

24. Kowarzyk K., Buluk K. Trombine, proteaze i plasmina // Acta physiol. polon.— 1954.— N 5.— P. 35—39.
25. Szirmai E., Sipma E. Новые методы исследования системы свертывания крови // Пробл. гематологии и переливания крови.— 1957.— № 6.— С. 36—74.
26. Szczerlik A., Gryglewski R. J., Domagala B. et al. Serum lipoproteins, lipid peroxidation and prostacyclin biosynthesis in patients with coronary heart disease // Prostaglandins.— 1981.— N 5.— P. 795—807.

Полтав. мед. стоматол. ин-т
М-ва здравоохранения УССР

Поступила 17.11.86

УДК 612.331:612.015.1:615.327

Пищеварительные и транспортные ферменты тонкой кишки под действием маломинерализованной воды «Нафтуса» и ее компонентов

Г. Л. Вавилова, Т. Ф. Кастрикина

В настоящее время считается общепринятым, что действие минеральной воды «Нафтуса» на организм является интегральным, т. е. обусловлено многими компонентами, входящими в ее состав. Однако сведения о влиянии неорганических или органических компонентов «Нафтуса» на различные показатели обменных процессов немногочисленны и противоречивы [6, 12].

Нашей задачей явилось изучение непосредственного влияния минеральной воды «Нафтуса» и некоторых ее компонентов на активность кишечных ферментов — пищеварительных (α -амилазы, протеиназы, лейцинаминопептидазы) и транспортных (Na^+ , K^+ -АТФазы). α -Амилаза и протеиназа — ферменты панкреатического происхождения, адсорбированные на поверхности щеточной каймы энтероцитов [13], гидролизуют высокомолекулярные соединения до олигомеров. Лейцинаминопептидаза включена в апикальную мембрану. Этот фермент отщепляет аминокислоты от пептидов, участвуя в заключительном этапе пищеварения. Имеются сведения, что лейцинаминопептидаза участвует во всасывании отщепившихся аминокислот. Таким образом, этому ферменту отводится особая роль в осуществлении сопряжения пищеварительных и транспортных процессов [3, 14, 24]. Na^+ , K^+ -АТФаза (КФ 3.6.1.3) локализована в базолатеральных мембранах энтероцитов и является ключевым транспортным ферментом, осуществляющим перенос ионов натрия и калия через мембрану за счет энергии гидролиза АТФ. Указанные ферменты нередко служат объектом изучения при исследовании действия минеральных вод на организм. Их реакции весьма разнообразны, что зависит от состава используемых минеральных вод [4, 10, 11].

Методика

Опыты проводили на ферментах, выделенных из эпителиального слоя тонкой кишки крыс линии Вистар массой 150—220 г. После декапитации животных извлекали 30—40 см проксимального участка тонкой кишки, слизистую гомогенизировали в гомогенизаторе Даунса с тремя объемами среды для гомогенизации (0,25 моль/л сахарозы, 0,02 моль/л трис-НCl буфера, pH 7,2 при температуре 20 °C). Все операции проводили при охлаждении (4 °C). Часть гомогената отбирали для определения активности пищеварительных ферментов, а из остальной — получали фракцию базолатеральных мембран с помощью дифференциального ультрацентрифугирования в центрифуге типа VAC-601 в дискретном градиенте плотности сахарозы по методу, описанному Brasitus и Keresztes [18] и Scalera и соавт. [23], с некоторыми модификациями. Белок определяли по методу Лоури [22].

Факторами воздействия являлись: минеральная вода «Нафтуса» (скважина 1-НО), водный раствор искусственного солевого аналога «Нафтуса» (ИСАН) [5], а также водный раствор одной из фракций органических веществ — битумов, по концентрации соответствующих нативной минеральной воде «Нафтуса»

Ферментные препараты прединкубировали с испытуемыми растворами в течение 30 мин при температуре 20°C при содержании белка базолатеральных мембран 500 мкг в 1 мл и соотношении гомогената с испытуемым раствором 1:30. АТФазную активность определяли по приросту неорганического фосфата (мкмоль $P_n \cdot \text{мг}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$), как описано ранее [2], содержание фосфора — по методу Fiske и Subbarow [20].

Активность α -амилазы выражали в миллиграммах крахмала, гидролизованного в течение 1 ч [9]. Протеолитическую активность определяли по методу Кунитца [21] и выражали через тирозиновый эквивалент. Для определения активности лейцинаминопептидазы использовали субстрат лейцин-*n*-нитроапирид. За единицу активности принимали количество фермента, гидролизующее 1 мкмоль субстрата за 1 ч при температуре 37°C и pH 8,5 [7]. Во всех случаях удельную активность выражали в единицах активности, приходящихся на 1 мг белка, содержащегося в пробе. Для получения каждого показателя использовали от 20 до 40 животных. Полученные результаты обрабатывали статистически с использованием критерия *t* Стьюдента и разностным методом.

Результаты и их обсуждение

Проведенные исследования показали, что минеральная вода «Нафтуса» вызывает снижение активности лейцинаминопептидазы на 16 % по сравнению с контролем (табл. 1). Действие минеральной воды обусловлено, по-видимому, ее неорганическими компонентами, так как ИСАН производит практически такое же ингибирование фермента (на 15 %). Лейцинаминопептидаза является металлоферментом и может быть чувствительна к ионному окружению. Фракция битумов не оказывает никакого действия на активность лейцинаминопептидазы. Ферменты α -амилаза и протениназа оказались не чувствительными к воздействию минеральной водой и ее компонентами, не было обнаружено достоверных изменений их активности под воздействием всеми тремя изучаемыми факторами.

Наибольшей чувствительностью к воздействию минеральной водой «Нафтуса» и ее компонентами обладает транспортная Na^+ , K^+ -АТФаза (см. табл. 1). При использовании нативной минеральной воды, ИСАН и битумов в концентрации, соответствующей таковой в минеральной воде, наблюдалась активация транспортной АТФазы на 23, 20 и 45 %, соответственно. Наиболее высокое активирование вызывали битумы (5–10 мг/л) — вещества, относящиеся к углеводородам парафинового ряда и обладающие гидрофобными свойствами (табл. 2). Известно, что в проявлении активности Mg^{2+} , Na^+ , K^+ -АТФазного липопротеинового комплекса определенную роль играют гидрофобные взаимодействия, вследствие которых происходят конформационные изменения и

Таблица 1. Влияние минеральной воды «Нафтуса» и ее компонентов на активность кишечных ферментов крыс ($M \pm m$)

Фермент	Удельная активность в контроле, ед/мг белка	Изменение ферментативной активности (Δ), % контроля		
		«Нафтуса»	Битумы	ИСАН
Na^+ , K^+ -АТФаза	$32 \pm 2,2$	+23 $P < 0,01$	+45 $P < 0,05$	+20 $P < 0,05$
Mg^{2+} -АТФаза	$146 \pm 13,3$	+5	+36 $P < 0,05$	-4
α -Амилаза	$116 \pm 10,7$	+4	+1	+1
Протеиназа	$5,1 \pm 0,47$	+1,6	-1,8	+5
Лейцинаминопептидаза	$2,5 \pm 0,25$	-16 $P < 0,01$	+1,5	-15 $P < 0,001$

может увеличиваться доступ субстрата АТФ и катионов к каталитическим центрам фермента [1]. Подобный эффект активации Na^+ , K^+ -АТФазы гидрофобными веществами достаточно хорошо известен и описан на примере детергентов [19, 20].

При разведении минеральная вода «Нафтуса» теряет активирующий эффект по отношению к Na^+ , K^+ -АТФазе, проявляемый нативной водой, и обнаруживает ингибирующее действие на фермент: 1 %-ный раствор воды «Нафтуса» вызывает ингибирование на 13 %, 0,1 %-ный — на 40 %, 0,01 %-ный — на 80 %. При таком разведении компоненты воды — ИСАН и битумы — утрачивают способность активировать Na^+ , K^+ -АТФазу. Так, битумы уже в концентрации 0,1 мг/л не обладают активирующим действием на фермент (см. табл. 2). По-видимому, в нативной минеральной воде действие ингибирующего фактора перекрывается активирующим эффектом ИСАН и битумов. Подобные данные о появлении ингибирующего свойства при разведении минеральной воды «Нафтуса» получены ранее на Na^+ , K^+ -АТФазе гомогената слизистой оболочки тонкой кишки [15]. Авторами установлено, что жирные кислоты в концентрациях, соответствующих таковым в разбавленной в 100—1000 раз минеральной воде «Нафтуса», значительно ингибируют Na^+ , K^+ -АТФазу слизистой оболочки тонкой кишки. По-видимому, не исключено, что жирные кислоты, которые легко могут транспортироваться через эпителиальный барьер в кровь, вносят свой вклад в ингибиторный эффект, наблюдаемый при одноразовой нагрузке крыс нативной минеральной водой «Нафтуса» [16]. По мнению некоторых авторов [17, 19], жирные кислоты с различной длиной цепи могут регулировать активность транспортной Na^+ , K^+ -АТФазы посредством воздействия на мембрану клетки. Так, жирные кислоты с корот-

Таблица 2. Влияние битумов минеральной воды «Нафтуса» на АТФазную активность слизистой оболочки тонкой кишки крыс

Показатель	Контроль	Воздействие битумами разной концентрации мг/л		
		0,1	1	5
Удельная активность Na^+ , K^+ -АТФазы ($M \pm m$)	30,5±2,8	30,2±2,8	37,2±1,9	38,7±1,9
Изменение активности (Δ), % контроля		-1,0	+22,0	+26,9
P		>0,05	>0,05	<0,05
Удельная активность Mg^{2+} -АТФазы ($M \pm m$)	156,9±14,2	156,2±14,0	223,9±13,3	213,0±16,7
Изменение активности (Δ), % контроля		-0,6	+42,7	+35,8
P		>0,05	<0,01	<0,05
Показатель	Контроль	Воздействие битумами разной концентрации, мг/л		
		10	15	20
Удельная активность Na^+ , K^+ -АТФазы ($M \pm m$)	30,5±2,8	44,1±2,9	32,6±2,9	28,0±2,8
Изменение активности (Δ), % контроля		+44,6	+8,8	-8,2
P		<0,01	>0,05	>0,05
Удельная активность Mg^{2+} -АТФазы ($M \pm m$)	156,9±14,2	215,7±15,8	200,9±16,8	156,0±13,2
Изменение активности (Δ), % контроля		+36,2	+28,0	-0,6
P		<0,02	>0,05	>0,05

Примечание. Число опытов составляет 12.

кой и длинной цепями угнетали Na^+ , K^+ -АТФазу микросомных мембран мозга, причем угнетающий эффект возрастал с удлинением углеводной цепи. Mg^{2+} -АТФаза не изменяет своей активности при воздействии минеральной водой и ИСАН. Битумная фракция в концентрации 5—10 мг/л активирует фермент на 36 %.

Таким образом, результаты, полученные нами в условиях *in vitro*, свидетельствуют о том, что отдельные компоненты минеральной воды «Нафтуса» обладают способностью изменять активность некоторых ферментов кишечника. Несмотря на низкую минерализацию воды (0,7 г/л), ее неорганические компоненты воздействуют на активность Na^+ , K^+ -АТФазы и лейцинаминопептидазы. Битумная фракция активирует транспортную Na^+ , K^+ - и Mg^{2+} -АТФазу базолатеральных мембран эритроцитов. Если действие нативной минеральной воды на лейцинаминопептидазу совпадает с эффектом ее ионного состава, то в случае Na^+ , K^+ -АТФазы это действие является более сложным, обусловленным многими ингредиентами минеральной воды. В условиях целостного организма ответ на воздействие минеральной водой может не совпадать с таковым, полученным в условиях *in vitro*, поскольку обусловлен не только непосредственным контактом с компонентами воды, но и нервно-рефлекторной и нейрогуморальной регуляцией.

DIGESTIVE AND TRANSPORT ENZYMES OF SMALL INTESTINE UNDER THE EFFECT OF LOW-MINERALIZED WATER NAFTUSYA AND ITS COMPONENTS

G. L. Vavilova, T. F. Kastrikin

Mineral water Naftusya and its components: macrosalt analog and bitumen fraction have been studied *in vitro* for their effect on enzymes of the mucous small intestine membrane: Mg^{2+} and Na^+ , K^+ -ATPase, α -amylase, proteinase and leucine aminopeptidase. It is shown that certain components of mineral water are able to change activity of some enzymes. Transport Na^+ , K^+ -ATPase proved to be the most sensitive to the action of studied factors. Mineral water and bitumen fraction induced an increase of the enzyme activity by 23, 20 and 45 %, respectively. Mineral water and its salt analog induced inhibition of leucine aminopeptidase: its activity decreased by 16 and 15 %, respectively. Digestive enzymes: α -amylase and proteinase are resistant to the action of mineral water and its components.

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

1. Болдырев А. А. Биологические мембраны и транспорт ионов.— М.: Изд-во Моск. ун-та.— 1985.— 208 с.
2. Вавилова Г. Л., Кирсенко О. В., Кочерга В. И. Влияние фосфолипидов A_2 яда пчелы и кобры на фосфолипидный состав и Na^+ , K^+ -АТФазную активность синапсом // Укр. биохим. журн.— 1985.— 57, № 6.— С. 28—34.
3. Воротынцева Т. И., Бессмертная Л. Я., Зильберман М. И. и др. Протеазы эритроцитов тонкого кишечника свиньи. Роль аминопептидазы N в транспорте дипептидов // Биохимия.— 1984.— 49, вып. 11.— С. 1854—1962.
4. Горюнова Т. И., Краснолуцкая Р. Ф. Влияние минеральных вод на амилалитическую активность слизистой тонкого кишечника // Питьевые минеральные воды.— Пятигорск, 1976.— С. 15—16.
5. Есипенко Б. Е. Состав и свойства минеральной воды «Нафтуса».— Киев: Наук. думка, 1978.— 157 с.
6. Есипенко Б. Е. Физиологическое действие минеральной воды «Нафтуса».— Киев: Наук. думка, 1981.— 216 с.
7. Иванова Н. М., Ваганова Т. И., Стронгин А. Я., Степанов В. М. Выделение и свойства лейцинаминопептидазы из *Aspergillus ogryzae* // Биохимия.— 1977.— 42, вып. 5.— С. 843—849.
8. Кирсенко О. В., Вавилова Г. Л. Влияние детергентов на Na^+ , K^+ -АТФазу и ее сольubilization // Укр. биохим. журн.— 1972.— 44, № 1.— С. 125—132.
9. Колб В. Г., Камышников В. С. Клиническая биохимия.— Минск: Беларусь.— 1976.— 212 с.
10. Макарова А. А. Пищеварительная функция тонкого кишечника, свободные аминокислоты кишечного сока и их изменение под влиянием минеральных вод: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.— Ужгород, 1975.— 25 с.