

Аналіз фізіологічної активності органічних сполук озокериту, отриманих його біотрансформацією мікроорганізмами води «Нафтуса»

Изучалась возможность получения физиологически активных веществ путем биотрансформации природного углеводородного сырья — озокерита с помощью сапрофитных групп микроорганизмов, выделенных из лечебной воды «Нафтуса». Показано, что микроорганизмы метаболизируют озокерит с образованием целого спектра водорастворимых веществ, среди которых найдены активаторы и ингибиторы Na^+ , K^+ -АТФазы, стимуляторы процесса желчеобразования. Сделан вывод, что с помощью микроорганизмов, заселяющих воду «Нафтуса», можно получить из озокерита органические вещества, обуславливающие физиологическую активность этой лечебной воды.

Вступ

Відомо, що органічні речовини (ОР) є практично у всіх мінеральних водах, але при наявності в них достатньої кількості солей, чи мікроелементів, котрими можна пояснити фізіологічні ефекти води, на значення ОР просто не звертали уваги [3]. Водночас Вернадський писав: «Органічні речовини мінеральних вод в буквальному розумінні слова terra incognita. Не дивлячись на малу їх кількість бальнеологічне значення може бути величезним» [2]. Серед різноманітних типів мінеральних вод особливе місце посідають так звані слабомінералізовані води, яскравим представником яких є трускавецька «Нафтуса». Вказаний тип води характеризується дуже низькою мінералізацією («прісні»), внаслідок чого їх лікувальна дія, встановлена клінічно, не може бути пояснена йонним чи мікроелементним складом. Водночас вони містять ОР (бітуми, гуміни, низькомолекулярні жирні кислоти, речовини типу фенолів тощо) в досить значних концентраціях (10—20 мг/л і більше). Встановлено також присутність у слабомінералізованих водах численної та різноманітної сапрофітної (автохтонної) мікрофлори, видовий склад якої відповідає складу ОР у цих водах [5].

Поширеність води типу «Нафтуса» на Прикарпатті тісно пов'язана з наявністю в надрах бітумінозних порід, а в минулому частих розробок такого мінералу, як озокерит (Трускавець, Борислав, Дзвіняч тощо). Фізіологічні дослідження водних витяжок з озокериту середньоазіатського родовища показали наявність у них біологічно активних речовин (БАР) [1], а мікробіологічне вивчення — присутність сапрофітної мікрофлори і, зокрема, вуглеводеньокислюючих мікроорганізмів (ВОМ) [7], що може свідчити про можливість метаболізму в надрах гідрофобних речовин озокериту з утворенням водорозчинних БАР.

Метою нашого дослідження було вивчення можливості біотехнологічного отримання з озокериту шляхом його трансформації за допомогою ВОМ води «Нафтуса» фізіологічно активних водорозчинних речовин.

Методика

Для дослідження застосовувався жильний озокерит Бориславського рудного управління, який постачається з метою озокеритотерапії на курорт Трускавець. Збагачену культуру ВОМ отримували багаторазовим пересіванням мікробів «Нафтусі» на селективному середовищі Таусона, а сульфатредуючих мікроорганізмів (СРМ) — на середовищі Штурм [6]. Подрібнений стерильний озокерит (10 г) клали в літрову колбу, заливали стерильним штучним сольовим аналогом «Нафтусі» [10] і засівали ВОМ чи СРМ в кількості 2,5 млн клітин/мл. Інкубацію ВОМ з озокеритом провадили за аеробних умов СРМ — в анаеростаті при температурі 31 °С. Контролем були аналогічні середовища без мікроорганізмів. Після закінчення терміну інкубації вміст колб фільтрували на установці ФМ 02—1000 з мембраною «Ріпор-4», заморожували шаром 1 см на стінки флаконів для кровозамінників і ліофілізували на установці LZ.9.2.

Спектр ОР у сухому залишку досліджували за допомогою колоночної гель-хроматографії на нейтральному сефадексі G-10 (довжина колонки 50 см, діаметр — 1,5 см, швидкість елюції 10 мл/год, елюєнт — 0,01 моль/л бікарбонату амонію) і реєстрували оптичну щільність на електронному самописці КСП-4 при довжині хвилі 230 нм. Окремі фракції збирали за допомогою пневматичного колектору і повторно ліофілізували. Біологічну активність отриманих речовин вивчали на гомогенатах слизової оболонки тонкого кишечника та кори нирок, оцінюючи їх вплив на активність чутливої до іонів Na та K аденозинтрифосфатази (Na^+ , K^+ -АТФази) у концентраціях від 0,0001 до 1,0 мг/мл. Фізіологічну активність досліджували реєстрацією холерезу у наркотизованих щурів при внутрішньовенному та інтрадуоденальному введенні речовин в дозі 5 мг/кг.

Результати та їх обговорення

Результати свідчать, що в озокериті дійсно містяться водорозчинні ОР, які екстрагуються з нього штучним аналогом «Нафтусі» (20 мосм, майже дистильована вода) і після ліофілізації можуть бути отримані в сухому вигляді. Вміст Сорг у сухому залишку становить 15 %. При гель-хроматографії ліофілізату водного екстракту озокериту ОР виходять з колонки двома окремими піками, які різняться між собою молекулярними масами. Перша фракція виходить у вільному об'ємі і її молекулярна маса дорівнює 700 Да. Об'єм виходу другої фракції відповідає 320 Да (рис. 1). Після чотиритижневої інкубації ВОМ, чи СРМ з озокеритом змінюється як кількісний, так і якісний вміст ОР у водному середовищі. Крім збільшення вмісту речовин, властивих водному екстракту озокериту, з'являються сполуки з молекулярною масою 200, 125, 70 і 60 Да. Стосовно речовин, відношення об'єму виходу яких до вільного об'єму становить більше 3,0; слід зазначити, що така аномальна спорідненість до сефадексів характерна лише ароматичним сполукам.

На нашу думку результати хроматографічного аналізу однозначно вказують на метаболізм гідрофобної вуглеводневої сировини (в даному випадку озокериту) з утворенням полярних водорозчинних сполук. Хроматограми фільтрованих ліофілізатів культуральних середовищ дуже подібні до отриманих при гель-хроматографії за аналогічних умов ліофілізатів води «Нафтуса» [4]. Тому, з нашої точки зору, в цьому випадку моделюються природні процеси, котрі відбуваються в надрах підчас формування мінеральної води.

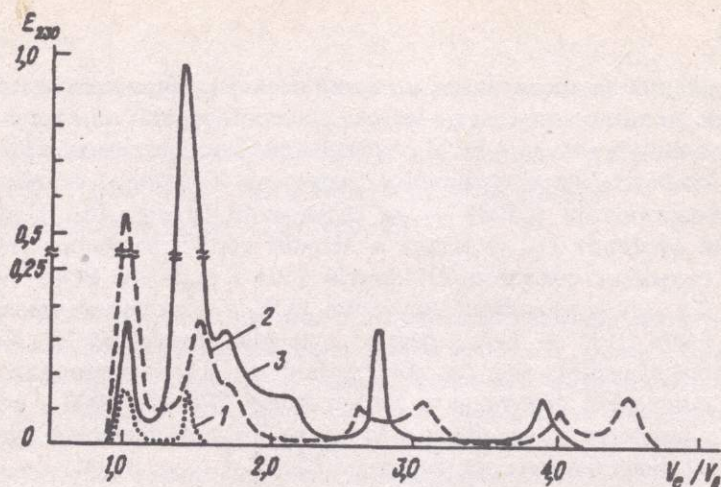


Рис. 1. Хроматограма водорозчинних органічних речовин озокериту (1) і гідрофільних продуктів його біотрансформації (2), а також сульфатредукуючих мікроорганізмів (3) води «Нафтуса».

При біотестуванні ліофілізату водного екстракту озокериту на препаратах Na^+ , K^+ -АТФази слизової оболонки тонкої кишки, чи кори нирок показано, що ці речовини мають виключно інгібіторні властивості. Гальмування активності ферменту дозозалежне, максимально проявляється в концентрації 1 мг/мл і зберігає спрямованість ефекту аж до концентрації

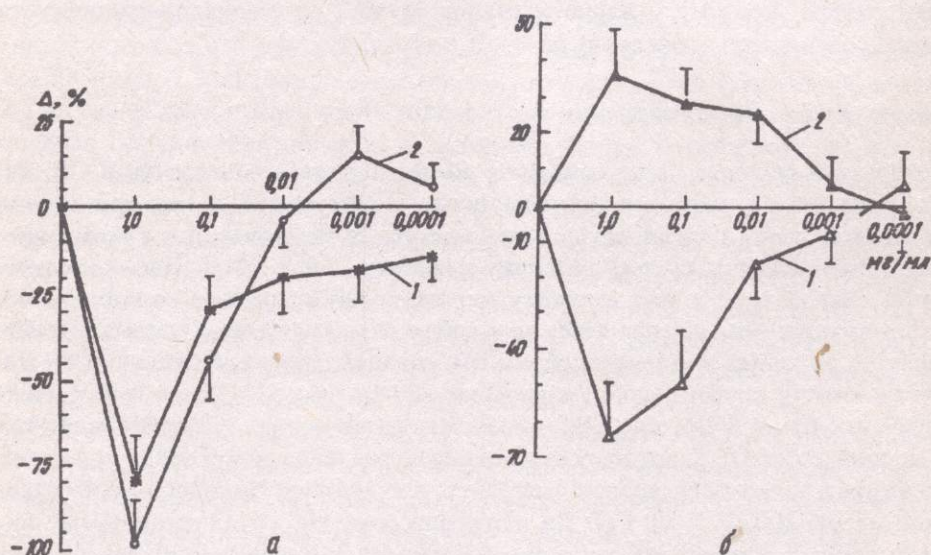


Рис. 2. Вплив водорозчинних сполук озокериту (1) та продуктів його біотрансформації (2) на активність Na^+ , K^+ -АТФази (, %) слизової оболонки тонкої кишки (а) та кори нирок (б).

0,001 мг/мл (рис. 2, а, б). Слід зазначити, що ВОМ-метаболіти озокериту діють дещо відмінно. Так, в дозах 1,0 і 0,1 мг/мл вони ще сильніше інгібують іонний транспорт в епітеліюцитах тонкої кишки, в концентрації 0,01 мг/мл не діють, а в дозах 0,001 і 0,0001 мг/мл навіть незначно стимулюють активність ферменту. Такою ж інгібіторною активністю володіють і кожна з окремих фракцій ОР, отриманих шляхом хроматографічного розділення і наступної ліофілізації (рис. 3). При тестуванні ВОМ-мета-

болітів озокериту на ферментному препараті кори нирок у всіх дозах спостерігається виключно стимулюючий ефект.

У результаті фракціонування продуктів мікробної трансформації озокериту в достатніх для дослідження кількостях були отримані лише перших три фракції. Перша фракція виявилася мало активною і мала тільки інгібиторний ефект, друга — виключно стимулюючу дію (до 100 %), а третя — в концентрації 1 мг/мл гальмувала активність Na^+ , K^+ -АТФази епітеліоцитів тонкої кишки. У всіх наступних розведеннях стимулювала активність ферменту (рис. 4,а). Стосовно Na^+ , K^+ -АТФази кори нирок фракції діяли більш однотипно (рис. 4,б). Друга і третя фракції в дозі 1 мг/мл майже на 100 % гальмували активність ферменту, а в концентрації 0,1 мг/мл на 100—150 % стимулювали її.

Здатність ВОМ-метаболітів озокериту проявляти активність за умов цілісного організму визначали по реакції печінки, зокрема, за зміною холерезу у відповідь на введення водного розчину першої і другої фракції. Речовини вводили наркотизованим щурам, внутрішньовенно, чи в порожнину тонкої кишки в дозі 5 мг/кг. На рис. 5 наведені криві, які ілюструють зміни швидкості жовчотоку під впливом указаних речовин. Видно, що перша фракція викликає при обох способах введення незначний приріст швидкості секреції жовчі протягом 30—45 хв, потім процес дещо загальмовується. Друга фракція призводить до стійкого приросту швидкості жовчовиділення через 1 год після

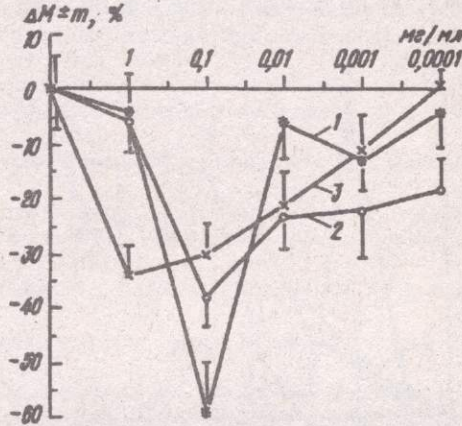


Рис. 3. Вплив фракцій гідрофільних сполук озокериту на активність Na^+ , K^+ -АТФази ($M \pm m$, %) слизової оболонки тонкої кишки (1, 2) та кори нирок (3).

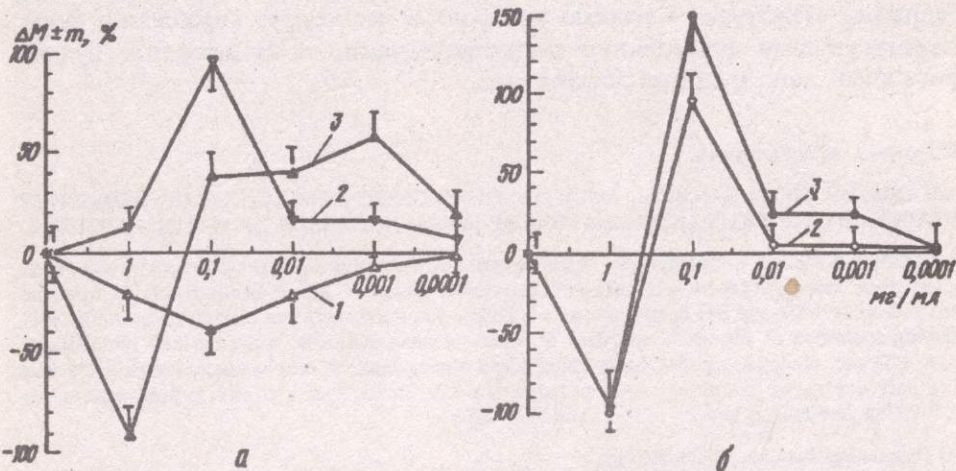


Рис. 4. Зміна активності Na^+ , K^+ -АТФази ($M \pm m$, %) слизової оболонки тонкої кишки (а) та кори нирок (б) під впливом окремих фракцій мікробних метаболітів озокериту: 1 — I фракція, 2 — II фракція, 3 — III фракція.

початку введення речовини. Ці відмінності в реакції печінки на першу та другу фракції можливо зумовлені їх протилежною дією на Na^+ , K^+ -АТФазу клітин печінки, як це встановлено для клітин кишечника та нирок. Очевидно, що в подальшому необхідно пов'язати функціональні та біохімічні зміни, котрі відбуваються під впливом мікробних метаболітів озокериту, на одному і тому ж об'єкті.

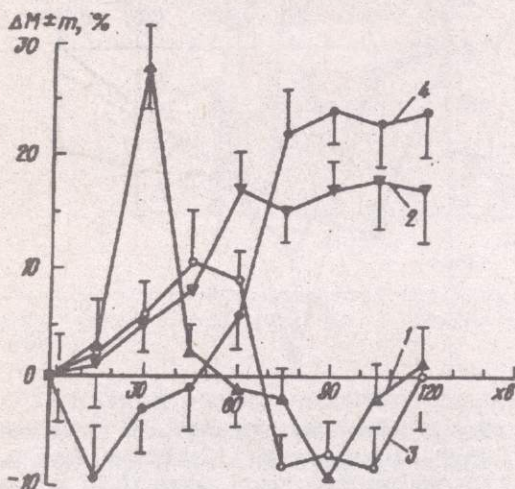


Рис. 5. Зміна швидкості жовчотоку ($\Delta M \pm m$, %) при інтрадуоденальному (1, 2) та внутрішньовенному (3, 4) введенні мікробних метаболітів озокериту: 1, 3 — I фракція; 2, 4 — II фракція.

Таким чином речовини, отримані після мікробної трансформації озокериту володіють різноманітним спектром біологічної активності. Окрім інгібіторів ВОР синтезують і речовини-активатори Na^+ , K^+ -АТФази.

Як було показано раніше, для води «Нафтуса» та її ОР властива інгібіторна дія на Na^+ , K^+ -АТФазу [9]. Однак при зберіганні води за умов її контакту з киснем, «Нафтуса» не тільки втрачає здатність пригнічувати даний фермент, але навіть набуває властивість його активатора [11]. Слід пригадати, що в присутності кисню (аеробні умови) активуються також численні ВОР, наявні в цій воді [8]. Оскільки культивування ВОР з озокеритом проводилося за аеробних умов є підстави вважати, що нам вдалося в деякій мірі змодельовати процеси, які відбуваються підчас звичайного зберігання «Нафтусі». Стосовно метаболітів озокериту, вироблених сульфатредукуючими анаеробними мікроорганізмами, то їх вивченню будуть присвячені наші наступні дослідження.

S.V.Ivasivka, M.S.Yaremenko

ANALYSIS OF PHYSIOLOGICAL ACTIVITY OF ORGANIC SUBSTANCES OF OZOKERITE OBTAINED BY ITS BIOTRANSFORMATION BY MICROORGANISMS OF WATER NAFTUSYA

A possibility to obtain physiologically active substances by means of biotransformation of natural carbohydrate raw material-ozokerite using the saprophyte groups of microorganisms isolated from the medicinal water Naftusya has been studied. It is shown that microorganisms metabolise ozokerite with following formation of the whole spectrum of water-soluble substances, activators and inhibitors of Na , K -ATPase, cholopoiesis stimulators being found among them. A conclusion has been made that using microorganisms inhabiting water Naftusya one can obtain from ozokerite organic substances conditioning physiologic activity of this medicinal water.

O.O.Bogomolets Institute of Physiology,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Байричев Ч.Б. Озокерит в медицине. — Ашхабад: Туркменистан, 1972. — 226 с.
2. Вернадский В.И. История минералов земной коры. Т. II. История природных вод. Ч. I. — М.: Медгиз. — Вып. 1, 2, 3. — ОНТИ, 1933—1936.
3. Иванов В.В., Невраев Г.А. Классификация подземных минеральных вод. — М.: Недра, 1964. — 168 с.
4. Ивасивка С.В. Новые методологические подходы к идентификации вод типа «Нафтуса» и результаты их применения для оценки режима эксплуатации трускавецкого месторождения // Вопр. курортологии. — 1993. — № 1. — С. 49—53.
5. Крашенинникова С.А. О микрофлоре минеральных вод: Информационно-методические материалы по вопросам гидрогеологии и бальнеотехники лечебных вод и грязей. — М., 1962. — Вып. 5. — С. 1—10.
6. Методические рекомендации по микробиологическому исследованию лечебных минеральных вод. — Одесса, 1984. — С. 18—20.
7. Розанова Е.П., Штурм Л.Д. Видовой состав микроорганизмов, выделенных из Бориславского озокеритового месторождения, и их отношение к компонентам нефти и озокерита // Микробиология. — 1964. — 33, вып. 1. — С. 126—132.
8. Состав и свойства минеральной воды «Нафтуса» / Под ред. Б.Е.Есипенко. — К.: Наук. думка, 1978. — 157 с.
9. Яременко М.С., Ивасивка С.В. и др. Физиологические основы лечебного действия воды «Нафтуса». — К.: Наук. думка, 1989. — 144 с.
10. Яременко М.С., Попович И.Л., Бутусова И.А. Влияние воды «Нафтуса» на кислотосекреторный аппарат желудка у собак // Физиол. журн. — 1986. — 32, № 5. — С. 538—545.
11. Яременко М.С., Загороднюк В.П., Билас В.Р., Баев Е.Я., Харламова О.Н. Оценка биологической активности минеральной воды «Нафтуса» // Физиол. журн. — 1988. — 34, № 6. — С. 80—85.

Ін-т фізіології ім.О.О.Богомольця
НАН України, Київ

Матеріал надійшов
до редакції 24.01.94