 0.97	> 0.05

При этом число палочкоядерных нейтрофилов не отличалось от контроля, а процентное содержание сегментоядерных нейтрофилов уменьшилось на 41%. Аналогичные изменения произошли и с або-

лютным количеством нейтрофильных гранулоцитов.

При выполнении этой серии экспериментов мы исследовали различные параметры обмена веществ. Углеводный обмен оценивали по уровню глюкозы в сыворотке крови, белковый – по содержанию общего белка и альбуминов, липидный – по концентрации холестерина и триглицеридов. Учитывая двухнедельный прием минеральной воды, мы определяли в сыворотке крови уровень кальция, магния, меди, цинка и железа, а также исследовали железосвязывающую способность сыворотки крови. Все указанные параметры у животных, получавших МВ "Уралочка", не отличались от таковых в контрольной группе (таблица 6.).

Таблица 6.
Влияние минеральной воды на некоторые биохимические показатели

Показатель	Контроль n = 10	Опыт n = 11 (кроме креатинина)	P
Глюкоза (мМ/л)	7.82 ± 0.29	7.83 ± 0.19	> 0.05
Общий белок (г/л)	72.78 ± 1.14	74.50 ± 1.0	> 0.05
Альбумин (г/л)	32.38 ± 1.29	32.51 ± 0.83	> 0.05
Холестерин (мМ/л)	1.361 ± 0.135	1.555 ± 0.097	> 0.05
Триглицериды (мМ/л)	0.894 ± 0.111	1.14 ± 0.14	> 0.05
Креатинин (мкМ/л)	54.60 ± 3.44	50.69 ± 3.29 n = 9	> 0.05
Железо (мкМ/л)	30.35 ± 1.39	28.53 ± 2.07	> 0.05
Железосвязывающая способность сыворотки крови (мкМ/л)	52.70 ± 5.52	52.86 ± 6.51	> 0.05
Кальций (мг/дл)	5.27 ± 0.40	5.80 ± 0.33	> 0.05
Магний (мг/дл)	2.47 ± 0.04	2.45 ± 0.03	> 0.05
Медь (мкг/дл)	181.77 ± 23.88	186.45 ± 14.56	> 0.05
Цинк (мкг/дл)	114.86 ± 13.58	122.32 ± 13.53	> 0.05

Отдельно хотелось бы остановиться на уровне креатинина в сыворотке крови крыс. Известно, что этот показатель зависит от состояния фильтрационной функции почек (Мухин Н.А. и соавт., 1983). По-

скольку концентрация креатинина сохранялась на уровне контроля (таблица 6.), можно говорить об отсутствии отрицательного влияния даже длительного приема МВ "Уралочка" на работу почек.

Полученные нами данные свидетельствуют, что двухнедельный курс минеральной воды "Уралочка" не изменяет биохимические параметры у подопытных животных.

Согласно данным литературы, применение питьевых минеральных вод вызывает системную реакцию, которая включает в себя активацию гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси и симпатико-адреналовой системы (Кулиев А.Х. и соавт., 1982; Полушкина Н.Д. и соавт., 1994; 1996). Поскольку вышеописанные сдвиги являются типичными для стресс-реакции (Селье Г., 1960; 1977; Cannon W.B., 1935; Kvetnansky R. et al., 1995; Munck A. et al., 1984), можно констатировать, что прием МВ является стрессорным фактором. Однако в доступной нам литературе мы не обнаружили сведений о влиянии МВ на чувствительность организма к стрессорам. В связи с этим на следующем этапе работы мы изучали стресс-реактивность крыс на фоне применения минеральной воды "Уралочка". Стрессирование животных производили за сутки до иммунизации животных либо за сутки до забоя при оценке состояния системы крови, биохимических показателей и функциональной активности перитонеальных макрофагов.

Полученные данные свидетельствуют, что после стрессирования количество лейкоцитов имело статистически недостоверную тенденцию к небольшому снижению (таблица 7.).

Обращает на себя внимание тот факт, что стрессирование вызвало статистически достоверный прирост содержания как палочкоядерных, так и сегментоядерных нейтрофилов. Кроме того, в крови стрессированных животных снизилось количество лимфоцитов (относительное – на 16.5%, а абсолютное – на 23% по сравнению с контрольной группой) (таблица 7.). Таким образом, плавание сопровождалось развитием нейтрофилеза и лимфопении. Указанные сдвиги являются типичными гематологическими проявлениями стресс-реакции (Горизонтов П.Д. и соавт., 1983; Волчегорский И.А. и соавт., 2000).

Двухнедельное употребление МВ "Уралочка" резко снизило чувствительность крыс к действию стрессорного агента. Этот эффект четко проявился при изучении состава лейкоцитов. В группе "стресс + МВ" по сравнению с группой "стресс" достоверно снизилось количество нейтрофилов (как палочкоядерных, так и сегментоядерных), и возросло

число лимфоцитов (таблица 7.). Таким образом, МВ отменила развитие гематологических проявлений стресс-реакции.

Таблица 7.

Влияние стресса и минеральной воды на количественный и качественный состав лейкоцитов периферической крови

Показатель	"Контроль" Группа 1 $n = 11$	"Стресс" Группа 2 $P (1-2)$ $n = 10$	"Стресс + МВ" Группа 3 $P (2-3)$ $n = 11$
Количество лейкоцитов ($\times 10^9/\text{л}$)	11.52 ± 0.70	10.73 ± 1.04 $P > 0.05$	9.49 ± 1.28 $P > 0.05$
Палочкоядерные нейтрофилы (%)	2.97 ± 0.56	5.71 ± 0.89 $P = 0.015, U$	3.38 ± 0.56 $P < 0.05, U$
Палочкоядерные нейтрофилы ($\times 10^9/\text{л}$)	0.324 ± 0.050	0.654 ± 0.144 $P = 0.029, U$	0.295 ± 0.046 $P < 0.05, U$
Сегментоядерные нейтрофилы (%)	13.03 ± 2.91	23.86 ± 3.94 $P = 0.038, U$	10.44 ± 1.66 $P < 0.01, U$
Сегментоядерные нейтрофилы ($\times 10^9/\text{л}$)	1.618 ± 0.512	2.74 ± 0.66 $P > 0.05$	0.967 ± 0.208 $P < 0.01, U$
Моноциты (%)	2.45 ± 0.56	2.00 ± 0.70 $P > 0.05$	2.15 ± 0.73 $P > 0.05$
Моноциты ($\times 10^9/\text{л}$)	0.285 ± 0.063	0.21 ± 0.073 $P > 0.05$	0.218 ± 0.084 $P > 0.05$
Эозинофилы (%)	1.03 ± 0.60	1.20 ± 0.36 $P > 0.05$	1.23 ± 0.65 $P > 0.05$
Эозинофилы ($\times 10^9/\text{л}$)	0.119 ± 0.070	0.122 ± 0.037 $P > 0.05$	0.072 ± 0.036 $P > 0.05$
Лимфоциты (%)	80.51 ± 2.91	67.23 ± 3.48 $P = 0.007 U$	82.80 ± 1.80 $P < 0.01 U$
Лимфоциты ($\times 10^9/\text{л}$)	9.17 ± 0.49	7.06 ± 0.53 $P = 0.012 U$	7.93 ± 1.13 $P > 0.05$

Весьма интересным было влияние десятиминутного плавания в холодной воде на выраженность специфического иммунного ответа. Полученные данные свидетельствуют, что стрессирование за сутки до

иммунизации эритроцитами барана вызвало достоверное повышение содержания АОК в селезенке животных. Относительное количество АОК (в расчете на миллион спленокариоцитов) увеличилось в 1.68 раза, а абсолютное (в расчете на весь орган) повысилось в 1.98 раза (таблица 8). Интенсивность клеточного иммунного ответа претерпела обратную динамику: после стрессирования показатель интенсивности ПЧЗТ уменьшился на 31.1% (таблица 8.).

Таблица 8.
Влияние стресса и минеральной воды на интенсивность иммунного ответа

Показатель	"Контроль" Группа 1	"Стресс" Группа 2 P (1-2)	"Стресс + во- да" Группа 3
Интенсивность ПЧЗТ ($\text{cm}^3 \times 10^{-1}$)	3.375 ± 0.233 n = 10	2.325 ± 0.233 n = 10 P < 0.01, U	4.150 ± 0.198 n = 10 P(2-3) < 0.01, U
Число АОК / 10^6 спленокариоцитов	717.44 ± 128.82 n = 11	1205.73 ± 229.58 n = 11 P < 0.05, TKF	1174.62 ± 121.68 n = 11 P (2-3) > 0.05 P (1-3) < 0.05, t
Число АОК /на селе- зенку ($\times 10^3$)	309.21 ± 43.94 n = 11	611.20 ± 91.63 n = 11 P < 0.01, t	716.90 ± 73.14 n = 11 P (2-3) > 0.05 P(1-3) < 0.001, t

Примечания к таблице 8.: 1) n – число животных в группе; 2) при определении достоверности различий между группами использован критерий Стьюдента (t), точный критерий Фишера (TKF) и критерий Вилкоксона-Манна-Уитни (U).

Разнонаправленность постстрессорных сдвигов в выраженности гуморального и клеточного иммунного ответа может быть связана с особенностями иммунокомпетентных клеток, участвующих в развитии различных форм реакции иммунной системы на антиген. Согласно данным литературы, стрессорные гормоны способны подавлять клеточные формы иммунного ответа и стимулировать антителопродукцию. Глюкокортикоидные гормоны и катехоламины подавляют образование

интерлейкинов 2, 12 и интерферона- γ и параллельно усиливают синтез интерлейкина-4 (Madden K.S. et al., 1995; Webster E.L. et al., 1998; Wilder R.L., 1998).

Использование МВ "Уралочка" значительно изменило реакцию иммунной системы подопытных животных на воздействие стресса. Интенсивность реакции ПЧЗТ у крыс, стрессированных на фоне применения МВ, достоверно повысилась на 78.5% по сравнению с группой "стресс" (таблица 8). Таким образом, двухнедельный курс МВ отменяет постстрессорное подавление клеточного иммунного ответа. Обращает на себя внимание выраженность иммуностимулирующего эффекта МВ "Уралочка" в случае действия стрессорного фактора за сутки до иммунизации животных. Уместно отметить, что минеральная вода сама по себе вызывала лишь тенденцию к возрастанию показателя интенсивности ПЧЗТ. В условиях сочетанного влияния стресса и МВ "Уралочка" интенсивность клеточного иммунного ответа увеличивалась в 1.22 раза по сравнению с контролем, при этом изменения были статистически достоверными ($p = 0.021$, t). Следовательно, минеральная вода не только отменяет развитие постстрессорной иммуносупрессии, но также вызывает иммуностимуляцию.

Что касается гуморального иммунного ответа, здесь была зарегистрирована другая ситуация. В случае стрессирования животных, получавших МВ "Уралочка", относительное и абсолютное количество АОК не отличалось от данных показателей в группе "стресс" и было достоверно выше, чем в контроле (таблица 8.). Мы полагаем, что отсутствие антистрессорного эффекта в данном случае обусловлено односторонностью иммунотропного действия десятиминутного плавания в холодной воде и употребления минеральной воды: оба воздействия вызывали интенсификацию гуморального иммунного ответа.

Изучив влияние стресс-реакции и МВ "Уралочка" на специфический иммунный ответ, мы оценили состояние факторов неспецифической резистентности организма при стрессировании крыс. Полученные данные свидетельствуют, что однократное плавание в холодной воде не изменило активность фагоцитоза частиц латекса перитонеальными макрофагами и достоверно увеличило интенсивность фагоцитоза (таблица 9.). При сочетанном влиянии стресса и минеральной воды стимуляция фагоцитоза стала еще более выраженной. В группе "стресс + МВ" активность фагоцитоза увеличилась на 24.4% по сравнению с группой "стресс" и на 33.6% относительно контроля. Интенсивность

фагоцитоза возросла в 1.25 раза и 1.54 раза соответственно. Все указанные сдвиги были статистически достоверными. Обращает на себя внимание тот факт, что МВ "Уралочка" сама по себе также стимулировала способность перитонеальных макрофагов поглощать чужеродные частицы.

Таблица 9.

Влияние стресса и минеральной воды на способность перитонеальных макрофагов к фагоцитозу и количество клеток в перитонеальной полости

Показатель	"Контроль" Группа 1	"Стресс" Группа 2 $P (1-2)$	"Стресс + вода" Группа 3
Активность фагоцитоза (%)	24.26 ± 1.69 $n = 9$	26.07 ± 2.61 $n = 9$ $P > 0.05$	32.42 ± 2.10 $n = 9$ $P (2-3) > 0.05$
Интенсивность фагоцитоза (y.e.)	30.39 ± 2.43 $n = 9$	37.22 ± 3.37 $n = 9$ $P < 0.05, U$	46.84 ± 4.94 $n = 9$ $P(2-3) < 0.05, TKF$ $P(1-3) < 0.01, U$
Число ЯСК в перitoneальной полости ($\times 10^6$)	21.75 ± 2.36 $n = 9$	14.58 ± 2.40 $n = 9$ $P < 0.05, t$	25.00 ± 3.05 $n = 9$ $P(2-3) = 0.016, t$

При изучении перitoneальных макрофагов мы проводили подсчет клеток, содержащихся в брюшной полости крыс. Однократное плавание в холодной воде сопровождалось снижением числа клеток в брюшной полости на 33% по сравнению с контрольной группой (таблица 9.). Наши наблюдения хорошо согласуются с результатами Шишкиной Л.Н. и соавт. (1989), которые продемонстрировали уменьшение числа перitoneальных макрофагов после фармакологического стресса (то есть введения глюкокортикоидного препарата кеналога) с накоплением макрофагов в бронхоальвеолярном пространстве. Авторы считают, что причиной такого перераспределения клеток является направленная миграция фагоцитов в бронхоальвеолярное пространство.

При стрессировании животных, получавших МВ "Уралочка", содержание клеток в перitoneальной полости статистически достоверно

возросло на 71.5% по сравнению с группой "стресс" и достигло уровня контрольной группы (таблица 9.). Мы полагаем, что данный факт свидетельствует о снижении чувствительности к стрессорным воздействиям после двухнедельного применения минеральной воды "Уралочка".

Отдельно хотелось бы остановиться на механизмах иммуностимулирующего действия минеральной воды. Как уже отмечалось ранее, питьевые минеральные воды способны вызывать развитие стрессорных реакций, о чем свидетельствует активация гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси и симпатико-адреналовой системы, а также типичные для стресса сдвиги в составе клеток периферической крови и показателях обмена веществ. Известно, что действие стрессорных агентов индуцирует адаптационные процессы. При этом сначала на основе ранее сформировавшихся механизмов развивается срочная адаптация. Затем на основе многократно повторяющейся срочной адаптации развивается долговременная адаптация, то есть происходит образование адаптационных систем и их фиксация. Важно отметить, что при развитии долговременной адаптации, как правило, наблюдаются защитные перекрестные эффекты, то есть адаптация к одному агенту сопровождается повышением устойчивости к действию других факторов.

Мы полагаем, что иммунотропное действие курсового применения минеральной воды "Уралочка" можно рассматривать как проявление защитного перекрестного эффекта адаптации.

Это мнение подтверждается тем фактом, что двухнедельное использование минеральной воды вызывает снижение чувствительности крыс к такому стрессору, как десятиминутное плавание в холодной воде. Данный феномен также свидетельствует о формировании защитных перекрестных эффектов адаптации.

Хотелось бы обратить внимание и на определенную аналогию полученных нами данных и результатов предварительной адаптации к периодическому действию гипоксии. Так, по данным Смолягина А.И. (1997), адаптация к гипоксии сопровождалась стимуляцией именно В-звена иммунитета. В случае применения минеральной воды мы также зафиксировали активизацию гуморального иммунного ответа.

Наше мнение хорошо согласуется с литературными данными. Картазаева В.А. (1994) подразделяла минеральные воды на сильные и слабые адаптогены. К сильным адаптогенам были отнесены МВ, содержащие ионы натрия, хлора и гидрокарбонатов. МВ, в которых также

содержатся ионы кальция, магния и сульфаты (а двухвалентные ионы преобладают над одновалентными) рассматривались как слабые адаптогены. По этой классификации гидрокарбонатно-хлоридная натриевая МВ "Уралочка" относится к сильным адаптогенам.

Согласно данным литературы, при действии стрессорных факторов отмечалась поликлональная активация именно В-звена иммунитета, которая может быть связана с влиянием бактериальных липополисахаридов (Фролов Б.А., 1987; Gisler R.H. 1971).

Гормоны, участвующие в развитии стресса – катехоламины и глюкокортикоиды, также могут активировать иммунную систему. Так, в физиологических концентрациях глюкокортикоидные гормоны необходимы для нормального функционирования иммунитета (Rogers M.P. , 1979). Глюкокортикоиды также могут стимулировать развитие иммунных реакций (Cooper D.A. 1979; Orson F.M. 1984). Иммуностимулирующее действие глюкокортикоидов может быть связано с депрессией функций супрессоров, тормозящих дифференцировку В-клеток в анти-телопродуценты (Raavonen T., 1985; Haynes B.F., 1979).

Уместно отметить, что связанные с формированием клеточного иммунного ответа Т-_{H1} способны синтезировать интерлейкин-2 и интерферон-γ, а обеспечивающие развитие гуморального иммунитета Т-хеллеры второго типа секretируют интерлейкины 4, 5 и 10 (Кетлинский С.А., 1999). Глюкокортикоидные гормоны и катехоламины способны подавлять образование интерлейкинов 2, 12 и интерферона-γ и параллельно усиливать синтез интерлейкина-4. Очевидно, в связи с этим стрессорные гормоны способны подавлять клеточные формы иммунного ответа и стимулировать выработку антител (Madden K.S. et al., 1995; Webster E.L. et al., 1998; Wilder R.L., 1998).

В свою очередь Марсов А.П. (1990) продемонстрировал, что курсовое применение минеральной воды курорта Усть-Качка тормозит формирование Т-супрессоров, что также может способствовать стимуляции гуморального иммунного ответа.

Питьевые минеральные воды способны изменять и уровень циркулирующих цитокинов. Бобров Л.Л. и соавт. (1999) показали, что при курсовом применении маломинерализованной хлоридной натриево-кальциевой минеральной воды Екатерингофская в сыворотке крови больных повышались уровни интерлейкина-1β и ФНО-α. В другой работе тех же авторов продемонстрировано, что при курсовом применении минеральной воды Екатерингофская через 20 - 23 дня от начала

лечения происходит значимое увеличение показателей фагоцитарной активности моноцитов. Уровень ФНО- α в сыворотке крови обследованных людей достоверно повысился по сравнению с исходными показателями. Выявлена положительная корреляция уровня ФНО- α с коэффициентом функциональной активности фагоцитов (Бобров Л.Л. и соавт., 1998). Представленные данные позволяют предположить, что описанное нами увеличение фагоцитарной способности перитонеальных макрофагов может быть связано с активацией синтеза интерлейкина-1 β и ФНО- α .

Таким образом, полученные данные наглядно свидетельствуют, что гидрокарбонатно-хлоридная натриевая минеральная вода "Уралочка" стимулирует гуморальный иммунный ответ, активирует фагоцитирующие клетки и снижает чувствительность к действию стрессорных агентов. Результаты, полученные при выполнении данного диссертационного исследования, могут быть использованы при терапевтическом применении минеральной воды "Уралочка".

Выводы

1. Двухнедельный прием гидрокарбонатно-хлоридной натриевой минеральной воды "Уралочка" стимулирует гуморальный иммунный ответ и способность перитонеальных макрофагов к фагоцитозу.
2. Минеральная вода "Уралочка" не изменяет интенсивности реакции повышенной чувствительности замедленного типа, показателей НСТ-теста перитонеальных макрофагов и активности комплемента и лизоцима в сыворотке крови.
3. Двухнедельный прием гидрокарбонатно-хлоридной натриевой минеральной воды "Уралочка" не изменяет изученных нами показателей углеводного, белкового, липидного и электролитного обмена и не оказывает отрицательного воздействия на функции почек.
4. Минеральная вода "Уралочка" снижает чувствительность крыс к действию стрессорного агента. Это проявляется в том, что использование минеральной воды отменило гематологические проявления стресса, постстрессорную депрессию клеточного иммунного ответа и предотвратило сокращение числа клеток в брюшной полости.
5. Имуностимулирующее действие минеральной воды на гуморальный иммунный ответ и фагоцитарную способность перитонеальных макрофагов сохранилось и в случае сочетанного влияния стресса и минеральной воды "Уралочка".

6. Иммуностимулирующее и антистрессорное действие гидрокарбонатно-хлоридной натриевой минеральной воды "Уралочка" необходимо учитывать при её терапевтическом использовании.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Долгушин И.И., Колесников О.Л., Селянина Г.А., Мезенцева Е.А. Влияние физической нагрузки на иммунный ответ // Медицинская иммунология. - 1999. - т. 1, № 3-4. - С. 12.
2. Долгушин И.И., Колесников О.Л., Селянина Г.А., Мезенцева Е.А. Воздействие минеральной воды "Уралочка" на органы иммунопозза // Факторы клеточного и гуморального иммунитета при различных физиологических и патологических состояниях. Тезисы докл. XIV Российской научной конф. – Челябинск: Южно-Уральское книжное издательство, 2000. – С. 34 – 35.
3. Селянина Г.А. Оценка влияния минеральной воды "Уралочка" на показатели периферической крови // Факторы клеточного и гуморального иммунитета при различных физиологических и патологических состояниях. Тезисы докл. XIV Российской научной конф. – Челябинск: Южно-Уральское книжное издательство, 2000. – С. 102 – 103.
4. Долгушин И.И., Колесников О.Л., Селянина Г.А., Мезенцева Е.А., Власов А.А. Оценка влияния гидрокарбонатно-хлоридной натриевой минеральной воды на иммунную систему крыс // Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры. – 2000. - № 4. – С. 13 – 14.

