

## Оценка биологической активности минеральной воды «Нафтуса»

М. С. Яременко, В. П. Загороднюк, В. Р. Билас, Е. Я. Баев, О. Н. Харламова

Вопрос о необходимости оценивать биологическую активность минеральных вод поднят уже давно [5]. Важность исследований в таком направлении определяется, во-первых, тем, что природа лечебного фактора минеральных вод не всегда может быть определена химически. Особенно это относится к слабоминерализованным водам типа «Нафтуса», бальнеоактивными компонентами которой предполагаются ее специфические органические вещества [2, 3]. Несомненно, что химическая идентификация этих биологически активных веществ (БАВ) открыла бы возможность более эффективного использования вод этого типа в лечебной практике, способствовала бы решению вопросов, связанных с транспортировкой и бутылочным разливом воды «Нафтуса», получением из нее медицинских препаратов. Во-вторых, то, что нет надежного индикатора, характеризующего воду типа «Нафтуса», создает значительные трудности при поиске новых месторождений этих вод и разумной эксплуатации существующих. Действие БАВ воды «Нафтуса» мы оценивали с помощью биотестов, в качестве которых использовали фермент  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазу и изолированные гладкие мышцы (ГМ) кишечника.

### Методика

Активность  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы определяли в гомогенате клеток эпителия тонкой кишки крысы [11], выражая ее в микромоль  $\text{P}_n$  на миллиграмм белка-час. Среда инкубации была следующего состава (ммоль/л): трис- $\text{HCl}$  — 25, трис-АТФ — 3,  $\text{MgCl}_2$  — 5,  $\text{NaCl}$  — 100,  $\text{KCl}$  — 10; рН среды составлял 7,4. Электрическую и сократительную активность изолированных мышечных полосок продольного слоя слепой кишки морской свинки регистрировали с помощью метода сахарозного мостика [1].

Воду «Нафтуса» вносили непосредственно в среду определения активности фермента, тогда как в опытах на ГМ раствор Кребса готовили на минеральной воде.

Объектом исследования служила минеральная вода «Нафтуса» скважин 1-НО и 21-Н, отобранная с помощью сифона, без доступа воздуха. Исходная вода содержала 0,1 мг/л  $\text{O}_2$ , определяемого электрохимическим способом с помощью анализатора «Тепомierz» (ПНР). Общий объем отобранной воды делили на четыре части. Первую часть воды оставляли на хранение без каких-либо воздействий на нее; вторую и третью — насыщали кислородом до 2 мг/л, что соответствует его содержанию в воде «Нафтуса» при ее интенсивном отборе в летний период времени [6] и до 17 мг/л (максимально возможное насыщение) соответственно; из четвертой части воды удаляли микрофлору, используя бактериальный фильтр ФМО2-1000 с мембраной «Рипор-4», а затем насыщали кислородом до 17 мг/л. Пробы нативной анаэробной, аэрированной и безмикробной аэрированной воды «Нафтуса» хранили в герметических сосудах при 20 °С в течение 14 сут. Они служили предметом для биотестирования. В контрольных исследованиях использовали искусственный солевой аналог «Нафтуса» (ИСАН).

### Результаты и их обсуждение

При добавлении воды «Нафтуса» в среду, в которой определяли активность  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы (0,001—10 % объема среды), наблюдается снижение активности фермента (рис. 1). При этом эффект зависел от объема добавленной воды и ее состава. Наиболее активной была вода «Нафтуса» скважины 1-НО, которая оказывала выраженное тормозящее действие уже в дозе 0,001 %, уменьшая активность фермента в среднем на 35,0 %  $\pm$  3,9 % ( $\text{P} < 0,001$ ). Увеличение объема воды «Нафтуса» в среде от 0,005 до 1 % вызывало падение активности в среднем

на  $46,0\% \pm 4,8\%$  ( $P < 0,001$ ), а увеличение до  $10\%$  — ослабляло эффект. Вода «Нафтуса», отбираемая из скважины 21-Н, не проявляла активности в малой дозе ( $0,001\%$ ) и вызывала лишь незначительную тормозящую реакцию при добавлении  $0,005\%$  воды по отношению к среде. Остальные дозы воды скважин 21-Н и 1-НО Трускавецкого месторождения действовали аналогично (см. рис. 1). Такой же эффект на  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазу оказывала вода «Нафтуса» Сходницкого месторождения (18-С), естественно изливающаяся. Добавление  $0,1\%$  этой воды

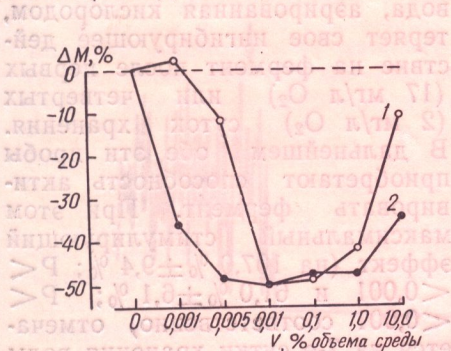


Рис. 1. Изменение активности  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы ( $\Delta M, \%$ ) клеток эпителия тонкой кишки под влиянием различного объема воды «Нафтуса» в среде инкубации ( $V, \%$  объема среды):

1 — вода «Нафтуса» из скважины 21-Н; 2 — то же из скважины 1-НО. Здесь и на рис. 2 пунктирная линия — исходный уровень активности фермента.

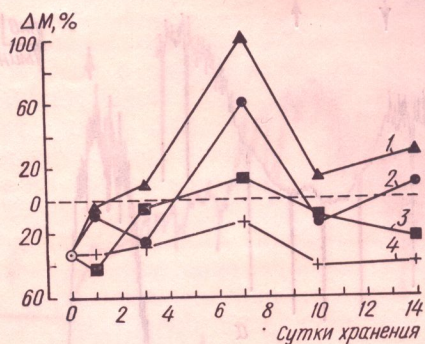


Рис. 2. Влияние воды «Нафтуса» скважины 1-НО ( $1\%$  объема среды) анаэробного и аэробного способов хранения (сут) на активность  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы ( $\Delta M, \%$ ) клеток эпителия тонкой кишки:

1 — нативная вода с первоначальным содержанием кислорода  $17 \text{ мг/л}$ ; 2 — то же с первоначальным содержанием кислорода  $2 \text{ мг/л}$ ; 3 — безмикробная вода, содержащая  $17 \text{ мг/л}$  кислорода; 4 — нативная вода с первоначальным содержанием кислорода  $0 \text{ мг/л}$ .

к объему среды уменьшало активность фермента в среднем на  $47,3\% \pm \pm 4,9\%$  ( $P < 0,001$ ). Эти результаты согласуются с полученными в нашей лаборатории данными о торможении (примерно на  $50\%$ ) активности  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы в клетках эпителия тонкой кишки крысы в опытах *in vivo*, спустя  $30$  мин после нагрузки животных минеральной водой в объеме  $1,5\%$  массы тела [11].

Добавление в среду инкубации фермента такого же объема ИСАН, имеющего идентичный минеральной воде макроионный состав, вызывало лишь незначительные и недостоверные изменения активности фермента. Не ингибирует фермент и поверхностная вода Трускавецкого озера.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что в воде «Нафтуса» содержатся какие-то специфические БАВ — ингибиторы  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы, действующие непосредственно на фермент.

В процессе биотестирования активности воды «Нафтуса» были обнаружены ее сезонные колебания. В летний период вода «Нафтуса» принудительного отбора значительно меньше тормозила активность фермента. Так, вода скважины 1-НО в зимние месяцы года (декабрь, январь, февраль) в разведении  $0,1\%$  объема среды ингибировала фермент в среднем на  $49,4\% \pm 4,9\%$  ( $P < 0,001$ ), тогда как летняя вода (июнь, июль, август) оказывала слабый эффект (торможение на  $17,1\% \pm 0,9\%$ ;  $P < 0,001$ ). Для воды скважины 21-Н эти показатели составляли  $47,6\% \pm 4,5\%$  ( $P < 0,001$ ) и  $19,2\% \pm 1,2\%$  ( $P < 0,001$ ) соответственно. В некоторых случаях вода скважин 21-Н и 1-НО летнего водозабора обладала даже активирующим влиянием на  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазу. Вместе с тем для воды самоизливающейся скважины 18-С мы не обнаружили сезонных изменений в ее действии на фермент.

Известно, что при интенсификации отбора минеральной воды из недр в ней наблюдается увеличение содержания кислорода [6]. Это в свою очередь обуславливает изменение ее Eh-потенциала в сторону

положительных значений, что свидетельствует о переходе органических веществ из восстановленной формы в окисленные [10]. Последнее, по-видимому, может привести к изменению биологической активности воды «Нафтуся». В связи с этим возникла необходимость провести модельные опыты по изучению активности воды «Нафтуся», азрированной кислородом. Оказалось, что вода, хранящаяся в течение 14 сут в анаэробных условиях, сохраняет свое тормозящее влияние на активность



Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФазы. Вместе с тем вода, азрированная кислородом, теряет свое ингибирующее действие на фермент после первых (17 мг/л O<sub>2</sub>) или четвертых (2 мг/л O<sub>2</sub>) суток хранения. В дальнейшем обе эти пробы приобретают способность активировать фермент. При этом максимальный стимулирующий эффект (на 107,0 % ± 9,4 %; P < 0,001 и 61,0 % ± 6,1 %; P < 0,001 соответственно) отмечается на 7-е сутки хранения воды (рис. 2).

В контрольных экспериментах ИСАН, насыщенный кислородом до 17 мг/л, не вызывал достоверных изменений активности Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФазы в течение 7—9 сут хранения. Безмикробная азрированная вода «Нафтуся» не вызывает изменений активности фермента.

Рис. 3. Влияние нативной (а) и деминерализованной (б) воды «Нафтуся» водозабора Тустановичи на мембранный потенциал, амплитуду ан- и катэлектротонических потенциалов гладких мышц слепой кишки морской свинки.

Можно предположить, что в бескислородной минеральной воде преобладают БАВ — ингибиторы Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФазы, тогда как в азрируемой с течением времени (1—5 суток) проявляется активирующее действие на фрагмент. Вместе с тем нельзя исключить возможность того, что обнаруженные эффекты связаны с действием одного и того же органического компонента минеральной воды. Полученные результаты согласуются с данными химического исследования воды, показавшими разнонаправленные изменения содержания органических веществ (битумов, жирных кислот, аминов и др.) при взаимодействии с микроорганизмами воды «Нафтуся» в анаэробных и аэробных условиях хранения [12]. Результаты, полученные в настоящем исследовании, свидетельствуют о том, что обнаруженные модуляторы ферментативной активности являются продуктами жизнедеятельности анаэробной и аэробной микрофлоры воды «Нафтуся».

Принимая во внимание увеличение дебитов эксплуатируемых скважин 21-Н и 1-НО в летний период [6], можно предположить, что снижение тормозящей активности воды «Нафтуся» связано с замедлением процессов микробного синтеза БАВ — ингибиторов и (или) с усилением наработки активаторов фермента. Следует заметить, что сезонные изменения биоактивности воды «Нафтуся» наблюдались и ранее [9], но эти изменения не связывали с повышенным отбором минеральной воды из недр.

Ранее указывалось, что изолированные ГМ воротной вены крысы являются наиболее удобным и чувствительным объектом для биотестирования воды «Нафтуса» [3, 4, 9]. Однако эти исследования проведены недостаточно корректно, так как не контролировался сдвиг осмolarity среды, возникающий при добавлении минеральной воды в раствор Кребса. Мы же при исследовании действия на ГМ воды «Нафтуса» раствор Кребса готовили на минеральной воде с учетом ее

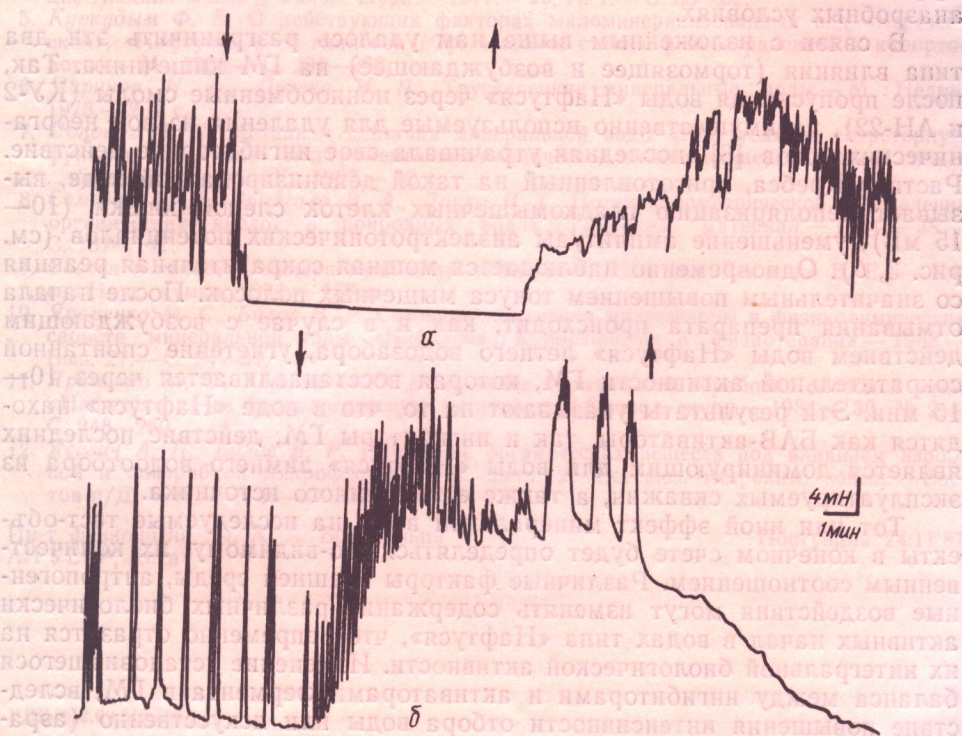


Рис. 4. Влияние воды «Нафтуса» скважины 1-НО зимнего (а) и летнего (б) забора на сократительную активность гладких мышц слепой кишки морской свинки.

макроионного состава. Это позволило избежать нежелательных изменений тоничности инкубационной среды. Тестируемые растворы включали минеральную воду «Нафтуса» скважин 21-Н и 1-НО, а также естественного источника Тустановичи в районе Трускавца. При действии указанными растворами на ГМ продольного слоя слепой кишки морской свинки в большинстве случаев наблюдается незначительная гиперполяризация (2—3 мВ), сопровождающаяся уменьшением амплитуды анэлектротонических потенциалов (рис. 3, а), при этом происходит угнетение спонтанной сократительной активности и расслабление ГМ (рис. 4, а). Эти эффекты минеральной воды не устраняются  $\alpha$ - и  $\beta$ -адреноблокаторами — фентоламином и индералом — в концентрациях  $3,1 \cdot 10^{-6}$  и  $3,4 \cdot 10^{-6}$  моль/л соответственно, что опровергает существующее предположение [5, 7] наличия в воде «Нафтуса» симпатомиметических веществ, близких по своей природе к адреномиметикам.

В летние месяцы года во время интенсивного отбора воды «Нафтуса» из скважин ее тормозящее действие на ГМ значительно ослабевает, и в большинстве случаев наблюдается даже возбуждающий эффект. В этом случае минеральная вода вызывает повышение тонуса мышечных полосок (рис. 4, б). После отмывания гладкомышечного препарата нормальным раствором Кребса происходит временное угнетение спонтанной сократительной активности ГМ, которая восстанавливается через 10—20 мин. В отличие от воды, отбираемой из эксплуатируемых скважин, вода «Нафтуса» из источни-

ка Тустановичи сохраняет постоянную ингибирующую активность в течение года.

Представляло интерес изучить влияние на ГМ воды «Нафтуся», аэрированной кислородом. При этом исследовали воду, насыщенную кислородом до 17 мг/л и хранящуюся в течение 7 сут. Оказалось, что инкубационный раствор, приготовленный на такой минеральной воде, вызывает возбуждающую реакцию, в противоположность тормозящему эффекту нативной воды (скважина 21-Н), отобранной и хранящейся в анаэробных условиях.

В связи с изложенным выше нам удалось разграничить эти два типа влияния (тормозящее и возбуждающее) на ГМ кишечника. Так, после пропускания воды «Нафтуся» через ионнообменные смолы (КУ-2 и АН-22), преимущественно используемые для удаления из вод неорганических ионов [8], последняя утрачивала свое ингибиторное действие. Раствор Кребса, приготовленный на такой деионизированной воде, вызывает деполяризацию гладкомышечных клеток слепой кишки (10—15 мВ), уменьшение амплитуды анэлектротонических потенциалов (см. рис. 3, б). Одновременно наблюдается мощная сократительная реакция со значительным повышением тонуса мышечных полосок. После начала отмывания препарата происходит, как и в случае с возбуждающим действием воды «Нафтуся» летнего водозабора, угнетение спонтанной сократительной активности ГМ, которая восстанавливается через 10—15 мин. Эти результаты указывают на то, что в воде «Нафтуся» находятся как БАВ-активаторы, так и ингибиторы ГМ, действие последних является доминирующим для воды «Нафтуся» зимнего водоотбора из эксплуатируемых скважин, а также естественного источника.

Тот или иной эффект минеральной воды на исследуемые тест-объекты в конечном счете будет определяться, по-видимому, их количественным соотношением. Различные факторы внешней среды, антропогенные воздействия могут изменять содержание различных биологически активных начал в водах типа «Нафтуся», что непременно отразится на их интегральной биологической активности. Изменение установившегося баланса между ингибиторами и активаторами фермента в ГМ, вследствие повышения интенсивности отбора воды или искусственно (аэрация кислородом, деионизация), приводит к проявлению стимулирующего эффекта, тогда как в естественных условиях преобладает тормозящий эффект. Обе обнаруженные группы БАВ восполняются в воде «Нафтуся» в результате жизнедеятельности ее аутохронной микрофлоры. Несомненно, обнаруженное изменение биологической активности воды «Нафтуся» из эксплуатируемых скважин (21-Н и 1-НО) в летний период может сказаться на ее физиологическом и лечебном действии на организм. Выяснение химической природы обнаруженных активных начал воды «Нафтуся» и изучение роли отдельных микроорганизмов в синтезе БАВ является задачей будущих исследований.

#### ESTIMATION OF THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF MINERAL WATER NAFTUSYA

M. S. Yaremenko, V. P. Zagorodnyuk, V. R. Bilas, E. Ya. Baeв, O. N. Kharlamova

Biologically active components of mineral water Naftusya have been studied for their influence on the activity of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase in epithelium cells of the rat small intestine and on electrical and mechanical responses of smooth muscles of the guinea-pig large intestine. It is shown that the inhibitory effect of water Naftusya on  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase and smooth muscles activity is predominant under natural conditions. This effect is weakened and replaced by a stimulatory one after oxygen saturation of mineral water and increase of water debits in summer. It is supposed that there are at least two groups of biologically active substances in mineral water Naftusya: inhibitors and activators. Both are products of microbial biosynthesis.

A. A. Bogomoletz Institute of Physiology,  
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev