

## SPELEOTERAPIE – PERSPECTIVE BIO-MEDICALE MODERNE

Constantin Munteanu<sup>1</sup>, Diana Munteanu<sup>1</sup>, Iuri Simionca<sup>2</sup>, Mihai Hoteteu<sup>1</sup>, Delia Cinteza<sup>3</sup>, Horia Lazarescu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>National Institute of Rehabilitation, Physical Medicine and Balneoclimatology INRMFB, Bdul Ion Mihalache, 11A, Bucharest, Romania, [secretar@bioclima.ro](mailto:secretar@bioclima.ro);

<sup>2</sup>Union Internationale de Spéléologie (UIS), Commission de speleotherapy,

<sup>3</sup>Romanian Association of Balneology, B-dul Ion Mihalache, 11A, Bucharest, Romania, [www.bioclima.ro](http://www.bioclima.ro)

**Abstract:** Speleoterapia – o forma speciala de climatoterapie, utilizeaza anumite condiții specifice peșterilor și salinelor pentru a trata mai multe afecțiuni, în special de tip respirator și dermatologice. Speleoterapia utilizează anumite condiții specifice peșterilor și salinelor pentru a trata mai multe boli, în special de tip respirator. Aerul salinelor este sărac în particule de praf ce ar putea sta la baza unor reacții alergice sau a unor atacuri de astm. Acest fapt reduce orice tip de iritație și astfel, simptomele de boală sunt reduse sau chiar complet eliminate pe timpul șederii pacientului în salină. Însă acest aspect nu poate să explice efectul speleoterapiei pe termen lung. Tratarea astmului presupune staționarea pacientului în subteran pentru 2-3 ore pe zi, timp de 2-3 luni. Un studiu mai vechi descrie un regim speleoterapeutic de 4 ore /zi timp de 6-8 săptămâni, pentru 100 de pacienți cu boli pulmonare obstructive cronice și astm. Rezultatele studiului au înregistrat o îmbunătățire a sănătății pacienților ce a durat între 6 luni și 7 ani (Skulimowski, 1965).

**Obiectiv:** Investigarea influenței microclimatului salinelor Turda, Dej și Cacica asupra morfologiei și exprimării electroforetice a fibroblastelor pulmonare și dermale *in vitro* obținute din țesutul pulmonar și hipodermic al șobolanilor Wistar, în condiții normale și după inducerea astmului cu ovalbumina, respectiv după răni și arsuri experimentale.

**Materiale și metode:** culturile de fibroblaste dermale au fost obținute din țesutul pulmonar și cel hipodermic prelevat de la șobolani Wistar. Culturile obținute se dezvoltă în monostrat de fibroblaste atașate la vasul de cultivare. Înainte de inițierea culturilor, șobolanii Wistar cu greutate de 75-100 g au fost separați în trei loturi: control, cu stare de astm experimental și cu răni și arsuri. 10 animale din fiecare lot au fost trimise la salinele Turda, Dej și Cacica timp de 14 zile și menținute în mediul salin, ca și în speleoterapie.

**Rezultate:** Speleoterapia aplicată șobolanilor Wistar a determinat diferențe semnificative în morfologia celulară și în exprimarea electroforetică a fibroblastelor pulmonare și dermale din culturile primare realizate. Datele obținute confirmă efectele terapeutice ale speleoterapiei prin comparație cu datele experimentale de la animalele martor.

**Concluzii:** Rezultatele acestui studiu indică faptul ca speleoterapia induce schimbări în morfologia și expresia proteică a fibroblastelor dermale și pulmonare *in vitro*, iar aceste schimbări susțin efectele terapeutice ale speleoterapiei. Cuvinte cheie: speleoterapie, fibroblaști, salina.

### 1. Introducere

Astmul este o boală caracterizată prin inflamația cronică a căilor respiratorii ce devin astfel hiper-responsive și prin schimbări în arhitectura acestora, proces denumit remodelare. Celulele responsabile pentru menținerea structurii pulmonare sunt celulele parenchimatose ale plămânului, inclusiv celulele epiteliale, celulele mezenchimale, și celulele endoteliale. Studii recente au sugerat că funcția celulelor epiteliale, a celulelor musculare netede și a fibroblaștilor din culturi obținute din plamanii persoanelor cu astm diferă de funcția celulelor cultivate în mod similar de la persoane sănătoase, fără astm. Aceste diferențe funcționale, legate de reparare și remodelare, ar putea contribui la modificarea structurală a căilor respiratorii (Sugiura et al., 2007).

Studiul actual a fost conceput pentru a investiga influența microclimatului Salinelor Turda, Cacica și Dej asupra morfologiei celulare și exprimarea electroforetică a fibroblastelor pulmonare *in vitro* obținute de la șobolani Wistar, în condiții normale și de sensibilizare cu Ovalbumina - "astmatici".

Fibroblastele au fost cultivate din parenchimul pulmonar prelevat de la animale martor, sensibilizate cu ovalbumină netratată și șobolani tratați în salina după sensibilizare cu ovalbumină - aflați în cură de speleoterapie. Forma fibroblastelor în cultură poate varia în funcție de substratul pe care sunt crescute și de spațiul pe care îl au pentru mișcare.

Utilizarea culturilor de fibroblaste pulmonare pentru a verifica proprietățile terapeutice ale microclimatului salin în cure de speleoterapie, reprezintă o modalitate științifică de a stabili metodologia medicală de prevenire, tratare și recuperare a pacienților cu diverse probleme pulmonare.

Prin studii *in vitro* se pot urmări: morfologia celulară, sinteza proteică, secreția anumitor substanțe, metabolismul celular, interacția celulelor prin receptori celulari cu diferiți liganzi, captarea sau eliberarea electroliților ori a altor tipuri de substanțe care ajung în mediul celular.

Pentru urmărirea și caracterizarea răspunsului celulelor cultivate *in vitro* și supuse acțiunii directe a factorilor naturali terapeutici, se vor utiliza culturi de celule obținute prin procedee specifice în cadrul Laboratorului de Culturi Celulare.

Protocoloalele esențiale pentru culturile de celule sunt reprezentate de: obținerea de culturi primare, subcultivarea celulelor, tripsinizarea, pasarea culturilor celulare, numărarea celulelor folosind hemocitometrul, evaluarea viabilității celulare: metoda de excludere a albastrului tripan, colorarea cu roșu neutru; teste de citotoxicitate: studiul lactatdehidrogenazei, testul MTT, determinarea curbei de creștere a celulelor, evidențierea histochimică a celulelor senescente pe baza activității  $\beta$ galactozidazei, determinarea eficienței de clonare, decongelarea și crioconservarea celulelor.

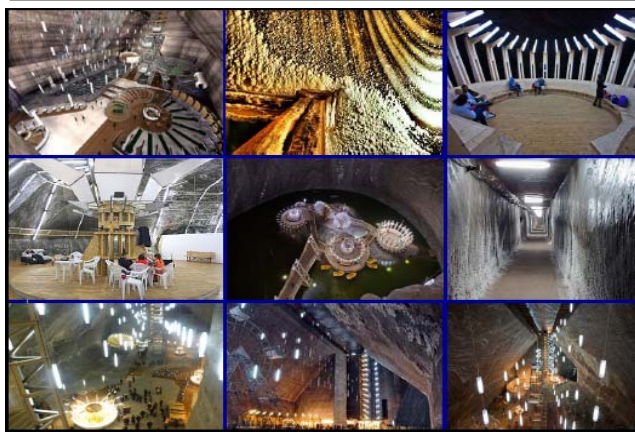


Figure 1. Turda Salt Mine

Pielea reprezintă interfața primară între organism și mediul înconjurător. Spectrul agresiunilor la care pielea este susceptibilă include afecțiuni cauzate de către agenți chimici și microbieni, radiații termice și electromagnetice și traume mecanice. Consecința distrugerii pielii este invazia microorganismelor patogene, ceea ce poate afecta viața omului.

Vindecarea unei răni este un răspuns natural, restaurativ, la o leziune tisulară – care constă dintr-o cascadă de evenimente celulare a căror natură depinde de caracteristicile răni. Există răni acute rezultate în urma intervențiilor chirurgicale, penetrării unor obiecte contondente, amputării unor falange, rozături, arsuri, mușcături de animale, etc. și răni cronice ca ulcerul arterial, ulcerul venos, limfedemul, ulcerul de presiune și ulcerul neuropatic.

Utilizarea culturilor de celule dermale pentru a verifica proprietățile terapeutice ale microclimatului din saline în cure de speleoterapie, reprezintă o modalitate științifică de a stabili metodologia medicală de prevenire, tratare și recuperare a pacienților cu diverse probleme dermatologice

## 2. Geography and geology

Una dintre salinele cu perspective uriașe pentru turismul medical și balneoclimatic din România este Salina Turda.

**Salina Turda** este unul dintre monumentele istorice din România, din județul Cluj și o atracție turistică la nivel național și internațional în special pentru Baile Sărute Turda, lacul sărat Durgău și ruinele castrului roman Potaissa unde a staționat Legiunea a V-a Macedonica acum 2000 de ani.

Exploatarea de sare de la Turda, în microdepresiunea actuală a stațiunii Baile Sărute are un interes special în timpul ocupației romane în Dacia.

Prima atestare documentară a localității, datând din secolul al XII-lea atunci când, căutătorul de roci, minerale și fosile de colecție - Joanne Fridvaldscky spune- "este atât de faimos ca nu are egal în tot Estul".

Zona Sărăturile Turzii a fost declarată rezervație naturală de interes național și a devenit un muzeu al mineritului de sare.

Salina Turda sa alăturat la circuitul turistic în 1992 (Ov. Mera și al., 2010) și a beneficiat de finanțare din partea Uniunii Europene în cadrul Programului PHARE CES 2005, prin intermediul proiectului "Îmbunătățirea

atractivității potențialului turistic al stațiunii balneare Lacurile Sărute - Zona Durgău -Valea Sărută și Salina Turda". Lucrările de modernizare la Salina Turda au început în 2008 și au durat doi ani.

Mina de sare Turda are din punct de vedere balneoclimatic toate condițiile necesare, pentru uz terapeutic: mine cu camere corespunzător echipate, adaptate atât pentru turiști dar și pentru persoane bolnave, inclusiv persoane cu handicap locomotor, camerele de sare au un spațiu mare, fiind camere izolate; nu există exploatare curentă a sării iar în mina Terezia există un lac salin adaptat pentru recreere.

Deschiderea oficială a Salinei modernizate Turda a avut loc la 22 ianuarie 2010.

**Salina Cacica** - se află în localitatea cu același nume, în partea de NE a României, la 42 km de Orașul Suceava și 17 km de localitatea Gura Humorului.

Aerul puternic ozonat, puritatea și frumusețea naturii, fac din acest loc o destinație atractivă în orice anotimp, atât pentru odihnă, agrement și tratament al tulburărilor respiratorii.

Intrarea în mina de sare se face pe scări de brad, care sunt de peste 200 de ani, mineralizate de apa sărată care a penetrat lemnul. Lucrul minerilor cu dalta și barosul au lăsat adevărate opere de artă, ce poartă pecetea talentului tăiat în masivul de sare: scări de acces, tavane boltite sau galerii imense.

Măsura reală a măiestriei celor care au săpat în sare cu ciocanul este dată de biserica mică construită în sare, la o adâncime de 27 de metri și sala de dans situată la o adâncime de 37 de metri.

Această capelă catolică subterană sfințită a fost în anul 1800 și adună toți locuitorii, în ultimele două secole, la sărbătoarea Sf. Varvara, sfânt protector al minerilor.

**Ocna Dej** mina de sare se află în România, în mijlocul Bazinului Transilvaniei la 3 km de orașul Dej și 60 km de Cluj-Napoca. Importanța sării în dezvoltarea civilizației umane și calitatea sa excepțională a făcut ca acest depozit de sare de la Ocna Dej să fie exploatat încă din antichitate.

Prima atestare documentară privind exploatarea sării la Ocna Dej datează din epoca romană și pot fi observate și astăzi excavări rămase înfundate. După imperiul Roman extracția a continuat până în secolele XII-XIII, atunci când se consideră debutul actualului perimetru minier la Ocna Dej.

Astăzi, mina de sare Ocna Dej face parte din sare Compania Națională a Sării SA, a cărei principala activitate este extracția, prepararea și comercializarea resurselor de sare.

Mina de sare Ocna Dej se caracterizează prin: Temperatura: 12.4 -14.5 °C, presiune: 1,018-1,020 hPa, umiditate: 65-71%, prezența aerosolilor salini, iluminatul artificial și sistemul de ventilație propriu. O concentrație mai mare de NaCl este asigurată prin funcționarea continuă a minei.

Aceste condiții de mediu existente la salina Ocna Dej au condus pe cercetători să realizeze studii privind evaluarea posibilității de a folosi această mină, nu numai pentru extracția sării, dar și pentru dezvoltarea terapiei cu radon și speleoterapie în România (Calin MR. și MA Calin, 2010).

### 3. Materiale și metode

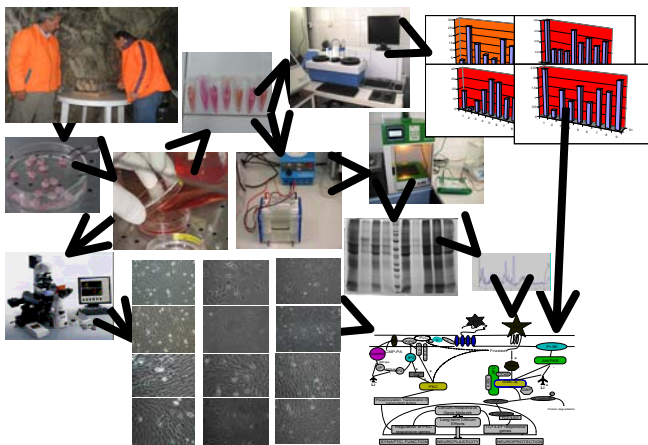


Fig.2 Design experimental

Materiale: Tampon fosfat salin (TFS: NaCl 0,13M + KCl 2,6mM + Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x12 H<sub>2</sub>O 8mM + KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,4mM); mediu HAM-F12 (Sigma); penicilină 100 U/ml, streptomycină 100μg/ml (Antibiotice S. C. Iași); neomicină 50μg/ml (Sigma); ser fetal de vițel (Sigma).

Model animal –șobolani Wistar cu răni și arsuri experimentale: Șobolani Wistar de 75-100 g greutate au fost supuși la răni și arsuri de 1 cm patrat, pe suprafața dorsală - spate. Primary pulmonary fibroblasts culture

Model animal –șobolan Wistar cu astm indus alergic Șobolani Wistar de 75-100 g greutate au fost sensibilizați prin injecții intramusculare cu Ovalbumina.

Cultura de fibroblaste pulmonare

După anestezia realizată cu cloroform și disecția sternală a animalelor, a fost preluat țesut pulmonar care a fost plasat în soluție tampon fosfat salin (TFS) pe gheață. Prin tripsinizări succesive cu tripsină 0,125% și centrifugare, peletul celular este preluat într-o cantitate corespunzătoare de mediu. Celulele au fost crescute în mediu HAM-F12 cu 4500mg/l glucoză, 25 mM HEPES, 100 U/ml penicilină, 100 μg/ml streptomycină și 50 μg/ml neomicină. Mediul a fost suplimentat cu 10% ser fetal de vițel.

După 24 ore s-a schimbat mediul de cultură, pentru a îndepărta celulele moarte și resturile celulare. Ulterior schimbarea mediului s-a efectuat zilnic. Celulele au fost cultivate pe plăci Petri de sticlă, cu diametrul de 50 mm (Schott).

Cultura de fibroblaste dermale

După anestezia realizată cu cloroform și eliminarea părului cu ajutorul unei lame de ras sterile, a fost preluată o suprafață de 1 cm<sup>2</sup> de piele, care a fost plasată în soluție tampon fosfat salin (TFS) pe gheață. Prin tripsinizări succesive cu tripsină 0,125% și centrifugare, peletul celular este preluat într-o cantitate corespunzătoare de mediu. Celulele au fost crescute în mediu HAM-F12 cu 4500mg/l glucoză, 25 mM HEPES, 100 U/ml penicilină, 100 μg/ml streptomycină și 50 μg/ml neomicină. Mediul a fost suplimentat cu 10% ser fetal de vițel.

Microscopia în contrast de fază

Microscopia în contrast de fază, descrisă pentru prima dată în 1934 de către fizicianul olandez Frits Zernike, este o tehnică optică de contrast ce poate fi utilizată pentru a produce imagini cu contrast ridicat a probelor transparente, cum sunt celulele vii.

Electroforeza SDS-PAGE

Electroforeza proteinelor din lizatul celular omogen total are ca scop stabilirea schimbărilor aparute la nivelul expresiei proteice a culturilor de fibroblaste obținute de la șobolani supuși tratamentului speleoterapeutic.

Electroforeza proteinelor în gel de poliacrilamidă a fost făcut în condiții denaturante în conformitate cu tehnicile descrise de Laemmli (1979). Culturile au fost spălate cu TFS, raclate de la placa de cultură și lizate în tampon care conține 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 + 0,05% BPB + glicerol 10% + 10% SDS. Analiza densitometrică pentru evaluarea cantității relative de proteine s-a efectuat cu ajutorul sistemului SCIE-PLAS VISION, utilizând soft-ul de analiză a gelurilor GeneTools de la SYNGENE, versiunea 4.00.

## 4. Rezultate

### 4.1. Rezultatele speleoterapiei asupra celulelor dermale

Cultura de celule dermale martor de 7 zile are o compoziție celulară heterogenă formată din fibroblaste dermale și celule epiteliale de tipul keratinocitelor. După 7 zile de cultivare se ajunge la un nivel avansat de preconfluență celulară. Diviziunea celulară are o frecvență ridicată. Morfologia celulară a celulelor martor corespunde datelor din literatura de specialitate.

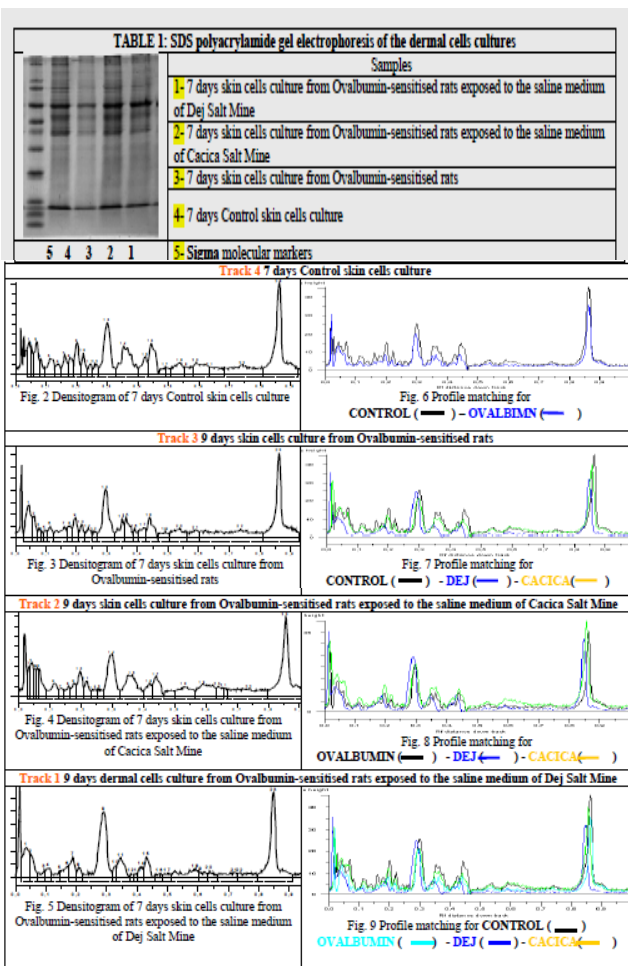
Cultura de celule dermale de 7 zile obținută de la animale martor negativ, cu răni și arsuri, dar netratați prin speleoterapie prezintă mai multe modificări morfologice față de cultura martor de celule dermale, fiind observată o reducere semnificativă a numărului de fibroblaste din cultură, diminuarea frecvenței diviziunilor celulare și accentuarea morfopatologiilor celulelor din cultură. După 7 zile de cultivare, nivelul de preconfluență este mult mai redus decât în cazul martor.

Cultura de celule dermale de la șobolani din loturile de control pozitiv, fără răni și arsuri și trimiși la speleoterapie în salinile Cacica și Dej prezintă un aspect intermediar între martorii negativi cu răni și arsuri și martorul de control, ținut la Biobază.

Cultura de celule dermale de 7 zile obținută de la șobolani cu răni și arsuri, tratați prin speleoterapie la Cacica și Dej prezintă o ameliorare evidentă microscopică a parametrilor morfologici, în comparație cu martorii negativi. Crește densitatea și viabilitatea celulară

Observațiile morfologice sunt confirmate de analiza electroforetică, ce demonstrează prin creșterea expresiei unor proteine și a nivelului total de proteine din omogenatul celular după expunerea animalelor cu răni și arsuri la mediul din salinile Cacica și Dej, fiind astfel inversate procesele morfopatologice ale celulelor dermale din cultură.





**TABLE 2 Protein expression analysis of the skin cells cultures**

Peak Nr.	Peak weights molecular limits (kDa)	CONTROL Quantity (µg/10µl)	OVALBUMIN Quantity (µg/10µl)	CACICA Quantity (µg/10µl)	DEJ Quantity (µg/10µl)
1	225 - 240	3,80	5,61	2,60	5,56
2	220 - 225	1,81	2,19	3,58	2,19
3	210 - 220	4,78	0,92	2,07	0,92
4	200 - 210	1,66	0,37	2,04	1,25
5	190 - 200	3,55	0,80	3,86	0,80
6	160 - 190	1,61	1,35	3,39	1,86
7	140 - 160	2,81	2,73	1,12	2,50
8	120 - 140	2,53	1,59	1,58	1,13
9	105 - 120	4,73	2,61	2,00	20,03
10	100 - 105	2,75	1,45	4,28	1,02
11	90 - 100	1,32	1,36	2,45	3,77
12	63 - 90	1,61	0,90	1,21	0,29
13	55 - 63	13,14	9,93	1,36	0,34
14	42 - 55	11,32	2,75	12,25	1,29
15	40 - 42	3,48	3,20	9,62	2,72
16	37 - 40	8,12	0,92	2,72	0,56
17	35 - 37	1,01	1,76	6,35	0,72
18	34 - 35	3,70	3,65	4,73	3,22
19	32 - 34	1,96	1,41	6,55	1,08
20	30 - 32	4,89	3,30	2,28	0,87
21	23 - 30	3,19	2,08	0,86	1,62
22	19 - 23	8,00	10,27	8,11	1,78
23	6 - 19	24,72	18,30	23,20	30,22
<b>TOTAL amount of proteins in 10 µl of sample:</b>		<b>116,5</b>	<b>79,45</b>	<b>108,19</b>	<b>85,74</b>

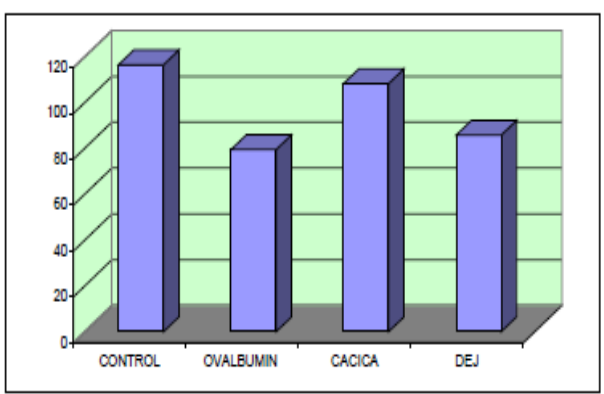
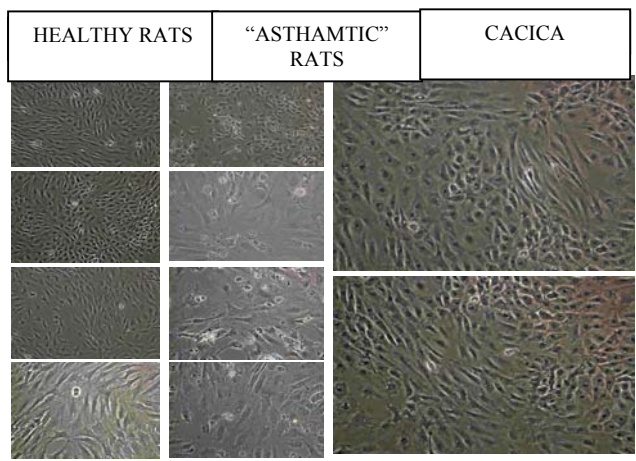


Fig.10 TOTAL amount of proteins in 10 µl of sample

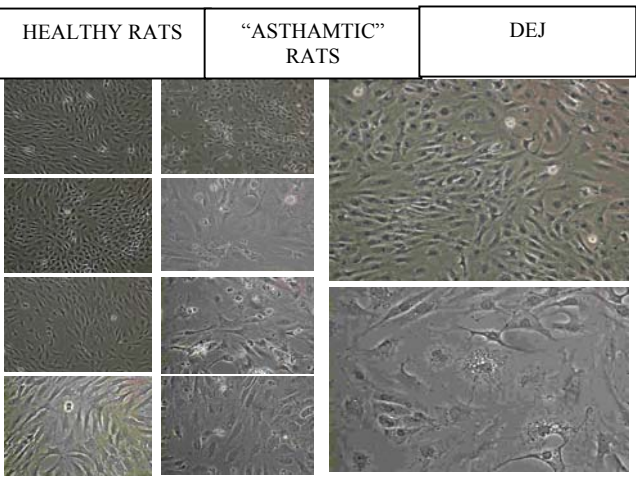


Fig. 3 Experimental results for dermal fibroblasts cultures



#### 4.2. Rezultate asupra fibroblastelor pulmonare

Cultura martor de fibroblaste pulmonare de 7 zile are un aspect omogen cu un nivel ridicat de pre-confluenta. Diviziunea celulară este la un nivel ridicat iar morfologia celulară în microscopie optică este tipică, descrisă în literatura de specialitate.

Fibroblaste pulmonare din culturi de 7 zile obținute de la șobolani sensibilizați cu ovalbumina prezintă mai multe schimbări morfologice față de cultura martor de fibroblaste pulmonare, fiind observată reducerea numărului de fibroblaste pulmonare în cultură, diminuarea ratei de diviziune celulară, precum și o morfopatologie celulară accentuată a fibroblastelor în cultură. După 7 zile de cultivare, nivelul de pre-confluenta este mult mai mic decât în cazul martor.

Culturile de 7 zile de fibroblaste pulmonare obținute de la șobolani sensibilizați cu Ovalbumina și tratați prin speleoterapie în Salinele Turda, Cacica și Dej prezintă o îmbunătățire a parametrilor morfologici ai celulelor, comparativ cu culturile obținute de la șobolani „astmatici” sensibilizați cu ovalbumină și netratați.

Fibroblastele pulmonare au fost omogenizate cu tampon Laemmli pH 6,8, iar proteinele din omogenatele obținute au fost separate prin electroforeză pe gel de poliacrilamidă cu 10% SDS care menține polipeptidele într-o stare denaturată după ce acestea au fost tratate cu agenți puternici de reducere pentru a elimina structura secundară și terțiară.

Probele de 10μl au fost încărcate în godeurile din gel. Unul dintre godeuri a fost rezervat pentru amestecul de markeri moleculari Sigma de 205; 116; 97; 66; 55; 45; 36; 29; 24; 20; 14,2 și 6,5 kDa

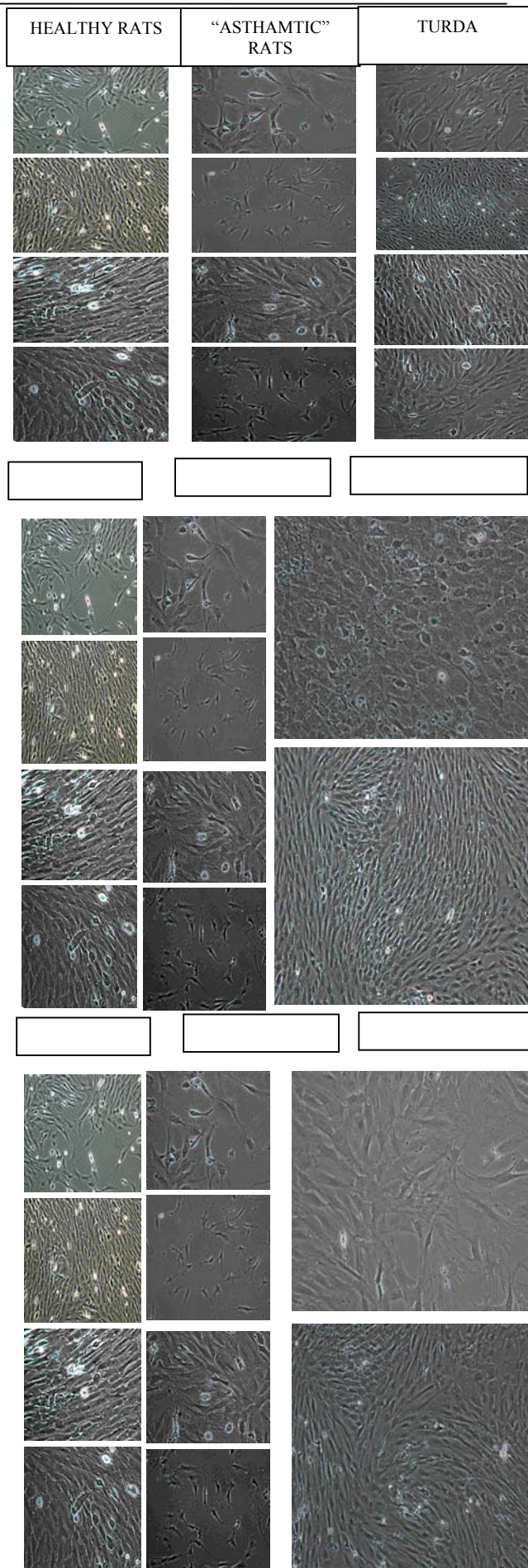
După electroforeza, gelul a fost colorat cu [Coomassie Brilliant Blue R -250](#), ceea ce a permis vizualizarea proteinelor separate. După colorare, diferitele proteine au apărut ca benzi distincte în gel (Towbin et al., 1979).

Analiza cu versiunea de software 4 GeneTools de la SynGene din fiecare track de electroforeză, ne-a permis să comparăm profilurile de expresie totală a proteinelor.

Datele obținute confirmă observațiile noastre de microscopie optică, fiind depistată o scădere a nivelului total de proteine la 130μg în cazul indus de astm față de 160 μg la martor.

Cura speleoterapeutică în Salina Turda a readus acest parametru la o valoare apropiată de martor, respectiv de 155 μg proteine totale.

Date asemănătoare au fost obținute și pentru salinele Cacica și Dej. Astfel, față de lotul martor cu un nivel proteic total de 80,6 μg, acest parametru are valoarea de 67,41μg în cazul indus de astm experimental, dar crește la valori de 81,95 după speleoterapia la Cacica și respectiv 88,72 după speleoterapia în Salina Dej.

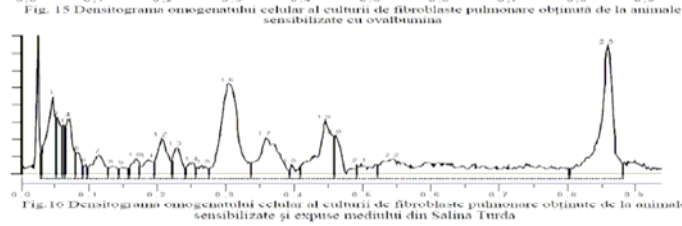
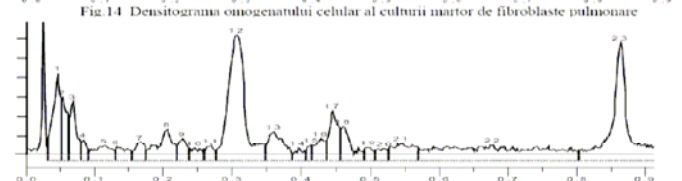
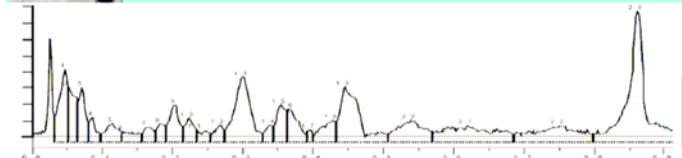


**TABLE 1: SDS polyacrylamide gel electrophoresis of the pulmonary fibroblasts cultures**

Samples
5: 9 days pulmonary fibroblasts culture from Ovalbumin-sensitized rats exposed to the saline medium of Dej Salt Mine
4: 9 days pulmonary fibroblasts culture from Ovalbumin-sensitized rats exposed to the saline medium of Cacica Salt Mine
3: 9 days pulmonary fibroblasts culture from Ovalbumin-sensitized rats
2: 9 days Control pulmonary fibroblasts culture
1: Sigma molecular markers

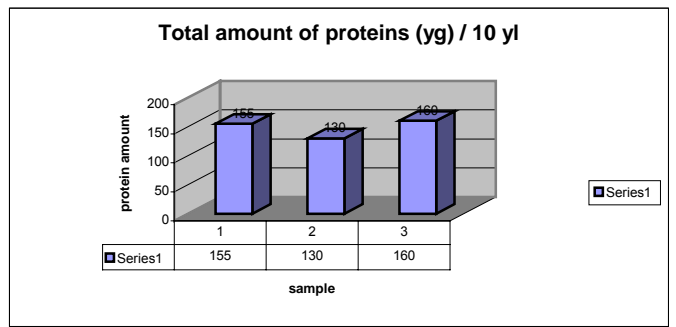
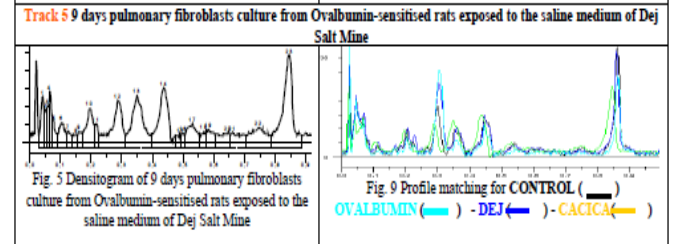
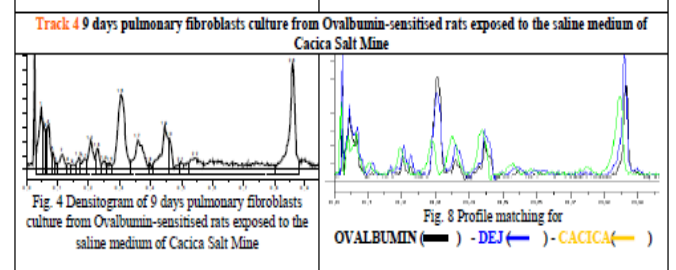
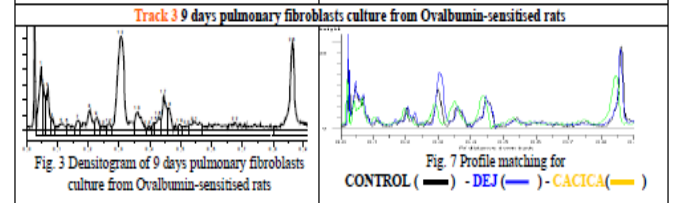
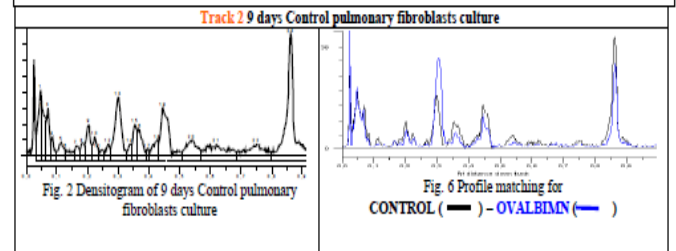
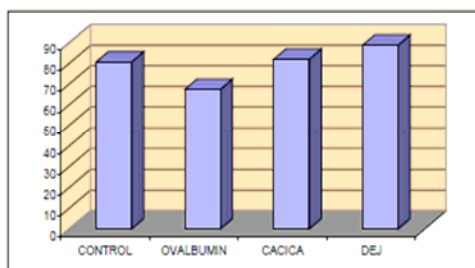
**Fig. 1 – Electrophoretic profile of pulmonary fibroblasts cultures**

PROBA	Cantitatea de proteine per placă
1: cultură de fibroblaste pulmonare expuse mediului din Salina Turda	155 µg
2: cultură de fibroblaste pulmonare obținută de la animale sensibilizate cu ovalbumină	130 µg
3: cultură de fibroblaste pulmonare maror	160 µg
4: markeri de greutate moleculară (SIGMA)	120 µg / 10 µl



**TABLE 2 Protein expression analysis of the pulmonary fibroblasts cultures**

Peak Nr.	Peak weights molecular limits (kDa)	CONTROL Quantity (µg/10µl)	OVALBUMIN Quantity (µg/10µl)	CACICA Quantity (µg/10µl)	DEJ Quantity (µg/10µl)
1	225 – 240	5.47	5.18	2.98	6.33
2	220 – 225	3.37	2.35	0.99	2.24
3	210 – 220	2.81	3.08	1.48	1.54
4	200 – 210	1.25	0.56	2.68	3.18
5	190 – 200	1.54	1.23	1.35	1.17
6	160 – 190	0.66	0.65	2.38	0.36
7	140 – 160	0.94	0.90	0.94	2.06
8	120 – 140	0.90	2.81	0.70	0.53
9	105 – 120	3.01	1.07	1.00	0.58
10	100 – 105	1.58	0.58	4.42	0.98
11	90 – 100	0.59	0.60	1.30	1.34
12	63 – 90	0.94	16.21	8.10	3.38
13	65 – 63	8.77	2.70	10.20	1.96
14	42 – 65	0.80	0.34	10.34	0.80
15	40 – 42	2.78	0.39	0.70	0.75
16	37 – 40	2.88	1.38	0.61	14.47
17	35 – 37	0.36	3.11	3.29	6.29
18	34 – 35	2.16	2.16	1.19	0.53
19	32 – 34	8.48	0.44	1.64	7.62
20	30 – 32	3.79	0.55	2.17	2.39
21	23 – 30	4.78	1.86	2.05	1.35
22	19 – 23	4.16	6.64	4.64	12.93
23	6 – 19	18.64	12.62	16.80	15.94
<b>TOTAL amount of proteins in 10 µl of sample:</b>		<b>80,66</b>	<b>67,41</b>	<b>81,95</b>	<b>88,72</b>





## 5. Discuții

Prezentul studiu a evaluat fenotipurile morfologice legate de procesele de reparare și remodelare a culturilor de fibroblaste dermale și pulmonare obținute de la șobolani Wistar martor și șobolani ovalbumin-sensibilizați - un model pentru astmul bronșic care duce la hiper-răspunsul căilor respiratorii și remodelarea cronică a căilor respiratorii, așa cum și alți autori au prezentat.

Comparativ cu fibroblastele din cultura martor, fibroblastele obținute din parenchimul pulmonar de la șobolani "astmatici" și șobolani ovalbumin-sensibilizați tratați în Salinele Turda, Cacica și Dej am demonstrat rolul pozitiv al mediului salin pentru tratarea astmului.

Studiul actual s-a axat pe fibroblaste, fiind considerate a fi celule ce joacă un rol important în menținerea și remodelarea țesutului conjunctiv interstițial.

În acest context, fibroblastele joacă un rol cheie în menținerea și modificarea structurii țesutului. Capacitatea fibroblastelor de a migra și de a prolifera ca răspuns la stimuli chemotactici sau ca răspuns la factori de creștere specifici este explicată prin necesitatea de a controla acumularea lor la locurile unde are loc repararea țesuturilor. Capacitatea fibroblastelor de a produce și de a remodela matricea extracelulară este considerată a contribui la modificările structurale ale țesuturilor. Remodelarea țesuturilor implică probabil activitatea contractilă a fibroblastelor.

Studiul de față susține ideea că fibroblastele modificate fenotipic pot contribui la remodelarea căilor respiratorii în astm. Fibroblastele cultivate din plamani de la animale sensibilizate cronic cu ovalbumină au demonstrat creșterea în mod constant a unor răspunsuri reparatorii (Sugiura et al., 2007).

## 6. Concluzii

- Analiza morfologică a culturilor, realizată microscopic, în contrast de fază, relevă regenerarea celulară după expunerea animalelor la mediul din salinele Turda, Dej și Cacica, față de culturile obținute de la animale sensibilizate cu ovalbumină.
- Observațiile de morfologie celulară sunt confirmate de analiza electroforetică, care demonstrează prin modificarea profilului mai multor proteine și prin determinarea cantității totale de proteine că expunerea la mediul din salinele Turda, Cacica și Dej favorizează obținerea celulelor dermale și a fibroblastelor pulmonare *in vitro*;
- Sensibilizarea cu ovalbumină a animalelor de laborator scade considerabil numărul celulelor dermale și a fibroblastelor pulmonare din culturile obținute și crește nivelul morfopatologic.

## Aprecieri

Acest studiu a fost terminat în 2011 și finanțat de către Autoritatea Națională pentru Cercetare Științifică - CNMP, contract nr. 42120/2008, proiect: Studiu complex medico-biologic în vederea utilizării inovative a factorilor potențial terapeuțiici de mediu din saline și pesteră în sanatare și turism balneoclimatic; soluții de modelare a acestora, coordonat de Dr. Iuri Simionca.

## Bibliografie

1. Calin M.R., Calin M.A. – Evaluation of the radon concentration in Ocna Dej salt mine, Romania, *J Radioanal Nucl Chem* (2010) 286: 169-173, DOI 10.1007/s10967-010-0648-8, URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s10967-010-0648-8>
2. Flaxman A. – cell identification in primary cell cultures from skin, *In vitro*, vol.10, no 1&2, 1974
3. Foster Judith Ann, Celeste B.R., Miller M.F. – Pulmonary Fibroblasts: an in Vitro Model for Emphysema, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 265, No. 26, 1990, p. 15544-15549;
4. Horvath Tibor (1986) – Speleotherapy: a special kind of climatotherapy, its role in respiratory rehabilitation, *Disability & Rehabilitation*, 8:2, 90-92, DOI: 10.3109/03790798609166185, URL: <http://dx.doi.org/10.3109/03790798609166185>
5. Laemmli U.K. (1979) Cleavage and structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature* 227: 680-682.
6. Nunez J.S., Torday J.S. – The Developing Rat Lung Fibroblast and Alveolar Type II Cell Activity Recruit Surfactant Phospholipid Substrate, *American Institute of Nutrition*, 1995, 1639S-1643S
7. Simionca I., Grudnicki N., Buturuga A., Hoteteu M., Kiss J., Oprina A. – Speleoterapia bolnavilor cu astm bronșic non-sever prin intermediul factorilor terapeuțiici din salina Slănic Prahova, Editura "George Tofan", Suceava 2009, ISBN 978-973-1862-87-3
8. Sugiura H., Liu X., Duan F., Kawasaki S., Togo S., Kamio K., Wang X.Q., Mao I., Ahn Y., Ertl R.F., Bargar T.W., Berro A., Casale T.B. – Cultured Lung Fibroblasts from Ovalbumin-Challenged "Asthmatic" Mice Differ Functionally from Normal, *Am. J. Respir Cell Mol Biol*, Vol 37, pp 424-430, 2007
9. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350-4354.
10. Skulimowski M. - Treatment of bronchial asthma patients in the chambers of the rock salt mine in Wieliczka, *Arch Phys Ther (Leipzig)*, 1965 Nov-Dec;17(6):417-21
11. Karen M. Perrin, Karen S. Dindial - Understanding the Modalities of Complementary and Alternative Asthma Treatments: What Every Health, *The International Electronic Journal of Health Education*, 2000; 3(1): 6-1