



МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ
„Проф. Д-р Параскев Стоянов“ – Варна
ФАКУЛТЕТ ПО ФАРМАЦИЯ
КАТЕДРА ПО БИОХИМИЯ, МОЛЕКУЛНА МЕДИЦИНА И
НУТРИГЕНОМИКА

ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД

за присъждане на образователната и научна степен „доктор“
по научната специалност „Биохимия“

ПРОУЧВАНЕ НА МОЛЕКУЛНИТЕ МЕХАНИЗМИ НА
ДЕЙСТВИЕ НА СЯРАСЪДЪРЖАЩИТЕ МИНЕРАЛНИ ВОДИ
ОТ ВАРНЕНСКИЯ БАСЕЙН ВЪРХУ ЧОВЕШКИЯ
МЕТАБОЛИЗЪМ С ОГЛЕД ИЗПОЛЗВАНЕТО ИМ КАТО
ЛЕЧЕБНО-ПИТЕЙНО СРЕДСТВО

Тодорка Димова Сократева

Научен ръководител: проф. Диана Иванова, д.б.н.

ВАРНА

2020

СЪДЪРЖАНИЕ

I. ВЪВЕДЕНИЕ.....	1
II. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР	2
1. Актуалност и значимост на научната проблематика.....	2
2. Понятие за минерализирани води. Видове минерални води.....	3
2.1. Класификационни системи за минерални води	5
3. Терапевтични и биохимични ефекти при прием на различни видове минерални води	14
3.1. Олигоминерални и слабоминерализирани води.....	16
3.2. Радиоактивни минерални води	16
3.3. Силициеви минерални води	17
3.4. Съдържащи сяра минерални води – сулфатни и сулфидно-сероводородни.....	18
3.5. Флуорни минерални води.....	28
3.6. Солени (хлоридно-натриеви)-бромо-йодни води	29
3.7. Солени води (хлоридно-натриеви) минерални води	29
3.8. Хлоридни минерални води.....	30
3.9. Калциеви минерални води.....	30
3.10. Магнезиеви минерални води.....	30
3.11. Въглекисели, хидрогенкарбонатни и бикарбонатни минерални води.....	31
3.12. Минерални води с желязо и арсен.....	33
4. Физико-химични характеристики на минералните води от Североизточен Черноморски басейнов район по литературни данни.....	33
5. Ефекти от прием на минерални води със състав подобен на Варненската минерална вода.....	34
5.1. Общи сведения	34
5.2. Интервенции с хора.....	36
5.3. Експериментални модели с животни	37
6. Питеен метод. Количество на минералната вода при различни заболявания.	38
6.1. Количество на минералната вода в проучвания с клинично здрави доброволци.....	42
7. Анализ на състоянието на изследванията по проблема.....	42
8. Обосновка на дисертационността на темата.....	45
III. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	48
IV. ХИПОТЕЗИ И ПОДХОДИ ЗА ПОСТИГАНЕТО НА ЦЕЛТА И ЗАДАЧИТЕ	49
1. Подходи за постигане на изследователските цели, включително и интердисциплинарност на дисертационния труд.....	50
V. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	52
1. Изследване на физико-химичния състав на минерална вода.....	52
2. Провеждане на проучване със здрави доброволци	54

2.1. Преинтервенционален етап	54
2.2. Интервенционален етап	56
2.3. Постинтервенционален етап	57
2.4. Събиране на проби	57
3. Анализ на класически биохимични маркери	58
3.1. Класически клиничко-биохимични показатели в кръвен серум	58
3.2. Класически клиничко-биохимични показатели в урина	59
3.3. Изчисляване на индекс на гломерулна филтрация на бъбреците (ИГФ) мл/мин	59
4. Определяне на оксидативен статус и антиоксидантна защита чрез оценка на специфични биохимични маркери.....	60
4.1. Показатели в кръвена плазма/серум, оценяващи генерирането на активни кислородни форми: малонов диалдехид (МДА), реактивни кислородни метаболити (РКМ).....	60
4.2. Показатели в кръвен серум, оценяващи антиоксидантната защита: концентрация на общи тиоли, общ и редуциран глутатион	63
5. Анализ на маркери за възпаление в кръвен серум.....	66
5.1. Определяне концентрацията на ICAM-1	66
5.2. Определяне концентрацията на VCAM-1	67
6. Изследване на генна експресия на избрани гени в периферни мононуклеарни клетки (РВМС) във връзка с оценка на антиоксидантния статус и противозъпалителния отговор	67
6.1. Изолиране на РВМС от пълна кръв.....	68
6.2. Изолиране на РНК.....	69
6.3. ДНКазно третиране на тотална РНК	69
6.4. Обратна транскрипция – RT-PCR.....	69
6.5. Real Time qPCR.....	70
7. Статистическа обработка и графично представяне на данните.....	71
VI. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ.....	72
1. Определяне на физико-химичен състав на минерална вода Варненски басейн	72
1.1. Подбор на водоизточниците.....	72
1.2. Пробовземане	73
1.3. Резултати от анализ на класически физико-химичния състав на минерална вода по показатели, включени в Наредба 9/16.03.2001 г.	75
1.4. Резултати от анализ на целеви физико-химични параметри	76
2.5. Резултати от мониторинг на минерална вода.....	77
2.6. Допълнителни данни.....	78
2.7. Дискусия на резултатите от физико-химичния анализ на минерална вода от Североизточен Черноморски басейнов район	79
2.8. Заключение	90
2. Резултати от анонимно анкетно проучване, проведено сред жители на гр. Варна и резултати от анкетно проучване, проведено сред доброволците в изследването относно	

режима на наливане – честота, количество и съхранение на минералната вода, и установяващо причините за наливане на минерална вода	91
2.1. Дискусия на резултатите от анкетните проучавания относно режима на наливане - честотата, количество и съхранение на минералната вода, както и на причините за наливане на минерална вода.....	97
2.2. Заключение	101
3. Интервенция с прием на минерална вода	101
3.1. Резултати от анкетно проучване за ефектите от приема на минерална вода	101
3.2. Дискусия на резултатите от проведеното анкетно проучване за ефектите от приема на минерална вода.....	102
3.3. Заключение	104
3.4. Ефект на минералната вода върху антропометричните показатели	104
3.5. Ефект на минералната вода върху нивата на класически биохимични маркери в кръв	107
3.6. Ефект на минералната вода върху нивата на класически биохимични показатели в урина	108
3.7. Ефект на минералната вода върху функцията на бъбреците	109
3.8. Сравнение на резултатите по групи в зависимост от предпочитания източник на минерална вода.....	110
3.9. Дискусия на резултатите от анализа на класическите биохимични маркери в кръв и урина.....	113
3.10. Заключение	116
4. Ефект на минералната вода върху специфични биохимични и молекулярно генетични маркери от оксидативен статус и възпаление в кръвен серум.....	117
4.1. Ефект на минералната вода върху маркери на оксидативен статус в кръвен серум.....	117
4.2. Ефект на минералната вода върху маркери на възпалението	118
4.3. Корелация между маркери на антиоксидантен статус и маркери за оксидативен стрес в плазма	119
4.4. Ефект на минералната вода върху експресията на гени, свързани с възпалението и редокс баланса в изолирани РВМС клетки.....	119
4.5. Сравнение на резултатите от анализирани специфични маркери в зависимост от предпочитания източник на минерална вода	120
4.6. Дискусия на резултатите от изследваните специфични биохимични и молекулярно-генетични маркери	122
4.7. Заключение	126
5. Ефекти на минералната вода в зависимост от начина на живот	127
5.1. Влияние на ИТМ върху ефектите от приема на минерална вода.....	127
5.2. Влияние на физическата активност върху ефектите от приема на минерална вода.....	129
5.3. Влияние на тютюнопушенето върху ефектите от приема на минерална вода.....	130
5.4. Влияние на алкохолната консумация върху ефектите от приема на минерална вода.....	131

5.5. Дискусия.....	132
5.6. Заключение	136
VII. ИЗВОДИ И ПРИНОСИ.....	137
1. Изводи	137
2. Приноси.....	139
VIII. ИЗПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА	143
IX. ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД....	137
X. ФИНАНСИРАНЕ.....	160

СПИСЪК НА ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ

ВФА – висока физическа активност	eNOS – ендотелна азотен оксид синтаза
НМ - хиломикроли	GCL – глутамат-цистеин лигаза
К+АТФ – АТФ зависими калиеви канали	GSH – редуциран глутатион
РВМС – периферни мононуклеарни кръвни клетки	GSSG – окислен глутатион
А – консумиращи високоалкохолни напитки	hs-CRP – high sensitive C-reactive protein високочувствителен С-реактивен протеин
АКФ – Активни кислородни форми	ICAM – 1 – междуклетъчна адхезионна молекула
АТФ – аденозин трифосфат	EFSA – Европейска асоциация по безопасност на храните
ГГТ - гама-глутамил трансфераза	ERK – екстрацелуларна сигнална каскада
ГМК – гладко мускулни клетки	HDL – липопротеинови комплекси с висока плътност
ЕДТК – етилендиаминтетраоцетна киселина	iNOS – индуцируема азотен оксид синтаза
ИТМ – индекс на телесната маса	LDL – липопротеинови комплекси с ниска плътност
МДА – малонов диалдехид	MAPK – митоген активирана протеин киназа
НА – некосумиращи и рядко консумиращи високоалкохолни напитки	MBST – меркаптопируват сулфотрансфераза
НП – непушачи	NF-kB - ядрен фактор капа-В
НФА – ниска физическа активност	PAPS – 3-фосфоаденозин-5-сулфофосфат
П – пушачи	PBS – Phosphate buffered saline (изотоничен фосфатен буфер)
РКМ – реактивни кислородни метаболити	PCR – polymerase chain reaction (полимеразна верижна реакция
РКМ – реактивни кислородни метаболити	PI3K/Akt - фосфатидил-инозитол 3- киназен сигналнен път и Akt/протеин киназа В
СЕК – съдови ендотелни клетки	Real-Time PCR – PCR в реално време
ССЗ – сърдечно съдови заболявания	RT-PCR – Reverse Transcription PCR (обратна транскрипция – PCR)
ССМВ - сярасъдържаща минерална вода	
ССС – сярасъдържащи съединения	
ФДЕ – фосфодиестераза	
цАМФ – цикличен аденозин монофосфат	
цГМФ - цикличен гуанозин монофосфат	
CBS – цистатионин бета-синтаза,	
CSE* - цистатионин гама-лиаза (същият ензим се съкращава също Cse, CGL СТН, СТТ)	
TGF-β - трансформиращ растежен фактор-бета	
TNF-α - туморен некрозис фактор-алфа	
VCAM – 1 – съдова клетъчна адхезионна молекула	
VLDL – липопротеинови комплекси с много ниска плътност	
WHO – Световна здравна организация	

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Научните проучвания върху факторите, влияещи на човешкото здраве, се ограничават най-вече до начина на живот, влиянието на храната, физическата активност, фактори като социален статус, тютюнопушене и други. Приемът на вода се разглежда предимно от гледна точка на осигуряване на водния баланс и науката за хранене не отчита в достатъчна степен приема на макро-и микроелементи в състава на питейните води. Лечебните ефекти на използваните за питейни нужди минерални води се приемат като даденост и оценката им е базирана на емпирични наблюдения, свързани предимно със симптомите на различни заболявания. Към момента данните за проведени интервенции с прием на минерални води при хора са твърде оскъдни и противоречиви.

Минералните води на Северното Черноморие съставляват почти една четвърт от общия хидроминерален ресурс на България. Оскъдни са данните, както от експериментални модели, така и от проучвания при хора, за биологичните ефекти на съдържащи сероводород и разтворими сулфиди минерални води, каквито са тези в Североизточен черноморски район. В същото време хиляди хора използват активно за питейни нужди тези води. Това обуславя нуждата от систематично научно изследване върху молекулните механизми на ефектите от приема на минерални сярасъдържащи води при хора и дава възможност за получаването на оригинални данни за ефекта върху човешкия метаболизъм на сярасъдържащите минерални води като лечебно-питейно средство.

II. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

1. Актуалност и значимост на научната проблематика

България е една от страните в Европа с най-големи ресурси от минерални води, позволяващи различно приложение (Национална стратегия за управление и развитие на водния сектор, 2012). На сравнително неголямата ѝ територия от 111 000 кв. км. се наброяват над 240 находища на минерални води и на води с питейни качества с общ дебит, надхвърлящ 3100 L/s (Владева и Бошев, 2011). В България практически са застъпени почти всички познати в природата минерални води според физикохимичните им свойства: по-слабо и по-силно минерализирани хидрокарбонатни, сулфатни, хлоридни; натриеви, калциеви, магнезиеви; съдържащи лечебни газове – въглекисели, сулфидни, радонови; с биологично активни микроелементи – силициеви, флуорни, йодно-бромни, желязосъдържащи и др. (Владева и Костадинов 2007). Тези води се използват за балнеолечебни, лечебно-питейни и битови нужди.

На територията на град Варна се намират 12 хидротермални източника с температура на минералните води от 30 до 50 °C, с общ дебит 312 L/s. Водите са слабо минерални, хидрокарбонатно-хлоридно-натриеви, със слабо алкална реакция (pH 7,5) и с нормално съдържание на флуор. Всички тези минерални води са с приятни питейни вкусови качества и с различна твърдост – от меки до умерено твърди (Стоянова, 2012). Находищата на минерална вода в район "Варненски басейн" са от еоцения малмо-валанжски водоносен хоризонт (Приложение № 2 към Закона за водите). Към момента съставът на минералните води в региона на гр. Варна е недостатъчно проучен. Периодично се провежда изискваният от Законодателя санитарно-микробиологичен контрол. Слабо са проучени нивата на химични елементи като метали с преходна валентност (барий, кадмий, хром, никел, антимон и др.), неметали като селен, бор, силиций и техни съединения като метасилициева киселина.

Минералната вода е богата на макро и микроелементи, присъстващи в усвоим вид, често покриващи дневните нужди на индивида, независимо от приема на храна. В този смисъл ефектът от приема на минерални води за питейни цели се оказва съизмерим с този на отделни храни. Например, някои видове минерални води могат да имат съществен принос в дневния внос на калций и магнезий и да окажат благоприятен ефект за поддържане на нормален костен метаболизъм, водно-електролитен баланс и за регулация на кръвното налягане (Toxqui and Vaquero, 2016). В някои случаи, при наличие на коморбидност, приемът на минерална вода с питейно-лечебна цел може да има и неблагоприятен ефект върху здравето. В същото време

минералните води на територията на гр. Варна се използват активно за питейни нужди от хиляди хора.

Минералните води са огромен природен ресурс, чието използване предстои да се разширява в бъдеще пред вид ограничените запаси от чиста питейна вода и повишеното потребление. Достъпът до суровини и чиста вода вече не може да се приема за даденост. Инвестициите в иновации в помощ на една екологосъобразна икономика – икономика в синхрон с естествената природна среда са специален приоритет на Рамкова програма на ЕС за научни изследвания и иновации Хоризонт 2020. Иновациите в областта на проучването на водите са засегнати в поне две от седемте приоритетни предизвикателства на Програмата, при които целеви инвестиции в научни изследвания и иновации във връзка с проучване на водите могат да окажат реално въздействие от полза за гражданите: здравеопазване, демографски промени и благосъстояние; продоволствена сигурност, устойчиво земеделие и горско стопанство, мореплавателски и морски изследвания и изследвания във вътрешни води, и биоикономика.

Минералните води в Северобългарското Черноморие съставляват почти една четвърт от общия хидроминерален ресурс на България. Голяма част от тях съдържат сероводород и разтворими сулфиди. Липсват данни за биологичните ефекти на минералните води, съдържащи сероводород и разтворими сулфиди, каквито са водите във Варненския басейн. Неизяснени остават молекулните механизми на ефекта на минералните води върху човешкото здраве. Имайки предвид огромното разнообразие от минерални води по отношение на физико-химичните им характеристики, може да се очаква, че ефектите върху човешкото здраве на тези води са също така многостранни и разнообразни.

Проучването върху състава и биологичните ефекти на тези минерални води ще допринесе за разширяване на научното познание чрез получаване на нови данни за природните ресурси от минерални води в района на гр. Варна и механизмите на повлияване на техните ефекти върху човешкото здраве чрез директен прием.

2. Понятие за минерализирани води. Видове минерални води.

Минералните води са тези води, които чрез разтворените в тях соли, газове и топлина оказват благоприятен физиологичен ефект върху човешкото тяло. Разнообразието им се дължи на сложната геоложка структура, интензивна нео-тектонична активност и на зависимия от тях състав на циркулиращата метеорна вода (Shterev and Zagorchev, 1996). Първият химичен анализ на минерална вода в България е извършен през 1881 г. в гр. София. София, както Рейкявик (Исландия) и Будапеща (Унгария) е една от трите европейски столици, изградена в

близост до природен източник на термална вода (Benderev et al., 2016). Минералните води на България са необятна възможност за развитие на съвременен спа-туризъм, а бутилирането на българските минерални води е печеливш бизнес, както на територията на страната, така и извън нея. Въпреки че през 60-те години на миналия век чрез сондиране са разкрити различни видове минерални води с ценни качества и свойства, използването им днес е все още хаотично, а не въз основа на задълбочени научни проучвания върху състава, качествата и свойствата им.

„Природна минерална вода“ означава „микробиологично чиста вода“, без наличие на основните показатели за замърсяване (паразити и патогенни микроорганизми, ешерихия коли и фекални стрептококи, спори на сулфитредуциращи анаероби, псевдомонас аеругиноза) (Directive 2009/54/EC). Характеристиките на природните минерални води се доказват чрез различни изпитвания (Quattrini et al., 2016), които включват:

- геоложки и хидроложки характеристики - подробно описание на мястото на водосбор, естеството на терена, стратиграфия на хидрогеоложкия слой и водосборните операции;
- физични, химични и физико-химични характеристики - дебит, температура на извора, сух остатък при 180°, рН, аниони и катиони, микроелементи, токсичност;
- микробиологични показатели, гарантиращи отсъствието на основни показатели за замърсяване;
- възможни фармакологични, физиологични и клинични ефекти.

Натуралните минерални води могат да се класифицират като: трапезни води (подходящи за ежедневна употреба), диетични и лечебни води. Експериментално е доказано, че бутилираните диетични води могат да се използват за възстановяване на солевия баланс и хидриране и са особено полезни при диети с ограничен прием на сол. Те могат да осигурят необходимото количество калций при специфични нужди.

Лечебните води притежават фармакологични и клинични свойства, и някои от тях не стават за пиене. Те съдържат определени елементи в дози, които имат лечебен ефект и трябва да се пият само по лекарско предписание или са предназначени за балнеолечение. Използват се в термални центрове под медицинско наблюдение за пиене, инхалации, иригации, вани и пакетиране с кал.

Важно е да се подчертае, че има разлика в понятието *трапезни води*, що е касеае бутилираните води. Бутилираните води са *натурални минерални, изворни и трапезни*. Първите две произхождат от подземни водоизточници и са природно чисти в химично и микробиологично отношение, не съдържат токсични микрокомпоненти и ролята на

бутилиращите предприятия е да запазят тяхната първоначална чистота. Бутилират се в непосредствена близост до водоизточника, отвеждат се по тръби направо в завода за бутилиране, не се допуска транспортирането им. Разрешени са ограничен брой обработки, с които се цели отстраняване на нестабилни съединения на желязо и манган, както и на сероводород. Не се разрешават никакви обработки с цел дезинфекция на водата. *Трапезните* води могат да се добиват от различни водоизточници – подземни, повърхностни (реки, езера, морета, океани) или от водопроводната система на населените места. Задължение на производителите е чрез различни обработки на водата да постигнат изискванията към отделните показатели за питейна вода, съгласно Наредба № 9 от 16 март 2001 г. (Кънева и съавтори, 2012).

Основните параметри за класифициране на минералните води са физикохимични (температура, рН, радиоактивност и др.), химични (общ сух остатък, разтворени газове и сероводород), органолептични (цвят, вкус, прозрачност), общо съдържание на разтворените в тях вещества (обща минерализация на водата) и др.

Електропроводимостта (Е) и общото съдържание на разтворените вещества (TDS) са основните параметри, по които минералните води се различават. В зависимост от общото съдържание на солите, получено след изпаряване на 1 L минерална вода при 180°C (сух остатък), минералните води се класифицират като води с много ниско минерално съдържание, води с ниско минерално съдържание, води с умерено минерално съдържание и силно минерализирани води.

Въпреки че в Европа и Съединените щати има различни системи за класифициране на видовете минерални води (Peale, 1887; Marotta and Sica, 1933; Fricke, 1993; van der Aa, 2003; Albertini et al., 2007;), най-често се прилагат препоръките на Европейското законодателство (Directive 2009/54/EC).

2.1. Класификационни системи за минерални води

2.1.1. Директива на ЕС (2009/54)

Стандартът за определяне на химичния състав на различните типове минерални води, съгласно Европейската директива за минерални води е показан в Таблица 1. Критериите, които определят разликите между водите, са **фиксираният сух остатък при 180°C** и спецификация на база съдържанието на **характерни катиони и аниони**, наличие на **въглероден диоксид** и др. Законът не определя минимални и максимални допустими концентрации на минерали, вместо това стриктно регулира чешмяната питейна вода по отношение на общия сух остатък (Quattrini et al., 2016).

Таблица 1. Различни видове минерални води съгласно Директива на ЕС (2009/54)

Тип минерална вода	Сух остатък при 180°C
Много слабо минерализирана	<50 mg/L
Слабо минерализирана	50 – 500 mg/L
Умерено минерализирана	500 – 1500 mg/L
Силно минерализирана	> 1500 mg/L
Съдържаща бикарбонати	Бикарбонати > 600 mg/L
Съдържаща сулфати	Сулфати > 200 mg/L
Съдържаща хлориди	Хлориди > 200 mg/L
Съдържаща калций	Калций > 150 mg/L
Съдържаща магнезий	Магнезий > 50 mg/L
Съдържаща флуор	Флуор > 1 mg/L*
Съдържаща желязо	Двувалентно желязо > 1 mg/L
Кисели	Въглероден диоксид > 250 mg/L
Съдържаща натрий	Натрий > 200 mg/L
Подходящи за диети, бедни на натрий	Натрий < 20 mg/L

* Вода със съдържание на флуор над 1.5 mg/L не е подходяща за деца под 7 год.

Минералните води се класифицират по физични параметри - **pH, температура и твърдост**. По отношение на pH минералните води биват кисели (pH <6.8), неутрални (pH от 6.8 до 7.2) и алкални (pH >7.2). В зависимост от температурата на излива са: студени (<20°C), хипотермални (20° - 33°C), хомотермални (34° - 36°C), термални (37°-39°C), хипертермални (>40°C). Твърдостта на водата е показател за наличието на алкалоземни метали и минералните води могат да бъдат: много меки (0-100 mg/L CaCO₃), меки (100-200 mg/L CaCO₃), твърди (200-300 mg/L CaCO₃), или много твърди (>300 mg/L mg/L CaCO₃) (Albertini et al, 2007). В Таблица 2 е посочена скала за определяне общата твърдост на водата, която представлява сумата от калциевите и магнезиевите йони, изразена в mEq/L (van der Aa, 2003).

Таблица 2. Скала за определяне твърдостта на минералната вода

Обща твърдост	Код	Твърдост (Ca + Mg в mEq/L)
Много меки	*	0 - 0.5
Меки	0	0.5 – 1.0
Умерено твърди	1	1 - 2
Твърди	2	2 - 4
Много твърди	3	4 - 8
Екстремно твърди	4	8 - 16
Екстремно твърди	5	16 - 32
Екстремно твърди	6	32 - 64
Екстремно твърди	7	64 - 128
Екстремно твърди	8	128 - 256
Екстремно твърди	9	> 256

Други критерии за класифициране на водата са **общото съдържание на разтворените в нея органични и неорганични вещества (TDS) и електропроводимостта (EC)**. Електропроводимостта на естествените природни води зависи от степента на минерализация (концентрацията на разтворените в нея минерални соли) и температурата. Минерализацията на водата се обуславя от наличието на йони на натрия (Na^+), калия (K^+), калция (Ca^{2+}), хлора (Cl^-), сулфатни (SO_4^{2-}) и бикарбонатни йони (HCO_3^-). На тези йони се дължи електрическата проводимост на природните води. Наличието на други йони, например на дву- и тривалентното желязо (Fe^{2+} и Fe^{3+}), манган (Mn^{2+}), алуминий (Al^{3+}), нитрати (NO_3^-), фосфати HPO_4^- , H_2PO_4^- и др., не повлияват много електропроводимостта. От електропроводимостта на водата може в определена степен да се съди за нейната минерализация, Таблица 3. (van der Aa, 2003)

Таблица 3. Класификация на водите в зависимост от общото съдържание на разтворените в тях органични и неорганични съединения (TDS) и електропроводимостта (EC).

Разтворени съединения	Код	TDS (mg/L)	EC ($\mu\text{S}/\text{cm}$)
Много ниско съдържание на минерали	TDS 1	< 50	< 77
Ниско съдържание на минерални	TDS 2	50 - 500	77 - 769
Умерено съдържание на минерали	TDS 3	500 - 1500	769 - 2308
Високо съдържание на минерали	TDS 4	> 1500	> 2308

2.1.2. Немска класификационна система за лечебни минерални води

В Германия минералните води, които притежават лечебни свойства, се наричат **медицински лечебни води** (Heilwasser). Съгласно немската класификация (Fricke, 1993), минералната вода се възприема като лечебна, ако съдържанието на разтворените в нея минерали са най-малко 1 g/L. Терапевтичният ефект на водите се оценява от съдържанието на определени йони и техните комбинации с други йони (Таблица 4), еквивалентното разпределение на които съставлява най-малко 20% от TDS.

Таблица 4. Видове минерална вода, според преобладаващите йони и техните съединения.

Вид преобладаващи йони	Na	Ca	Mg
Хидроген карбонатни (HCO ₃)	NaHCO ₃	CaMgHCO ₃	
Сулфатни (SO ₄)	NaSO ₄	CaSO ₄	MgSO ₄
Хлоридни (Cl)	NaCl	CaCl	MgCl

Специфичността на минералните води може да се допълва, ако в тях се съдържат определени компоненти, които надвишават посочените по-долу концентрации:

- Съдържащи желязо > 20 mg/L Fe²⁺
- Съдържащи йодити > 1 mg/L I⁻
- Съдържащи сяра > 1 mg/L S
- Съдържащи радон > 666 Bq/L Rn (=18 n Curie/L)
- Съдържащи флуор > 1 mg/L F⁻
- Съдържащи карбонати > 1 g/L разтворен CO₂
- Съдържащи магнезий еквивалентно разпределение най-малко 20% от TDS.

2.1.3. Италианска класификационна система за питейни минерални води

В Италия минералните води се класифицират в класове и субкласове, в зависимост от **температурата, общия сух остатък и химичния състав**. В зависимост от доминиращите йони те се делят на: бикарбонатни, сулфатни, солени, серни (Marotta and Sica, 1933; Albertini et al., 2007). Ако повече от един йон преобладава, водата се наименова като първото име е на доминиращия анион, а второто на доминиращия катион (Petraccia et al., 2006).

Минералните води са класифицирани на:

- олигоминерални (сух остатък до 50 mg/L)
- слабоминерализирани (сух остатък до 500 mg/L)
- серни (H_2S , NH_4^+) - съдържание на сероводород на излива най-малко 1 mg/L
- солени-бромо-йодни (Na^+ , Cl^- , I^- , Br^-) - съдържание на натрий > 200 mg/L (води с морски произход)
- радиоактивни (радий, радон, ураний и др.) - съдържание на радон най-малко 1 nC (нанокюри) = 2.5 UM (Mache unit).
- солени хипо, хомо или хипер-термални (Na^+ , Cl^- , SO_4^{2-} , H_2CO_3 , I^-)
- сулфатни (SO_4^{2-} , Cl^- , HCO_3^-) – съдържание на сулфат > 200 mg/L, могат да съдържат бикарбонати, калций и магнезий; подразделят на сулфатно-бикарбонатни и сулфатно-алкалоземни
- въглекисели води – съдържание на CO_2 >300 mg/L – биват: слабо въглекисели (свободен CO_2 - 300 - 500 mg/L), умерено въглекисели (свободен CO_2 - 500 – 1000 mg/L) и силно въглекисели (свободен CO_2 >1000 mg/L); могат да съдържат бикарбонатни, хидрокарбонатни, калциеви и магнезиеви алкални йони (CaCO_3 , H_2CO_3 , HCO_3^- , Mg^{2+} , Ca^{2+})
- води с желязо (Fe^{2+} > 1 mg/L) и арсен - могат да съдържат също и мед, манган, литий, цинк, никел, кобалт, алуминий. Минералните води, съдържащи желязо се подразделят на:
 - ✓ сулфатно- $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ води - богати на арсен и с ниско рН – под 3
 - ✓ бикарбонатни- Fe^{3+} води - бедни на арсен и рН~6.

Класификацията на водите може да бъде направена **въз основа на тяхната биологична активност**. Те се делят на: *диуретични* (засилващи диурезата); *катартични* (очистителни) - подпомагащи функциите на черния дроб и жлъчката посредством холеретични, хологонни и холецистокинетични ефекти, като стимулират функцията на тънките черва); *антифлогистични* - води с противовъзпалителни и разтварящи свойства; *реконструиращи* - например арсениево-железните води (Petraccia et al., 2006).

2.1.4. Българска класификационна система за минерални води

В България най-често използваната класификация за минерални води е на Караколев (1990). Той представя първото ръководство, в което разглежда физико-химичните характеристики, механизмите на физиологично и лечебно действие, методите на приложение, показанията и противопоказанията за балнеолечение и профилактика на видовете минерални

води (повече от 215 находища в България). Данните от ръководството са използвани за изготвяне на Таблица 5, в която са показани видовете минерални води, според техните минерализация, температура на излива, обща твърдост, алкална реакция и ефективно съдържание на определени йони, оказващи физиологично действие върху организма при терапии във вани (басейн), инхалации, иригации и душиове. Таблицата има за цел да покаже системата за класифициране и принадлежността на минералната вода на гр. Варна, според извършените тогава анализи. Тя е използвана и за съпоставка на получените в настоящото изследване резултати.

Всички описани от Караколев български минерални води могат да се прилагат като **лечебно питейни**, но силноминерализираните се разреждат до достигане на обща минерализация 5 g/L, пият се по схема, в минимална дневна доза, след лекарско предписание.

В достъпната литература на български език всички автори, в по-малка или по-голяма степен, използват предложената от Караколев класификация. Има още едно издание за българските питейни минерални води в две части (Владева и Костадинов, 1996 и 2007), в което авторите разглеждат подходящите за бутилиране български минерални води, като акцентират върху техния физико-химичен състав и показание за лечение и профилактика. Предоставените данни за водите са: температура, минерализация, рН, наличие на специални компоненти (въглероден диоксид, сероводород, метасилициева киселина, радон), анионен и катионен състав.

Сред посочените като подходящи за бутилиране минерални води преобладават слабоминерализираните. Измежду тях с най-ниска минерализация са сондажите в Горна Баня (169 mg/L), Белица – област Благоевград (220 mg/L), община Банско (230 mg/L), Девин (240 mg/L), Хисаря (250 mg/L), но са предложени и силноминерализирани води, като: Бялата вода, Перник (2520 mg/L), осемте извора край село Михалково с обща минерализация от 2500 до 4800 mg/L и др. Сред подходящите за бутилиране води, които могат да се приемат ежедневно, са и минералните води от Североизточен Черноморски район и гр. Варна.

Таблица 5. Класификация на минералните води в България по данни на Караколев, 1990.

Вид	Минерализация до 2 mg/L					
	Слабоминерализирани термални води (акратотерми)					
Хипертермални температура > 38°C и съдържание на флуор (F) до 1.5 mg/L	Находище	Специфичен елемент (mg/L)	Температура Т (°C)	Твърдост (mg eq/L)	Алкална реакция (pH)	Минерализация (mg/L)
	F					
	Варна – Аквариума	1.1	52	4.27	7.2	620
	Чифлик (Лч)	0.4	51	0.71	7.6	305
	Варна – кв. Аспарухово	0.7	50	3.92	7.8	611
	Панчарево (С)	0.2	48	5.95	7.1	495
	Варна – кк „Св.св. Константин и Елена“	0.4	46	4.63	7.2	592
	Горни Богров (С)	1.0	46	0.53	7.1	288
	Старозагорски бани	0.1	42	5.88	6.9	498
	<i>Приложение:</i> при заболявания, които се повлияват благоприятно от топлинни процедури – заболявания на опорно-двигателната и храносмилателната системи, неврологични, гинекологични, бъбречно-урологични заболявания, подагра, дерматити					
Мезотермални температура между 37-32 °C и съдържание на флуор до 1.5 mg/L	Вършец (Мх)	0.5	37	0.10	8.7	194
	Девин – нерадонов	1.5	37	0.17	9.4	320
	Тополи (Вн)	0.1	37	5.88	7.2	643
	Салманово (Вн)	0.5	34	14.97	7.3	1331
	Тузлата (Вн)	0.3	33	5.49	7.8	659
	Войводино (Пд)	1.2	32	0.74	8.3	500
	<i>Приложение:</i> сърдечно съдови заболявания, неврози, климакс, тиреотоксикоза, затлъстяване, захарен диабет, неврологични заболявания					
Хипотермални температура между 31-20°C и съдържание на флуор до 1.5 mg/L	Княжево (Сф)	0.2	31	0.14	9.4	119
	Варна – кк „Златни пясъци“	0.6	31	5.34	7.5	560
	София – кв. Лозенец	0.1	31	1.53	7.8	301
	Кк „Албена“ (Вн)	0.3	30	6.06	7.4	614
	Каварна (Вн)	0.4	30	0.14	7.4	555
	Кранево (Добрич)	0.2	24	2.71	7.6	547
	Провадия – Ерека (Вн) и мн. др.	1.0	24	3.67	7.4	710
	<i>Приложение:</i> общо закаляване на организма, кинезитерапия, спортно профилактични цели					
Радиоактивни (съдържащи радон, Rn) с ефективна концентрация на Rn > 5 nCi/L, F > 1.5 mg/L и метасилициева киселина (H ₂ SiO ₃)-50 mg/L	Rn					
	Наречен	110	33	5.5	7.3	1558
	Момин проход	56	65	2.06	7.7	964
	Стрелча	22	56	0.3	8.8	288
	Велинград-Чепино	10	48	0.1	9.2	187
	Павел баня	10	61	0.6	7.6	650
	Хисаря-сондаж 1	9	46	0.2	9	502
	<i>Приложение:</i> опорно-двигателни, неврологични, ревматологични, сърдечно-съдови, белодробни, урологични, интоксикационни, дерматологични заболявания					

Сярасъдържащи (сулфидни) с ефективна концентрация на серни съединения (S^2 , HS, H_2S) над 9-10 mg/L	Сулфиди					
	Крапец	25	33	6.4	7.2	1821
	кк.,„Русалка“	21	32	5	7.5	1225
	Сапарева баня	16	100	0.21	9.4	707
	Вонеща вода	11	13	10.7	6.7	1275
	Кюстендил	9	73	0.07	8.9	678
	Благовеврад	9	56	0.5	8.1	678
<i>Приложение:</i> дерматологични, гинекологични, неврологични, ревматологични, сърдечно-съдови, ендокринни, белодробни, интоксикационни и др. заболявания						
Силициеви с ефективна концентрация на метасилициева киселина (H_2SiO_3)~50 mg/L	H_2SiO_3					
	Варна-Аквариума	63	20	0.5	7.8	673
	Железница	54	31	0.10	9.5	278
	Казичене	53	60	0.14	8.6	357
	Горна баня	52	42	0.10	9.7	149
	Равно поле	52	52	1.31	7.8	730
	Сандански	115	81	0.60	7.7	653
	Велинград-Лъджене	63	60	0.10	9.2	317
	Банкя	48	37	0.14	9.6	280
	<i>Приложение:</i> гастроентерологични, дерматологични, интоксикационни, ревматологични, геронтологични, белодробни заболявания					
Флуорни съдържание на флуор над 1.5 mg/L и метасилициева киселина (H_2SiO_3) над 50 mg/L	F					
	Якоруда (Сф)	14	42	0.53	8.2	637
	Гоце Делчев	5.3	43	0.14	9.1	222
	Трявна	5.2	14	3.2	7.5	1052
	Хисаря – Момина сълза	5	41	9.3	0.17	234
	Асеновград	3.5	39	7.6	4.99	1407
	София –кв. Свобода	2.4	51	8	0.82	1874
<i>Приложение:</i> стомашно-чревни заболявания, хронични възпалителни и дегенеративни ставни заболявания, остеоартроза, дерматологични и др.						
Въглекисели с ефективно съдържание на $CO_2 > 400$ mg/L	CO_2					
	Стефан Караджово	515	21	14.26	6.4	1473
	Право бърдо	665	19	17.83	6.3	1671
<i>Приложение:</i> сърдечносъдови, гастроентерологични, ендокринни, дерматологични, неврологични, белодробни, интоксикации, ранна атеросклероза						
Вид	Минерализация над 2 mg/L					
Хидрокарбонатни с ефективно съдържание на $HCO_3^- > 1200$ mg/L и на $Na^+ > 450$ mg/L	HCO_3					
	Нови Искър – кв. Курило	3562	30	1.85	8.6	6189
	Нови Искър – кв. Ал. Войков	2001	40	1.31	7.7	3110
	Чепинци	1347	52	1.67	8	2890
	Перник – Бялата вода	1294	26	3.70	6.9	2522
	Генерал Тодоров	1321	48	7.41	6.8	1986
<i>Приложение:</i> заболявания на храносмилателната и ендокринната системи, болести на обмяната, бъбречно-урологични заболявания, както и заболявания на горните и долните дихателни пътища, дерматологични, начална атеросклероза						
Сулфатни с ефективно съдържание на $SO_4 > 950$ mg/L; както и на натрий, калций и/или магнезий (съответно 450, 300 и 150 mg/L)	SO_4					
	Девенци (Лч)	3542	20	72	8	5928
	Длъгнево (X)	1279	20	43	6.6	3073
	Инзово –(Бс)	1121	20	25	7	2847
	Шипково – стар сондаж	1576	19	3.5	7.2	2476
	Полски Тръмбеш	1119	46	25	7.8	2476
<i>Приложение:</i> заболявания на храносмилателната система, обменно-ендокринни заболявания, интоксикации с тежки метали, хронични бронхити						

Сульфатно-железни с ефективно съдържание на $\text{SO}_4 > 950 \text{ mg/L}$ и на желязо $> 20 \text{ mg/L}$	Fe					
	Брезник (Сф)	172- 886	12	27-56	2.9- 3.5	4458- 8211
	Горно Уйно (Сф)	413	20	8.2	2.6	2241
	<i>Приложение:</i> при вторични анемии (кръвозагуба, боледуване, операции), при анемии при подрастващите и при първични анемии (хлороза, пернициозна анемия)					
Хлоридно-натриеви с ефективно съдържание на $\text{Cl} > 1200 \text{ ml/L}$	Cl					
	Мирово (Вн)	189739	20	88.9	6.8	318234
	Долни Дъбник (Лч)	73482	60	387	6.2	121065
	Слънчев бряг (Бс)	9019	33	42	7.5	15003
	Върбица (Вн)	7927	20	25	7.7	13105
	Долно Езерово (Бс)	5264	20	25	9.7	9533
	Градец (Мх)	2328	32	10.2	7.3	
<i>Приложение:</i> при заболявания на опорно двигателния апарат, неврологични, гинекологични, кожни, сърдечносъдови заболявания, хронични заболявания на дихателните органи, обменно-ендокринни заболявания, хроничен пиелонефрит						
Йодно-бромни хлоридно-натриеви с ефективно съдържание на йод (I) - 3 mg/L при питейно приложение и $10-20 \text{ mg/L}$ при външно приложение; на бром (Br) - 25 mg/L при питейно и $50-100 \text{ ml/L}$ при външно приложение	I; Br					
	Старо Оряхово (Вн)	39; 53	30	19.25	7.6	17257
	Шкорпиловци (Вн)	27; 70	30	10.34	7.4	14483
	Георги Трайков (Вн)	21; 35	29	5.70	7.6	12180
	Ново Оряхово (Вн)	15; 7.5	62	6.06	7.6	9841
	<i>Приложение:</i> същото като чисто хлоридно-натриевите. Не се прилагат при заболявания на храносмилателната система, както и на кожата и дихателните органи от алергично естество. Могат да се пият след разреждане при атеросклероза, хипотиреоза, съдово-дегенеративни заболявания на очите.					

В таблицата не са посочени **смесените минерални води с минерализация над 2 mg/L** . Характерно за тях е, че съдържат в ефективни концентрации повече от един макро-йон – хидрогенкарбонатен ($> 1200 \text{ mg/L}$), сулфатен ($> 950 \text{ mg/L}$) или хлориден ($> 1200 \text{ mg/L}$). Също могат да съдържат лечебни газове и биологично активни микроелементи в ефективни концентрации. В зависимост от съдържанието на макро-йони смесените води се подразделят на:

Сулфидно-хлоридни – с най-високо съдържание на сероводород и хлор е минералната вода при Дългоделци (област Монтана), с обща минерализация 36067 mg/L , в която са установени високи концентрации на H_2S (418 mg/L) и хлор (20519 mg/L). В тази категория попадат и водите при Сланотрън (Видин) и Шабла. Такива води могат да се използват за питейни цели само след разреждане.

Сулфидно-хидрокарбонатни – едно находище, Биримирци, със съдържание на сулфиди 15 mg/L , обща минерализация 3232 mg/L .

Въглекисели-хидрокарбонатни води – сред тях са три находища край гр. София (Нови Искър, Илиянци и Мрамор) и едно находище край гр. Пловдив – Михалково.

Минералната вода „Михалково“ е с най-високото естествено съдържание на CO_2 в България- 1150 mg/L, на HCO_3^- – 1977 mg/L и на Na – 607 mg/L. Поради съдържащите се в нея йони на калция (297 mg/L) , силиция (91 mg/L) и флуора (3.2 mg/L) тя е също калциево-силициево-флуорна с обща минерализация – 3406 mg/L, T 26°C, pH 6.1, твърдост 18.5.

Хидрокарбонатно-сулфатно-арсенови води – единствената такава вода е меричлерската минерална вода с минерализация 6328 mg/L, хидрокарбонатна (HCO_3^- - 2075 mg/L), сулфатна (SO_4^{2-} - 1585 mg/L), натриева (Na^+ - 1894 mg/L), арсенова (As^{3+} - 0.7 mg/L), силициева (H_2SiO_3 - 51 mg/L) и флуорна (F^- - 5.5 mg/L), с неутрална реакция (pH 6.9), неголяма твърдост 2.85 mg eq/L.

Сулфатно-хлоридни – към този подклас спадат минералните води на Крушуна, Бояново, Мараш, Овча Могила, Обединение, Ресен, Свищов, Бобов дол, Поморие и др.

Според автора всички смесени води имат по-слабо изразено лечебно действие, отколкото биха имали тези с доминиращ един или друг макро-йон. Освен това, показанията за приложение на смесените минерални води са по-ограничени, ефектите на различните йони невинаги са синергични, а напротив - антагонистични.

Въпреки различните подходи за класифициране на минералните води, открихме следните общи критерии, определящи тяхното физиологично действие, които използваме и при определянето на изследваните в настоящото проучване минерални води:

- йонен състав
- газов състав
- общо съдържание на разтворените във водата вещества (TDS)
- съдържание на биологично активни микроелементи
- радиоактивност
- активната реакция
- температура

3. Терапевтични и биохимични ефекти при прием на различни видове минерални води

В човешкия организъм няма депо за вода и неколкочратният прием дневно е съществен за поддържане на здравето, превенцията на заболяванията и водния баланс. Освен количеството на приетата вода, важен е и нейният химичен състав, който варира в различните видове води. Ефектите на минералните води са свързани с доставка на минерали за различни метаболитни пътища.

Минералите са неорганични съединения, изпълняващи есенциални биологични функции в организма – участват в минерализацията на кости и зъби, регулацията на водно-солевия баланс, клетъчната обмяна и активирането на ензими. Те са есенциални за хората, защото организмът не може да ги синтезира, а трябва да ги набавя регулярно с храненето и приема на вода. При това, бионаличността на минералите в храната е по-малка, отколкото е бионаличността им в минералната вода. В храната минералите са свързани в сложни молекули, което ограничава тяхната абсорбция, докато във водата присъстват като свободни йони, които са лесноусвоими.

Биологичните функции на някои минерали - макро и микронутриенти, които могат да се набавят чрез минералните води, са показани в Таблица 6.

Таблица 6. Наличие на минерали (макро- и микронутриенти) в минералните води и примери за биологични функции, които изпълняват в човешкото тяло (Модифицирана от Quattrini et al., 2016).

Минерали	Биологични функции - примери
Макронутриенти	Наличие в човешкото тяло в умерени концентрации (>200 mg/
Калций	Образуване на кости, регулация на мускулната контракция и миокардната активност, съсирване на кръвта, предаване на нервен импулс, регулация на клетъчната пропускливост, синтез на ензими и хормони
Хлор	Образуване на солна киселина, участваща в процесите на храносмилане и хипохлориста киселина при фагоцитоза
Фосфор	Синтез на протеини, синтез на АТФ и предаване на енергията в биологичните системи
Магнезий	Формиране на кости, нервна и мускулна активност, метаболизъм на липиди и протеини, предпазва от сърдечно-съдови заболявания
Калий	Активност на мускули и миокард, нервномускулна възбудимост, киселинно-основен и електролитен баланс, осмотично налягане
Натрий	Фундаментална регулация на клетъчната пропускливост и флуиди в организма, в излишък води до повишаване на кръвното налягане
Сяра	Есенциални аминокиселини, хрущяли, образуване на коси и нокти, активност на ензими в редокс-системи и клетъчно дишане, перисталтика на червата
Микронутриенти	Наличие в човешкото тяло в следови концентрации (<200 mg)
Кобалт	Изграждащ В12: растежен фактор, синтез на нуклеинови киселини, хематопоеза
Хром	Ензимни реакции от метаболизъм на въглехидрати, мазнини и липиди
Желязо	Участва в структурата на белтъците, преносители на кислород; в състава на ензими
Флуор	Предпазва от зъбен кариес; за развитие на кости; в излишък предизвиква заболявания
Йод	Есенциален за синтез на хормони, свързани с развитието и растежа
Манган	Синтез на ензими, участващи в метаболизма на протеини и въглехидрати, развитие на кости
Молибден	Кофактор на ензими от метаболизма на сяра-съдържащите аминокиселини, урея, ксенобиотици
Мед	Образуване на хемоглобин и еластин; производство на енергия
Селен	Антиоксидантни функции; предпазващ целостта на мембраните
Силиций	Участва в имунната защита, при дефицит настъпва стареене на клетките

3.1. Олигоминерални и слабоминерализирани води

Олигоминералните води са хипотонични и стимулират диурезата (Scalabrino et al., 1998), те са показани при камъни в пикочните пътища, улесняват отделянето на пикочна киселина. Поради ниското съдържание на натрий могат да се приемат от хипертоници (Petraccia et al., 2006). Слабоминерализираните води, въпреки че са с ниска минерализация, много често съдържат в ефективни количества сулфиди, радон, въглероден диоксид, силициеви съединения, флуор и микроелементи със съществено значение за протичането на ензимните реакции. Въздействията на всички компоненти могат да се потенцират взаимно, което обеснява установеното многократно по-силно изразено действие, в сравнение с действието на обикновената питейна вода (Караколев, 1990). Имат диуретичен ефект, показани са при уринарни инфекции и образуване на камъни в бъбреците, а защото подпомагат отделянето на пикочна киселина и урея и са с благоприятни ефекти при подагра (Petraccia et al., 2006).

Умерено минерализираните води притежават същите ефекти, но техният диуретичен ефект е обратнопропорционален на количеството на общия сух остатък.

Силно минерализираните води са медицински води, те се приемат по лекарско предписание в специализирани балнеоклиники.

3.2. Радиоактивни минерални води

Радиоактивните минерални води спадат към газовите води, в които се откриват следи от радий, радон и уран. Сред радиоактивните елементи с най-високи концентрации е радонът.

Радонът е газ, който лесно се абсорбира от мукозните мембрани и кожата. Елиминира се изключително бързо - в рамките на часове, основно чрез белия дроб. Неговите терапевтични способности се дължат на алфа-радиацията, която преобладава. Поради това радоновото балнеолечение има характер на алфа-лъчева терапия. (Караколев, 1990). Алфа лъчите са положително натоварени хелиеви частици с висок йонизиращ потенциал и слаба проникваща способност, на които се дължи силно дразнещото и стимулиращо действие. Бета и гама лъчите проникват по-дълбоко и при продължително въздействие увреждат тъканите и затова се прилагат само локално (Стоянова, 2012). Радоновата спа-терапия включва инхалиране или транскутантно проникване през кожата посредством минералната вода, в която е разтворен елемента. Поради краткосрочната радиоактивност на радона (период на полуразпад - 3.82 дни) се препоръчва пиенето на радонови води, да става веднага след излива. Така се избягва неговата загуба (Albertini, 2007).

Въпреки канцерогенния ефект на йонизиращата радиация във високи дози, в ниски дози тя инициира полезни биологични ефекти. Така, причиненото ниско-степенно молекулно увреждане води до активиране на един или няколко сигнални пътища, които в отговор на предизвикания стрес, индуцират адаптационен отговор - т.нар. хормезис ефект (Calabrese et al., 2007; Rattan and Demirovic, 2010), търсен в превенцията на сериозни заболявания (Feinendegen, 2005).

Механизмите на радиационно-индуцирания хорметичен отговор включва активиране на ДНК-поправка, обезвреждане на активни кислородни форми (АКФ), елиминиране на увредени клетки посредством апоптоза, синтеза на стресови протеини (Hsp) и стимулиране на имунен отговор (Feinendegen, 2005; Ibuki et al., 1998).

В малки дози радиоактивността стимулира функциите на клетките, подобрява обмяната на веществата, имунобиологичните процеси и оказва противовъзпалителен и анти-алергичен ефект. Прилага се при възпалителни заболявания като астма, бронхит, псориазис и ревматоиден артрит (Erickson, 2007).

Счита, че радоновите води стимулират диурезата, отделянето на урея и пикочна киселина с урината (Albertini, 2007) и могат да лекуват индуцирана подагра при плъхове (Etani et al., 2016). Поради способността им да влияят на ендокринните жлези могат да допълват лечението на метаболитен синдром (Nagy et al., 2009). Използват се предимно за лечение на костно-ставни заболявания и ревматоиден артрит (Franke et al., 2007; Annegret and Thomas, 2013).

Радоновите, сероводород-съдържащите и хипертемалните минерални води са съществена част от балнеотерапията, базирана на концепцията за хормезиса. Чрез тази концепция неспецифични фактори - топлина и молекули, като H₂S и Rn, водят до невроендокринни и имунологични отговори, включващи хуморалния и клетъчно-медиран имунитет, предизвиквайки противовъзпалителни, аналгетични, антиоксидантни, хондропротективни и анаболитни ефекти, ведно с невроендокринна и имунна регулация на различни патологични състояния (Galvez, 2018).

3.3. Силициеви минерални води

Силициевите минерални води са слабоминерализирани, алкални, с висока температура. В тях се съдържа също азот (90% от газовия състав), радон и флуор. В тялото наличността на силиций възлиза на 0.05 %, той се намира основно в кости, кожа и органи. Силицият, заедно с калция, магнезия, калия и витамин С, имат съществена роля при формирането на костите и тяхната реминерализация.

Наличието на силиций под формата на метасилициева киселина прави водите полезни за лечение на заболявания на храносмилателната система. Такива води оказват антисептично и противовъзпалително действие, намаляват ферментацията в червата. Силицият подобрява еластичността на кожата, намалява чупливостта на ноктите и космите, предпазва от кариес. Силициевите минерални води забавят стареенето, развитието на склерозата, нормализират кръвното налягане, теглото, подобряват обмяната на веществата (Караколев 1990; Altman, 2000; Владева и Бошев, 2011; Стоянова, 2012).

3.4. Съдържащи сяра минерални води – сулфатни и сулфидно-сероводородни

Сяра-съдържаща минерална (ССМВ) може да бъде открита в изобилие и в райони без вулканична активност, например в България, където се използва основно при спа-процедури, базирани на познанията от традиционната медицина за лечебните свойства на водата. Минералните води, съдържащи сяра под формата на сулфатен йон (SO_4^{2-}) в концентрация над 200 mg/L се класифицират като сулфатни води, а минерални води, съдържащи естествено разтворими двувалентни съединения на сярата и /или сероводород (H_2S) над 1 mg/L се класифицират като сулфидни (серни) води. Тъй като е трудно да се установи коя форма на H_2S (H_2S , HS^- или S^{2-}) е активна, терминът сероводород се използва, като се имат предвид всичките му форми. Разграничение между двата типа минерални води трябва да има, въпреки че в литературата много често се използват равнозначно.

Сулфатните минерални води съдържат често калциеви, магнезиеви, натриеви и бикарбонатни йони, които допринасят за многобройните им полезни ефекти. Присъствието на бикарбонатни аниони е от особено важно значение, тъй като те повишават разтворимостта на калция, който под формата на калциев сулфат не е добре разтворим (Costantino et al., 2019).

Сулфатните йони в минералните води, в които се съдържа и магнезий, се резорбират трудно в стомашно-чревния тракт. Те извличат водата от тъканите в чревния канал, като го раздуват и предизвикват слабителен-очистителен ефект при жени с функционална констипация в по-голяма степен, отколкото слабоминерализираните води (Dupont et al., 2014). В проучване е показано, че ежедневно консумиране на минерална вода, богата на магнезиев сулфат, е полезно за храносмилането и подобрява симптомите на констипация, като повлиява моториката на червата и консистенцията на фецеса (Bothe et al., 2017). Тези ефекти са по-силни при прием на сулфатно-магнезиеви, отколкото на сулфатно-натриеви и сулфатно-калциеви води, т.е. трябва да се вземат предвид специфичните действия на натриевите, калциевите и магнезиевите йони (Караколев, 1990).

Натрият поддържа постоянно осмотично налягане и алкално-киселинно равновесие в организма. Той задържа течности в тъканите и намалява диурезата.

Калцият има обезводняващо (отбъбващо) действие върху тъканите и увеличава диурезата. Успокоява възбудимостта и моториката на стомашно-чревния тракт. Има седативно действие.

Магнезият също има антиспастично и седативно действие. Затруднява резорбцията на мастните киселини. Възпрепятства образуването на фосфатни конкременти в бъбреците и противодейства на отлагането на калций в съдовата стена. Подобрява въглехидратната обмяна (Караколев, 1990). Благодарение на инхибиторното му действие върху стомашно-киселата секреция, той се конкурира с калция. Има индикации, че калциево-сулфатни води (бедни на магнезий) имат хипер-секреторно действие и не се понасят добре от пациенти, страдащи от гастро-дуоденална язва или хипер-секреторни гастропатии. Обратното, тези води са подходящи при пациенти с храносмилателна недостатъчност – хипо-секреция, хипомотилитет с или без спастична компонента (Costantino et al., 2019). Има данни, че магнезиево-сулфатните минерални води имат много добра хипохолестеролоемична активност при плъхове и предпазват липидите от окисление (Albertini et al., 2007; Cantalamessa and Nasuti, 2003).

Сулфатът е задължителен за много метаболитни и клетъчни процеси, особено за растежа и развитието на зародиша. По тази причина сулфатните минерални води са препоръчвани като алтернативно питейно средство по време на бременност (Dawson et al., 2015).

Поради лаксативните, холеретични и хологонни ефекти сулфатните води се използват основно като лечебни питейни води при чернодробни, жлъчни и стомашно-чревни заболявания (Fraiole et al., 2010; Menunni et al., 2014; Bothe et al., 2017). Йоните в тях подобряват функцията на хепато-билиарната система - увеличават холеретичната и хологенната функция, отстраняват хипомотилитета на жлъчния мехур и коригират склонността за образуване на камъни в жлъчката (Menunni et al., 2014).

Минералните води, съдържащи сероводород, се прилагат основно под формата на вани при ревматоиден артрит (Karagulle et al., 1996; Ekmekcioglu et al., 2002; Leibetseder et al., 2004), при дерматологични заболявания (Costantino et al. 2005; Huang et al., 2018; Carbajo et al., 2018). Прилагат като лечебни питейни води (Scheidleder et al., 2000; Benedetti et al., 2007; 2009; 2010; Soria et al. 2014); за инхалации (Contoli et al., 2013; Carubbi et al. 2019); спа-терапии при глухота (Costantino et al. 2006); иригации (Ottaviano et al., 2011); душеве и спрейове (Gálvez Galve et al., 2012). В спа-курорти със сероводородни минерални води се прилагат разнообразни

комбинирани програми с лечебна кал и вани (Sukenik et al., 1990; Jokic et al., 2010; Costantino et al., 2015), прием на минерална вода, инхалации и иригации (Gutenbrunner et al., 2010). Има данни, че води със съдържание на сяра и бикарбонати подобряват състоянието при диабет, чрез понижаване на гликемията, полидипсията и полиурията и намаляване нуждите от инсулин, а също неутрализират метаболитната ацидоза при некомпенсиран диабет. (Petraccia et al., 2006).

Козметичната индустрия също използва тези води и калта, „узряла“ от тях, като ги влага в различни козметични продукти (Nunes and Tamura 2012). Счита се, че основна терапевтивна роля за проявените биологични ефекти на водите, приложени за вани, пиене и инхалации, се дължи на сероводорода (Carbajo and Maraver 2017).

3.4.1. Метаболизъм и биологични свойства на сероводорода

H₂S е безцветен, запалим газ с характерна миризма. Той е високо разтворим във вода (1 g в 242 mL при 20°C) и понеже е липофилен, лесно преминава от водата през кожата и може да се абсорбира 150 пъти повече, в сравнение с другите форми, под които съществува (хидросулфиди - HS⁻, сулфиди - S²⁻). Понятието сероводород, използвано в литературата, често се отнася за смес от всичките му форми и свързаните с тях ефекти (Wang, 2002; Kolluru et al., 2013; Carbajo and Maraver, 2017).

В началото на 20-ти век газът е бил известен най-вече със своята токсичност и отблъскваща миризма. Еднократно инхалиране на сероводород в концентрации 50-100 ppm причинява отравяне, а хронична експозиция на 10-20 ppm H₂S води до проблеми с дишането (Lewis and Copley 2015). След като в края на 20 век е открит пътят за ендогенен синтез на сероводород, представите за него се променят драстично и, заедно с азотния оксид и въглеродния оксид, сероводородът бе признат за третата сигнална молекула (Abe and Kimura, 1996). В сравнение с азотния оксид H₂S е относително стабилен във флуидите на тялото и очевидно оказва терапевтичен ефект при някои заболявания. *In vivo* бързо се разгражда и изпарява в наситена с кислород среда, каквато е средата в белите дробове (Braga et al., 2012).

Сероводородът има силни редуccionни свойства, получава се при геотермални активности (вулкани, термални минерални води), но се открива и в растителните протеини на броколи, чесън, гъби, може да се освободи и от синтетични съединения (NaHS, CYY4137) – донори на сероводород (Benavides et al., 2007; Perry et al., 2011; Predmore et al., 2012; Pouokam and Althaus, 2016; Carbajo and Maraver, 2017; Vazhanov et al., 2017). В човешкото тяло сероводородът се синтезира в различни видове клетки (епителни, съдови и гладко-мускулни), основно от L-цистеин от цитоплазмена и митохондриална цистатионин β-синтаза (CBS) и

цистатионин γ -лиаза (CSE) (Bazhanov et al., 2017, Wallace and Wang, 2015). Но може да се получи и от комбинираното действие на цитозолна цистеин аминотрансфераза и 3-меркаптопируват сулфотрансфераза, налична в митохондриите (Carbajo and Maraver, 2017; Bazhanov et al., 2017; Predmore et al., 2012; Yuan et al., 2015). Отделно от посочените ензими, H_2S може да се синтезира от вторични ендогенни източници, например глюкоза. При реакция на глюкоза с метионин, хомоцистеин или цистеин се получават газове съединения на сярата – метантиол и сероводород. Сероводород може да се получи при редуциране на глутатион (GSH) и елементарна сяра от НАДН или НАДФН, получени в метаболитните пътища за окисление на глюкоза, но също така и от бактериите, населяващи гастроинтестиналния и белодробния тракт (Benavides et al., 2007; Kolluru et al., 2013; Pouokam and Althaus, 2016). След синтезата H_2S може да въздейства върху своите биологични таргети или да се съхрани в резервоари, т.нар. сулфан-сулфур пулове, посредством окисление на хидробисулфиди/персулфиди, хидрополисулфиди и полисулфиди (Wang, 2012; Pouokam and Althaus, 2016), или под формата на киселинно-неустойчив серен пул, формирайки металносерни клъстери от хидросулфиди и персулфиди (Predmore et al., 2012; Kolluru et al., 2013). В присъствие на кислород, H_2S се окислява от сулфид квинон редуктаза в митохондриите, или метилира от тиол-S-метилтрансфераза в цитоплазмата (Bazhanov et al., 2017; Mishanina et al., 2015). В допълнение, H_2S може да се обезвреди чрез метхемоглобин, както и от молекули с метални, или дисулфидни връзки, и да се екскретира чрез урината, газовете, или белите дробове (Bazhanov et al., 2017; Wallace and Wang, 2015).

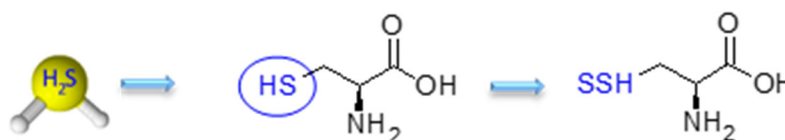
Благодарение на способността му да преминава без транспортер през липидните мембрани, H_2S може лесно да реагира със своите молекулни таргети - клетки от респираторната, сърдечно-съдовата и нервната системи (Wang, 2002; Carbajo and Maraver, 2017; Wallace and Wang, 2015; Benedetti et al., 2017). Неговата стабилност, резерв и освобождаване зависят от рН, температурата и концентрацията на кислород в околната среда. При физиологични условия само една трета от общото съдържание на сярата е под формата на H_2S . В кисела среда единствената форма е тази на H_2S , а в алкална се срещат основно бисулфидните форми (Carbajo and Maraver, 2017). Кислородът също повлиява стабилността на H_2S . Присъствието на кислород индуцира превръщането на H_2S в сяра, която впоследствие може да се окисли до хипосулфиди, сулфиди и сулфати. С други думи, в аеробни условия H_2S се консумира и като следствие неговата ефективна концентрация намалява (Kimura, 2012; Kolluru et al., 2013). Тези открития потвърждават хипотезата, че H_2S може да действа като клетъчен кислороден сензор (Olson et al., 2006). В действителност, пониженото окисление на H_2S при хипоксия се асоциира с продукцията на значими количества H_2S от белодробните

епителни клетки (Krause et al., 2016), близки до тези, които се продуцират в митохондриите при редукцията на съществуващите сулфиди (Olson, 2015). Fu et al., 2012 предполагат, че това се наблюдава като резултат от транслокацията на CSE в митохондриите, което позволява синтеза на H₂S дори след индуцирани стересови стимули, каквато е хипоксията (Fu et al., 2012). Следователно, значимите повишения на нивата на митохондриален H₂S и намален клийрънс може да причини увреждане, вазоконстрикция и про-апоптотични ефекти (Stein and Bailey, 2013).

Измерването на H₂S е предизвикателство с огромно значение за установяване на негова предполагаема роля в редица заболявания. Въпреки че се прилагат различни методи за измерване нивата на H₂S в плазма/серум, те предоставят противоречиви резултати, като измерените нива на H₂S в плазма варират от 1 до 100 µM. Причината за тази вариабилност се дължи на ограниченията и липсата на чувствителна техника (Kolluru et al., 2013, Olson et al., 2014) за измерване, на способността на H₂S да минава през мембрани, както и на екстремно кратния полуживот на H₂S *in vivo* (Calvert et al., 2010)

3.4.1.1. Биологични таргети на H₂S

Биологичната активност на H₂S се проявява чрез пост-транслационно модифициране на протеините - S-сулфхидриране, като продуцираната от H₂S сулфхидрилна група се добавя към тиоловите групи на реактивните цистеинови остатъци, образувайки хидроперсулфиди (Paul and Snyder, 2012; Wallace and Wang, 2015), Фигура 1.



Фигура 1. Медирано от сероводород S-сулфхидриране – добавяне на сулфхидрилна група от сероводорода към тиоловите групи на реактивни цистеинови остатъци на различни протеини - биологични таргети на сероводорода.

Счита се, че формираната група увеличава реактивната способност на протеините и тяхната биологична активност (Paul and Snyder, 2012). Степента на протеиновото сулфхидриране може да бъде повлияно от рН на клетката, разстоянието между таргетните аминокиселини и активното ядро на протеина (Wallace and Wang, 2015). За разлика от S-сулфхидрирането, S-нитрозилирането с азотен оксид води до намаление на цистеиновата реактивност. Например, чрез S-сулфхидриране на ендотелната азотен оксид синтаза (eNOS) активността ѝ се повишава, вследствие на настъпилата ѝ димеризация. Точно обратното, при

S-нитрозилирането на eNOS се формират eNOS-мономерни, което всъщност намалява активността на ензима (Altaany et al., 2014).

H₂S е газова сигнала молекула, от която зависят внушителен брой биологични процеси и сигнални пътища, чрез които се поддържа хомеостазата на организма (Li et al., 2011; Wu, 2013; Wallace and Wang, 2015). Биологичните таргети на H₂S включват йонни канали, вторични посредници, сигнални молекули и транскрипционни фактори. Някои наблюдавани ефекти са противоречиви и вероятно това се дължи на вида на клетките и концентрациите на H₂S.

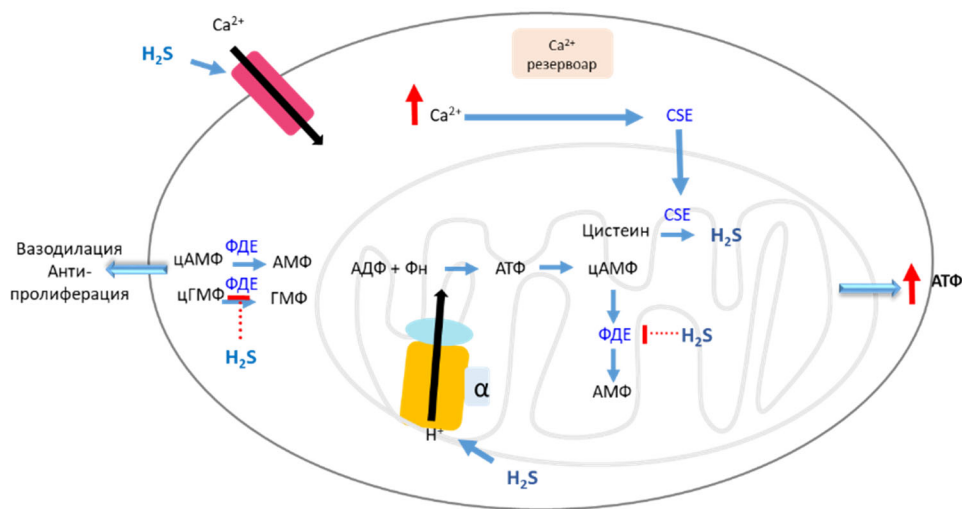
3.4.1.2. Въздействие върху йонни канали и вторични посредници

Сероводородът регулира L и T калциевите канали и отваря АТФ-зависимите калиеви канали (Zoccali et al., 2009; Matsunami et al., 2012; Modis et al., 2013; Munaron et al., 2013). Най-добре проучен е ефектът на H₂S върху АТФ-зависимите калиеви канали (K⁺АТФ) в съдови гладкомускулни клетки (СГМК) и индуцираната вазорелаксация, провокирана от отварянето на тези канали (Zhao, et al., 2001). K⁺АТФ каналите са открити върху повърхността на клетъчните мембрани и митохондрии на различни видове клетки, включително β-клетки на панкреаса, неврони, миоцити, хепатоцити, скелетни и гладкомускулни клетки. Сулфхидрирането на свободни цистеинови остатъци на K⁺АТФ канали отваря каналите и придизвиква инфлукс на калиеви йони. Последствията може да са вазодилация, понижаване на кръвното налягане, предпазване на миокарда от исхемично и реперфузионно увреждане; инхибиране секрецията на инсулин от β-клетките на панкреаса; противовъзпалително, анти-ноцицептивно и антиапоптотично въздействие.

От друга страна, сероводородът може да инхибира L-тип калциеви канали в кардиомиоцити, но да стимулира същите канали в неврони и така да регулира вътреклетъчните нива на калций и да повлияе на зависимите от калций сигнални пътища и ензими (Tang et al., 2010; Li et al., 2011; Wallace and Wang, 2015). Докладвано е че чрез редукция на инозитол 1,4,5-трифосфатния рецептор в белодробни ГМК, H₂S може да повлияе на калциевия ефлукс в клетките (Ryu et al., 2009).

Има данни, че H₂S може да потисне разграждането на циклични нуклеотиди, чрез инхибиране на фосфодиестеразата (ФДЕ) (Vucsi et al., 2010). По този начин нивата на цАМФ и цГМФ се повишават и молекулите стават достъпни за всички метаболитни пътища, в които участват (Фигура 2).

Влиянието на сероводорода върху калциевите йонни канали повлиява директно върху клетъчните нива на калций. Взаимодействието му върху калциевите йони канали и вътреклетъчния калциев резервоар може да индуцира инфлукс и освобождаване на калций, което повишава концентрацията на калций в клетката, което може да предизвика ендотелна пролиферация (Wallace and Wang, 2015). Повишаването на калциевите нива може да транслоцира CSE от цитозола в митохондриите, което да стимулира митохондрииния синтез на сероводород, който да увеличи продукцията на АТФ (Fu et al., 2012). От друга страна, чрез инхибиране на L-калциевите канали от сероводорода може да се постигне и понижаване на вътреклетъчния калций. Изследвания сочат, че по този начин се релаксират ГМК в белия дроб (Castro-Piedras and Perez-Zoghbi, 2013). Нещо повече, инхибирането на тип L-калциеви канали от H₂S индуцира пропускливостта на мембраната и възпрепятства освобождаването на еластазата (Braga et al., 2010). Наскоро бе утановено, че S-сулфхидрирането на алфа субединица на АТФ-синтазата в *in vitro* условия с човешки туморни чернодробни и бъбречни клетки, както и при миша чернодробна тъкан с индуцирано изгаряне, може да я активира и да запази биоенергетиката на клетката (Módis et al., 2016).



Фигура 2. Вазодилативни и анти-пролиферативни ефекти на сероводорода. Чрез увеличение на вътреклетъчния калций, сероводородът причинява транслокация на цитозолната CSE в митохондриите, която синтезира сероводород. Едновременно с това, индуцираното от сероводород S-сулфхидриране на алфа-субединицата на АТФ-синтазата повишава нивата на цАМФ. В резултат на този процес се повишава продукцията на АТФ в митохондриите. От друга страна H₂S може да инхибира ФДЕ и така да повиши концентрациите на вторичните посредници цАМФ и цГМФ. (Модификация от Viegas et al., 2019)

3.4.1.3. Въздействие върху сигнални молекули

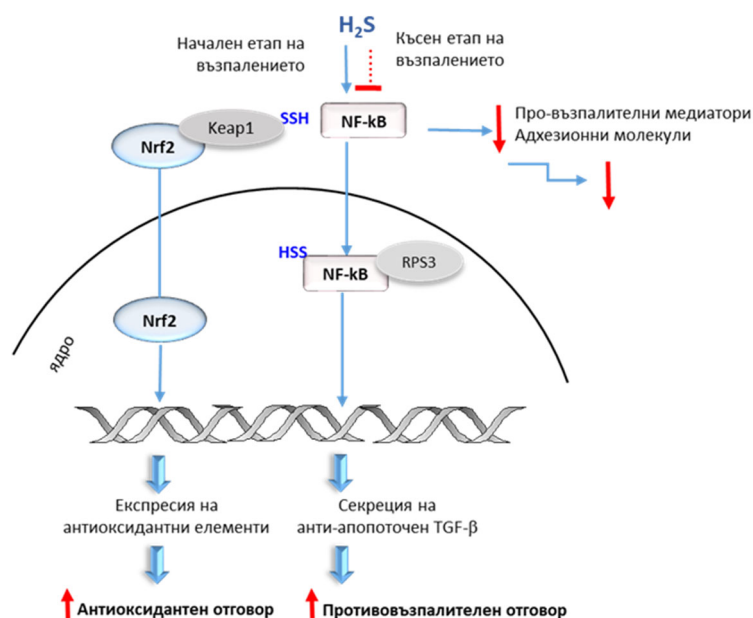
Има данни, че сероводородът може да повлияе на сигнални молекули, от които зависят процеси като фосфорилиране, окисление и разграждане на протеини. Например, докладвано е, че екзогенен сероводород може да инхибира сигналния път на митоген активираната протеин киназа (МАРК) при първични човешки ендотелни белодробни клетки (Wang et al., 2012) и да увеличи нивата на киназите PI3K/Akt, протеин киназа С, някои от които могат да инхибират продукцията на про-инфламаторни цитокини (Calvert et al., 2010; Li et al., 2011; Wang et al., 2012; Polhemus and Lefter 2014; Spassov et al., 2017).

3.4.1.4. Въздействие върху транскрипционни фактори

Чрез S-сулфхидриране се дезактивира и ядреният фактор-капа бета (NF- κ B), което блокира транслокацията му в ядрото, супресирайки про-възпалителни медиатори и продукцията на адхезионни молекули (Benedetti et al., 2017). В зависимост от нивото на възпаление, може да се наблюдават и противоположни ефекти (Sen et al., 2012). Така, в първоначалната фаза на възпаление, про-възпалителният цитокин тумор некрозис фактор-алфа (TNF- α) може да индуцира транскрипция на CSE, като увеличи синтезата на сероводород. Новосинтезираният сероводород сулфхидрира p65 (субединици от NF- κ B), промотирайки свързването му с коактиватора - рибозомен протеин S3, което повишава секрецията на противовъзпалителен цитокин трансформиращ растежен фактор-бета (TGF- β), както и стимулиране на анти-апоптотична транскрипционна активност (Li et al., 2011; Sen et al., 2012).). Трябва да се подчертае, че и в двете ситуации, възпалителният отговор изчезва, а оксидативният стрес намалява. Нещо повече, вследствие на сулфхидриране на Kelch-подобен ECH-свързан протеин 1 (Keap 1) - отрицателният регулатор на ядрения еритроид-свързан фактор 2 (Nrf2), той се транслоцира в ядрото и се експресират антиоксидантни респонс елементи (Polhemus and Lefter 2014, Yang et al., 2013), Фигура 3.

В публикуван съвсем скоро обзор са разгледани детайлно биологичните ефекти на ендогенно продуцирания сероводород в белите дробове. Докладвани са муколитични, антиоксидантни, противовъзпалителни, противовирусни, антибактериални, аналгетични, антипролиферативни и антиканцерогенни ефекти, които поддържат хомеостазата на белодробния епител. Същевременно е направен паралел с възпалителните процеси в белите дробове, характерни при астма и хронична обструктивна белодробна болест, при които се счита, че се променят синтезът и метаболизмът на сероводород. Авторите предполагат, че това е причина за увреждания в дихателната система и правят предположение, че сероводородът, измерен в плазма, слюнка или издишан, може да е маркер за степента на заболяването на

белодробната система. В тази връзка ССМВ е разглеждана като допълващо терапията средство и добра алтернатива за превенцията на белодробни и рино-заболявания с алергичен характер, чието лечение е скъпоструващо и продължава през целия живот, като налага чест прием на антибиотици и последваща резистентност (Viegas et al., 2019).



Фигура 3. Антиоксидантни и противовъзпалителни ефекти на сероводорода. Сероводородът сулфхидрира Кеар 1, което индуцира транслокация на Nrf2 в ядрото, което експресира антиоксидантни респонс-елементи и съответно усилва антиоксидантния отговор. В зависимост от степента на възпалението, сероводородът може да активира или инхибира NF-κB (Модификация от Viegas et al., 2019).

През последните години ролята на сероводорода усилено се проучва, като се използват донори на сероводород (NaHS, GYY4137), или инхибитори на ендогенния синтез (DL-пропаргил-глицин PAG). PAG е необратим инхибитор на един от главните ензими за ендогенен синтез – CSE. Приложен при гризачи води до почти пълно инхибиране на ензима (Uren et al., 1978). Повишеното ниво на сероводород се свързва с редуциране на възпалението в различни системи и органи – възпалителните болести на червата, дразнене на дихателните пътища, невровъзпаление и др. (Whiteman et al., 2005; Wang, et al. 2012; Wallace et al., 2013). Има данни, че сероводородът може да намали отока, да възпрепятства прикрепването на левкоцити към съдовия ендотел, да инхибира синтеза на про-възпалителни цитокини (Wallace, 2007). Изследвана е и защитната роля на сероводорода върху органи, изложени на липополизахариди (LPS) (Aslami et al., 2013; Lee et al., 2013). Някои проучвания показват, че третиране със сероводород значимо влошава хистологията на различни органи по време на

сепсис (Chen et al., 2011; Ang et al., 2011). А инхибиране на ендогенния синтез по време на сепсис подобрява цялостното състояние на организма (Bhatia et al., 2005; Zhang et al., 2010). Докато високите концентрации са изключително токсични, ниските се понасят добре и оказват цитопротективен и противовъзпалителен ефекти.

Например, ниските концентрации стимулират пролиферацията на кератиноцитите (анти-апоптотичен ефект) и проявяват про-вазодилативни и про-ангиогенезни свойства, докато високите концентрации провокират диференциацията на кератиноцитите (про-апоптотичен ефект) анти-вазодилативни и анти-ангиогенезни ефекти. В проучване на Liu и съавтори (Liu, et al. 2014) екзогенен сероводород оказва роля в зарастването на рани при мишки с диабет тип 2. Ефектите на H₂S са свързани с възстановяване на ангиогенните функции на ендотелни прогениторни клетки (EPCs) чрез увеличаване на експресията на ангиопоетин-1 (Ang-1). Инхибирането на цистатионин-гама-лиаза (CSE), един от ензимите за синтез на ендогенен H₂S, с PAG води до забавяне на зарастването на рани в контролна група мишки db/+. Дози от 100 μM NaHS и по-високи проявяват анти-пролиферативен и про-апоптотичен ефекти при човешки аортни гладко-мускулни клетки (HASMCs). Свърхекспресията на CSE в HASMCs значимо намалява тяхната пролиферация. Ефектът се придружава от значимо повишаване на апоптозата в HASMCs клетки, което се установява от появата на кондензирани ядра и повишената активност на каспаза-3 (Yang et al., 2006). Подобни ефекти се наблюдават също при съдов ендотел и човешки атриални кардиомиоцити, изложени на високи концентрации на NaHS. Наблюдавана е повишена активност на извънклетъчна регулирана киназа (ERK) и каспаза-3, повишено фосфорилиране на p38 MAPK и понижена активност на циклин D (Yang et al., 2004; Sheng et al., 2013;).

Сероводородът проявява анти-апоптотични, противовъзпалителни и анти-оксидантни ефекти върху ЦНС в патология. В *in vitro* изследване с човешки нео бластомни клетки (SH-SY5Y), съизмеримо с редуцирания глутатион, ефективно обезврежда АКФ и инхибира вътреклетъчното окисление на протеини и липиди, получени в модели на индуцирана с хипохлориста киселина (HOCl) цитотоксичност (Whiteman et al., 2005). Има данни, че администриране със сероводород повишава активността на СОД и нивата на глутатиона в тъкани (Kimura and Kimura, 2004). H₂S-освобождаващо съединението ACS84, производно на L-Дора, в индуциран от 6-хидроксидопамин модел на Паркинсон защитава човешки необластомни SH-SY5Y клетки от оксидативен стрес. Защитният ефект е в резултат от стимулирано ядрено транслоциране на Nrf-2 и повишена експресия на антиоксидантни ензими. В *in vivo* модел с плъхове с индуциран от 6-хидроксидопамин модел на Паркинсон интраперитонеално администриране с ACS84 облекчава двигателната дисфункция на

животните и загубата на тирозин хидроксилазата в положителните неврони на субстанция нигра, и понижава концентрацията на допамин в увредените стриатуми. Авторите смятат, че поради изявения антиоксидантен потенциал - да понижава нивата на МДА и да увеличава нивата на глутатион, съединението може да се използва срещу неврогенеративни заболявания (Xie et al., 2013). В подобно изследване с миши модел с индуциран Паркинсон се установява, че тези ефекти се дължат на потенциране на разпрягащ протеин 2 (UCP2), който води до умерено разпрягане на окислителното фосфорилиране, което от своя страна, намалява продукцията на АКФ (Lu et al., 2012). Седемдневно приложение на 5.6 mg/kg/ден натриев хидросулфид (NaHS) предотвратява МРТР-индуцираната загуба на допаминергични неврони в субстанция нигра компакта в Kir6.2^{+/+} и Kir6.2^{-/-} мишки. Аналогично NaHS (100 μ M) предпазва първични мезенцефални неврони, изолирани от двата генотипа от индуцирана цитотоксичност. Според авторите намалената продукция на АКФ намалява окислителните продукти водещи до оксидативен стрес в ЕПР и последващата апоптоза. Отново при мишки с индуциран Паркинсон инхалации със сероводород (40 ppm H₂S за 8 ч/ден за 7 дни преодоляват предизвиканото затруднение в движението и дегенерацията на субстанция нигра (Kida et al., 2011). Невропротективният ефект на инхалирания сероводород се свързва с експресия на гените, кодиращи антиоксидантните ензими, включително хемоксигеназа-1 и глутамат-цистеин лигаза.

Невропротективният ефект на сероводорода се проявява и при миши модели на индуциран Алцхаймер. При интраперитонеален дългосрочен и краткосрочен прием на минерална вода (12 ml/kg) с високо съдържание на сероводород и разтворени сулфиди се понижават нивата на фосфорилирани протеини с основна роля в патофизиологията на заболяването, а именно, амилоиден прекурсорен протеин, пресенилин -1, Ab1-42 и тау-протеин, фосфорилиран при Thr181, Ser396 и Ser202; преодолява се индуцираните оксидативен и нитрозативен стрес чрез понижаване на нивата на МДА и нитрити в церебрален кортекс; намалява се активността на C-jun N-терминална киназа и p38 в хипокампус, които не само фосфорилират тау-протеина, но и има роля в процесите на възпаление и апоптоза. Авторите предполагат, че апоптозата се предотвратява чрез инхибиране на каспаза ВАХ и екзекуторна каспаза-3 и чрез промяна в регулацията: повишаване Bcl-2 и намаляване на цитокини TNF- α и интерлевкин-6 (Giuliani et al., 2013).

3.5. Флуорни минерални води

Минералните води с флуорид могат да намалят честотата на кариес при деца и да подпомогнат минерализацията на костите. Консумацията на флуорна минерална вода трябва

да бъде контролирана. Така, прием на минерална вода със съдържание на флуорид над 10 mg/L може да прояви токсични ефекти - зъбна и скелетна флуороза. Поради тази причина EFSA установява горна граница за прием на флуорид до 1,5 mg/L/дневно (EFSA. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request of the Commission related to concentration limits for boron and fluoride in natural mineral waters adopted on 22 June 2005). Тази стойност е потвърдена и от Световната здравна организация (World Health Organization (WHO). Drinking water guidelines (4th Edition). Chemical fact sheets. Fluoride. WHO, Geneva, 2011.).

3.6. Солени (хлоридно-натриеви)-бромо-йодни води

Тези води имат морски произход. Съдържат основно натриев хлорид, йод и бром, които са под формата на йони. Други важни лечебни компоненти, които съдържат, са: калций, магнезий, сулфат, бикарбонат и сяра. Когато в тях не се съдържа бром, се дефинират като солени-йодни. Солено-бромо-йодните води се използват основно за външно приложение (вани и кал). Поради противовъзпалителна им активност се използват при заболявания на гастроинтестиналния тракт (Evandri and Bolle, 2001), хронични гинекологични и дерматологични заболявания (Petraccia et al, 2006), риносинусити без алергична компонента (Ottaviano et al., 2011). Те регулират кръвообращението, метаболизма и засилват функциите на щитовидната и хипофизната жлеза (Стоянова, 2012).

3.7. Солени води (хлоридно-натриеви) минерални води

Тези води са с морски произход, както са солено-бромо-йодните води. Характерни йони за тях са хлоридните и натриевите, но често съдържат и сулфатни йони. Използват се като питейни, когато съдържат бикарбонати и йодити. Имат различни биологични ефекти: противовъзпалителен, стимулират изпразването на стомаха и моториката на гастро-дуоденалния тракт (Albertini et al., 2007), секрецията на вода и електролити (Petraccia et al., 2006); имат холеретични и хологонни ефекти – увеличават секрецията на жлъчни соли и улесняват постъпването им в дуоденума. Лекуват заболявания на храносмилателната система (Bortolotti, et al., 1999; Anti et al., 2004; Evandri and Bolle, 2001). Питейните солени води увеличават стомашната секреция и киселинност. Когато те са особено концентрирани, с обща минерализация над 10 mg/L, не се използват за питейни цели, ако не са разредени (Караколев, 1990 г., стр. 89).

3.8. Хлоридни минерални води

В хлоридните минерални води доминира хлорът и най-характерни катиони в тях са натриевите, калциевите и магнезиевите. Изследванията върху здравословните ефекти на този тип минерални води са ограничени. Счита се, че тези води оказват влияние върху функционирането на червата, като стимулират перисталтиката и секрецията на вода и електролити (Petraccia et al., 2006). Активирайки секрецията на жлъчката и потока на жлъчни соли в дванадесетопръстника, оказват холеретично и хологонно действие (Casado et al., 2015).

3.9. Калциеви минерални води

Въпреки че калцият е основният минерал на калциевите минерални води, той може да бъде свързан с различни аниони (бикарбонатни и сулфатни), които придават на калциевите минерални води специфични свойства. Компонентите на диетата (в това число и на минералните води), могат да алкализират или подкисляват организма и тяхната роля за минералната плътност на костите е проучена до голяма степен (Tucker et al., 2001). В тази връзка изследван е потенциалът на калциевата минерална вода да поддържа алкална средата и да подобрява киселинно-основния баланс в организма, създавайки оптимална среда за минерализация на костите (Wynn et al., 2009). Демонстрирано е, че бионаличността на калций в минералните води е най-малко сравнима, а вероятно и по-добра от тази в млечните продукти и във фармацевтичните препарати (Bohmer et al., 2000). Проучване показва, че при жени в менопауза консумацията на минерална вода с високо съдържание на калций понижава показателите за костно ремоделиране (Meunier et al., 2005). Поради факта, че калцият в минералните води е бързо и лесно усвоим, се счита, че води богати на калций (до 500 mg/L) могат да бъдат използвани като допълваща терапия при лечението на остеопороза при постменопаузални жени (Meunier et al., 2005; Burckhardt et al., 2015). Наскоро Европейската агенция по безопасност на храните (EFSA) обяви, че богатата на калций минерална вода е като функционална храна (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA) и е показана в случаи на повишени калциеви нужди при деца, бременни жени, жени в менопауза и с остеопороза. Установено е, че едномесечен прием на калциево-магнезиево-хидрогенкарбонатно-сулфатна вода понижава нивата на общия и LDL-холестерола при пациенти с хиперлипидемия, без да повлиява върху нивата на триглицеридите и HDL-холестерола (Aslanabadi, 2014).

3.10. Магнезиеви минерални води

Основен компонент в магнезиевите минерални води са магнезиевите йони, които често се комбинират със сулфатните йони. Това е причина приложението на двата вида - сулфатните

минерални води с наличие на магнезий и магнезиевите минерални води със сулфат, да е почти идентично. Тези минерални води имат катартичен ефект и помагат при артеросклероза, гинекологични патологии, при предменструален синдром, климакс и остеопороза след менопауза (Petraccia et al., 2006). Минералните води съдържащи магнезиев сулфат подобряват перисталтиката на червата и намаляват симптомите при констипация (Bothe et al., 2017). Според *in vitro* проучване магнезиевият сулфат действа очистително и повишава експресията на аквапорин 3 (AQP3), чрез промяна на осмотичното налягане в дебелото черво (Ikarashi et al., 2011). Високото съдържание на магнезий благоприятства отпускането на сфинктера на Оди и подобрява проходимостта на жлъчните пътища като позволява излива на жлъчка (Mennuni et al., 2014) . Мета-анализ демонстрира, че приемът на вода, съдържаща магнезий, може да намали смъртността в Европейската популация, настъпила вследствие коронарна болест на сърцето (Jiang et al., 2016).

3.11. Въглекисели, хидрогенкарбонатни и бикарбонатни минерални води

Въглекиселите минерални води са най-разпространените в природата. Те произлизат от инфилтрирането на водата през калциевите почви. Калциеви и магнезиеви бикарбонати се получават при реакция с въглероден диоксид. Въглеродният диоксид присъства както във вулканичната почва, така и в атмосферата. Основната характеристика на въглекиселите минерални води е че в тях преобладават хидрогенкарбонатните аниони (HCO_3^-). Бикарбонатно-алкалните води съдържат значителни концентрации на натрий и калий, докато в бикарбонатно-алкалоземните присъстват най-вече калциеви и магнезиеви йони, но също така и сулфати, хлориди, желязо, бром и йод.

Балнеоспецифичното действие на тези води се характеризира със съчетанието на ефектите на чисто въглекиселите и на чисто хидрогенкарбонатните води, отчасти от съдържащите се в тях сулфати, калций и др. Трябва да се има предвид, че тези ефекти не винаги са синергични, а антагонистични. Така например въглекиселите йони усилват киселинността на стомашната секреция, а алкалните хидрогенкарбонатни йони я понижават. Тези води се използват като питейни за лечение на сърдечно-съдови, храносмилателни, ендокринно-обменни, бъбречно урологични и респираторни заболявания (Albertini et al., 2007). Вани с въглекисели минерални води се прилагат при заболявания на периферните съдове. Естествено газирани минерални води утоляват жаждата, тъй като въглеродният диоксид анестезира нервните окончания на оралните мукозни мембрани, на които се дължи усещането за жажда (Petraccia et al., 2006).

Литературни данни показват, че минерални води богати на натриев хидрогенкарбонат повлияват благоприятно инсулиновата чувствителност при постменопаузални жени с диабет тип 2 (Schoppen et al., 2007), постпрандиалната хиперлипидемия, особено силно при жени (Schoppen et al., 2005; Toxqui et al., 2012; 2016), сърдечно-съдовото здраве (Bastos et al., 2014).

Напоследък интересът към бикарбонатните води е завишен. Тези алкални води са студени с ниска минерализация и диуретични свойства. Има проучвания, в които бикарбонатните минерални води оказват положително въздействие върху храносмилателната система. Например, при пациенти с функционална диспепсия и синдром на раздразненото дебело черво, те неутрализират киселата секреция, увеличават нивото на рН в лумена на стомаха, ускоряват изпразването му и стимулират отделянето на храносмилателни хормони (Bertoni et al., 2002; Petraccia et al., 2006). Тези води се препоръчват при хиперсекреция на солна киселина и гастро-езофагиален рефлукс.

В много изследвания са демонстрирани ефектите на бикарбонатните минерални води върху маркери, които са рискови за сърдечно съдови и метаболитни заболявания (Schoppen et al., 2004; Perez-Granados et al., 2010; Toxqui and Vaquero, 2016). Това е причина да се изследва модулиращата роля на бикарбонатните минерални води върху ключови параметри на метаболитния синдром – кръвно налягане, липиден профил и апопротеини, обиколка на талията, нива на глюкозата на гладно и др. (Costa-Vieira et al., 2019). При двумесечен прием на натриево-бикарбонатни минерални води при жени в пост-менопауза се намаляват нивата на общия холестерол, LDL-хол и се увеличават нивата на HDL-хол. Нещо повече, индексите, оценяващи риска от ССЗ, измерени чрез съотношенията общ хол/HDL-хол и LDL-хол/HDL-хол, е значително понижен. Не се наблюдава ефект върху общите триглицериди и ApoA1. В същото изследване се понижават и нивата на разворимите адхезионни молекули ICAM-1 и sVCAM-1, серумните нива на глюкозата на гладно и авторите допускат, че приемът на натриево-бикарбонатни минерални води, в сравнение със слабоминерализираните води, могат да понижат пост-прандиалната липидемия и нивата на алдостерон (Schoppen et al., 2008) и да окажат положително влияние като предпазват от ССЗ и метаболитен синдром (Schoppen et al., 2004, 2005). Направено е предположение, че потенциалът на водите да понижават нивата на липидите в кръвта след хранене може да е свързан със способността им да понижават увеличените нива на холецистокинин и да понижат изпразването на жлъчния мехур, което от своя страна може да ограничи освобождаването на жлъчни киселини и соли в дуоденума и следователно да редуцира пост-прандиалната липидемия, особено ТАГ в VLDL и НМ (Toxqui et al., 2012). Подобни резултати получават Perez-Granados и колектив през 2010 г. в двумесечна

интервенция с прием натриево-бикарбонатна минерална вода от млади (18-годишни) доброволци с умерен риск от ССЗ (Perez-Granados, et al., 2010).

3.12. Минерални води с желязо и арсен

Има два основни типа минерални води, съдържащи желязо: сулфатно-феро/фери железни води и бикарбонатно-феро води. Сулфатно-железните минерални води са много концентрирани и богати на арсен. Наличието в тях на сулфатна и фосфатна киселини е причина за много ниското им рН. Бикарбонатните железни води са бедни на арсен и с рН ~ 6. Те имат хемопоетични свойства (Albertini et al., 2007) и са показани при желязодефицитна анемия по време на бременост (Halksworth et al., 2003). Наличието на мед, цинк, манган, литий и алуминий повишава активността на желязото в тези води (Casado et al., 2015) с благоприятни терапевтични ефекти при хронични възпаления на горните дихателни пътища (Marullo and Abramo, 1999).

4. Физико-химични характеристики на минералните води от Североизточен Черноморски басейнов район по литературни данни

Находищата на минерална вода в Североизточен Черноморски район са от еоценския малмо-валанжски водоносен хоризонт (Приложение № 2 към Закона за водите). В зависимост от морфологията и пространственото му положение, част от ресурсите се причисляват към минералните води с температура над 20°C. Литоложки отдолу нагоре е представен от доломити, доломитизирани варовици и варовици неравномерно напукани и окарстени. Температурата варира от 15°C до 55°C на дълбочина под 1200 m, а общата минерализация е 400 - 500 mg/L, с преобладаващи хидрокарбонатно-натриево-калциеви йони, който с нарастване на дълбочината се променят в хидрокарбонатно-хлоридни-натриево-магнезиеви, без промяна в общата минерализацията. Количеството на експлоатационните ресурси е около 15 - 20 м³/сек (План за управление на водите в Черноморски басейнов район).

На територията на гр. Варна се намират 12 хидротермални източника с температура на минералните води от 30°C до 50°C, с общ дебит 312 L/s. Всички минерални води са с приятни питейни вкусови качества и с различна твърдост – от меки до умерено твърди (Стоянова, 2012).

По данни на Владева и Костадинов, (1996) минералната вода от най-активно използваните сондажи от Североизточен Черноморски басейнов район е с неутрално рН и се определя като слабоминерализирана и хипертермална. На база на съдържащите се в нея йони тя е хидрокарбонатно-хлоридна и натриево-калциево-магнезиева. Изследванията на

местоизворите показват наличие на сероводород. Сред анионите преобладават хлоридните и хидрокарбонатните и в по-ниски концентрации сулфати. Отсъствието на амониеви йони, нитрати и нитрити над допустимите нива и високата температура я определят като вода с висока първоначална чистота. Концентрацията на флуоридни йони е под нивата на физиологично значимите стойности от 1 mg/L, с изключение на сондаж Р-1х. От катионите преобладават натрий, калций и магнезий, което я определя като минерална вода със сложна характеристика. Физикохимичният състав на минералната вода е стабилен. Запазва се без промяна при лагериране на водата най-малко 2 месеца (Владева и Костадинов, 1996).

5. Ефекти от прием на минерални води със състав подобен на Варненската минерална вода

5.1. Общи сведения

От направено проучване относно ефектите на различните видове минерални води и имайки предвид физико-химичния състав на минералната вода от Североизточен Черноморски басейн, която по литературни данни е слабоминерализирана, леко алкална, със сложен химичен състав - ниско съдържание на лесно усвоими компоненти (хидрогенкарбонати, сулфати, натрий, калций, магнезий, разтворени сулфиди и сероводород, силиций и флуор), то би следвало въздействието ѝ върху организма да е подобно като въздействието на слабоминерализираните води. А именно, да увеличава диурезата и прочиства пикочните пътища; да подобрява функциите на черния дроб, далака и жлезите с вътрешна секреция; да понижава кръвното налягане; да подобрява антиоксидантната защита, да има противовъзпалителни свойства (Караколев, 1990; Petraccia et al., 2006; Albertini et al., 2007; Стоянова, 2012).

Поради наличието на сероводород над 1 mg/L минералните води от достъпните чешми на гр. Варна се красифицират като сярасъдържащи (Vassileva, 1996). ССМВ се използват за лечение на различни патологични състояния – чернодробни, гастроинтестинални, урологични, сърдечносъдови (Altman 2000, Leibetseder et al., 2004), а също така облекчават възпалителните процеси при atopичен дерматит, псориазис, инфектирани рани по краката (Matz et al., 2003; Costantino et al., 2005; Huang et al., 2018; Carbajo et al., 2018), възпаления на горните и долните дихателни пътища (Braga et al., 2008, Otaviano et al., 2011, Viegas et al., 2019), дегенеративни остеоартрити (Karagulle et al., 1996; Ekmekcioglu et al., 2002, Benedetti et al., 2007, Kovacs et al., 2012). Докладвани са няколко интервенции с прием на различни по състав ССМВ, проведени с хора (Scheidleder et al., 2000, Benedetti et al., 2007, 2009, 2010, Albertini et al., 2008, Soria et al.,

2014). Липсват научни данни от интервенции с прием на Варненска минерална вода, същевременно много хора активно я използват като като ежедневно питейно средство.

Понастоящем познанията за лечебните свойства на Варненската минерална вода се основават единствено на емпирични данни, описващи нейните лечебни ефекти при урологични и гастроинтестинални заболявания. Повечето данни за ефектите на различни видове ССМВ са получени в експериментални модели с животни и клетъчни култури (Cantalamesa and Nasutti, 2003; Nasuti et al., 2005; Braga et al., 2008; Coruzzi et al., 2010; El-Seweidy et al., 2011; Safar and Abdelsalam, 2015; Rodrigues et al., 2017). Допуска се, че тяхната биологична активност се дължи на двувалентните съединения на сярата – сероводород (H_2S), полисулфиди (H_2Sn), хидросулфиди (HS^-), тиосулфати ($S_2O_3^{2-}$) и др. Предполага се, че полезните ефекти на водата се дължат именно на разтворените серни съединения (Carbajo and Maraver, 2017). В тялото тези съединения могат да подпомогнат редица биохимични процеси, като поддържане на сярасъдържащи кофактори, синтез на протеини, регулация на ензимната активност и редукционния капацитет на клетката (Toohey and Cooper, 2014). Напоследък се докладва, че сулфидните терапии вероятно играят важна роля в антиоксидантната стратегия срещу окислителното увреждане, свързано с дегенеративни заболявания (Parcell, 2002; Casetta et al., 2005; Nimni et al., 2007). Описват H_2S като газов усилвател на сигнала, който предпазва клетките от окислително увреждане посредством способността му да неутрализира продукцията на реактивни кислородни форми (РКФ) (Kimura and Kimura, 2004; Kimura et al., 2006; Yan et al., 2006), в ролята си на ендегенен обезвредител за РКФ и реактивни азотни форми (РАФ), чрез увеличаване нивата на глутатиона (Kimura et al., 2006) и тиоредоксина (Tyagi et al., 2009). В допълнение са докладвани противовъзпалителни и кардиопротективни свойства на H_2S поради способността му да инхибира ядрен фактор капа бета (NF- κ B) и да намалява експресията на междуклетъчна адхезионна молекула (ICAM-1) и съдова клетъчна адхезионна молекула (VCAM-1) в култивирани човешки съдови ендотелни клетки (Pan et al., 2011). Отделно от антиоксидантните и противозъпалителни активности (Viegas et al., 2019) за него са докладвани много други физиологични свойства – антитуморно (Shrotriya et al., 2010), регулиращо йоните канали (Buckler, 2012), протективно сърдечносъдовата система (Zhao et al., 2014). Правят се интензивни изследвания с цел проучване на различни донори на сероводород с потенциал за създаване на лекарствени препарати за контролирано освобождаване на H_2S в кръвообръщението (Zhao et al., 2014; Beltowski, 2015; Haozi, 2016; Powell et al., 2018). Същевременно, ролята на ССМВ като потенциален донор бе дълго пренебрегвана от изследователите. Въпреки че е в газообразно състояние, около една трета от H_2S остава в недисоциирана форма във воден разтвор при рН 7.4, дори след като водата е била съхранявана.

Като липофилна молекула, H₂S преминава лесно през плазмените мембрани и е с потенциал да индуцира различни клетъчни отговори. В тази връзка, интересът към ССМВ, като природен източник на физиологично-допустими количества H₂S, се увеличи през последните години (Benedetti et al., 2010; Soria et al., 2014; Costantino et al., 2015; Carbajo et al., 2017, 2018; Galvez et al. 2018; Tometzova, 2017; Viegas et al., 2019).

5.2. Интервенции с хора

Към момента данните за проведени интервенции с прием на минерални води при хора са твърде оскъдни и противоречиви. Триседмична интервенция с прием на ССМВ, организирана в Испания, показва благоприятен ефект върху антиоксидантния статус, хематологични и биохимични маркери в периферна кръв при субмаксимално физическо натоварване, изразяващо се в повишаване на общите тиоли, хемоглобин, хематокрит, брой еритроцити на фона на понижаване в броя на левкоцитите (Soria et al., 2014). Подобни антиоксидантни ефекти на ССМВ са демонстрирани *in vitro* в модел на оксидативен стрес при човешки полиморфонуклеарни неутрофили (Braga et al., 2008). Проучване при пациенти с респираторни заболявания показва протективен ефект при терапия с термални ССМВ, дължащ се на противовъзпалително и антиоксидантно действие, оценено чрез повишаване антиинфламаторния цитокин IL-10 и на антиоксидантния ензим каталаза в слюнка и в първични човешки моноцити (Prandelli et al, 2013).

В серия от проучвания на италиански колектив изследователи с клинично здрави, или страдащи от остеоартрит доброволци, консумирали ССМВ, са докладвани значимо подобряване на антиоксидантната защита на организма, чрез повишаване нивата на общите тиоли и биологичната антиоксидантна сила (БАС) и едновременно намаляване на нивата на окислителните маркери – МДА и продукти от окислението на протеините (Benedetti et al. 2007, 2009, 2010). Интересен резултат са получили изследователите при здрави доброволци (възраст 41–55 год.) след двуседмична интервенция с прием на ССМВ в Термален център Saturnia, Grosseto, Italy. Приемът на 500 mL/ден на ССМВ води до значимо повишаване на нивата на общите тиоли, в сравнение с контролната група, приемали същото количество бутилирана минерална вода, но без съдържание на сероводород (Benedetti et al. 2009). В същото изследване се установява и значимо понижаване на МДА, карбонили и продукти от окислението на протеините, но само в групата, приемащи ССМВ. В изследване на групата през 2010 год. се докладва, че положителните ефекти, постигнати при пациенти с остеоартрит, се запазват един месец след интервенцията само в групата доброволци, които освен балнеопроцедури, приемали по 400 mL/ден ССМВ. Soria и съавтори (2014) докладват

противоположни резултати - повишаване в нивата на маркерите за окисление. В други проучвания със здрави доброволци се установява увеличение в концентрациите на метхемоглобина и инхибиране на еритроцитните НАД- и НАДФ-зависими ензими, съответно глицералдехид-3-фосфат дехидрогеназа и глюкозо-6-фосфат дехидрогеназа. Авторите свързват тези данни с наблюдаваните неразположение и астения през първата седмица от приема на ССМВ (Albertini et al., 2007). Вероятно видът на сярасъдържащите съединения и тяхната концентрация е важна за посоката, в която ще се проявят биологичните ефектите на водите върху човешкия метаболизъм (Olas, 2017).

Хроничните възпалителни процеси на носната лигавица са сред най-често лекуваните заболявания със ССМВ. Поради силно изразения муколитичен ефект ССМВ се използва под формата на инхалации и аерозоли (Salami et al., 2010; Costantino et al., 2006; Varricchio et al., 2013). Докладвана е значителна клинична ефективност – подобрени чувствителност и проходимост на носа, както и скъсен период на муколарен клирънс при възрастни, преминали терапия с инхалации с богата на сероводород минерална вода (Neri, et al. 2018). Термалните води могат да бъдат полезни и в постоперативното възстановяване на хронични синусити с или без полипоза, тъй като намаляват броя на възпалителните клетки – еузонофили и мастоцити в носната мукоза на пациенти, инхалирани със сероводородна-арсениево-желязна минерална вода. (Staffieri, et al. 2008).

Данните в литературата за биологичните ефекти на минерални води със състав подобен на тези от Варненския басейн са оскъдни и противоречиви - от една страна се съобщава за антиоксидантно действие, а от друга приемът им се свързва с потенциален риск от оксидативни увреждания. Съобщава се за противовъзпалителен, антиапоптотичен, антихемолитичен, холестерол понижаващ, гастропротективен ефект на минерална вода, но резултатите в повечето случаи са получени върху експериментални животни. Не са проучени на молекулно ниво ефектите от приема на минерална вода от гр. Варна нито в експериментални модели, нито върху хора. От тази гледна точка, инициирането на нови проучвания със ССМВ като ценен източник на микронутриенти ще обогати знанията върху биохимичните механизми подчертавайки благоприятните ефекти на минералните води върху човешкото здраве.

5.3. Експериментални модели с животни

В достъпната литература има сведения за влиянието на ССМВ в *in vivo* експериментални модели с животни, сходни с ефектите, докладвани при хора.

Съобщава се за благоприятно въздействие върху:

- **липиден метаболизъм** в модел на индуцирана хиперхолестеролемия при плъхове. Така, след прием на ССМВ (S^{2-} - 24.8 mg/L) е отчетено намаление в нивата на общия холестерол и LDL-хол, повлиян е ентерохепаталният кръговрат на жлъчните киселини - увеличена е екскрецията на жлъчни киселини с фецеса и е намалена реабсорбцията на жлъчните киселини (Cantalamesa and Nasutti, 2003; Nasuti, et al., 2005);
- **въглехидратен метаболизъм (противодиабетно действие)**
 - ✓ намалени нива на глюкозата в модел на индуциран диабет при плъхове след 21-дневен прием на ССМВ (Honorio França et al., 2015)
 - ✓ 6-седмичен прием на ССМВ (сулфиди - 8.4 mg/L) значимо намалява хипергликемията и нивото на HbA1c при плъхове и повишава серумните нива на инсулин, инсулинов растежен фактор-I (IGF-I) и С-пептид (El-Seweidy et al., 2011; Sadik, et al., 2011; Safar and Abdelsalam, 2015)
 - ✓ отчетени антифиброгенни и антиапоптотични ефекти върху миокард на плъхове с индуциран диабет (El-Seweidy et al., 2011);
 - ✓ повишени серумни ниви на тестостерон и нивото на глутатион в тестиси (Sadik, et al., 2011);
 - ✓ подобрена е функцията на бъбреците на плъхове с индуциран диабет чрез понижаване на оксидативния стрес – понижени са нивата на РКФ, тиобарбитурова киселина и NO; възстановени са нивата на понижения вследствие диабет глутатион (Safar and Abdelsalam, 2015)
- **гастроинтестиналният тракт**
 - ✓ след прием на ССМВ (H_2S - 167 mg/L; HS^- - 75 mg/L) е наблюдавана тенденция към предпазване на лигавицата на стомаха при здрави плъхове (Coruzzi et al., 2010);
 - ✓ едноседмичен прием на ССМВ (S^{2-} - 24.8 mg/L) намалява възпалението на червата в модел на индуциран колит при мишки; понижено е акумулирането на неутрофилни гранулоцити в дебелото черво и е подобрена релаксацията след капсаицин (Pozsgai, et al., 2015)

6. Питеен метод. Количество на минералната вода при различни заболявания.

Питейният метод за лечение на определени заболявания, в това число и с водите от гр. Варна, е описан отдавна (Караколев, 1990). В зависимост от конкретното заболяване дневната доза минерална вода варира в граници от 600 ml до 2500 mL (Таблица 7). Препоръките на автора е водата да се приема разпределена на порции (3 до 6 пъти на ден), в обем 200 mL - 400 mL. По-големи дневни дози (воден удар) се препоръчват, ако целта е да се постигне по-голяма

диуреза и холеретичен и хологенен ефект; по-силно „промивно“, експекториращо действие при хронични бронхити, бъбречно каменна и жлъчнокаменна болест, възпаления на пикочопроводите, уратна, фосфатна и оксалатна диатеза, подагра и хиперурикемия; хронични интоксикации със соли на тежки метали и други химични съединения. Водният удар се прави само с хипотонични и диуретични минерални води, докато лечението с дози се прилага с всички видове минерални води. Водите могат да се пият с естествена температура, или леко да се затоплят (Petraccia, 2006).

По-малки дневни дози се назначават при стомашно-чревни и чернодробни заболявания, хронични панкреатити, диабет, затлъстяване, хронични нефрити, хидронефроза, хроничен простатит, прекомерно затлъстяване, бъбречни и други заболявания, при които трябва да се ограничава приемът на течности (Таблица 7).

Таблица 7. Дневни питейни дози на слабоминерализирани води, прилагани при лечение на различни заболявания, Караколев, 1990 г.

Заболяване	Дневна доза	
	ml	ml/kg
Бъбречнокамъчна болест, подагра, хронични интоксикации с тежки метали и лекарства	1200-2500	25
Хронични възпалителни процеси на пикочопроводите и жлъчните пътища, жлъчно каменна болест, хипокинетични колити, единствен бъбрек, начална бъбречна недостатъчност, оксалатна, фосфатна и уратна диатеза, хронични бронхити	900 - 2000	20
Диабет, затлъстяване*, ставни и кожни заболявания, хронични бронхити	750-1250	15
Хронични гастрити, язвена болест, хронични хепатити и панкреатити, храносмилателно обусловени кожни заболявания	600-1000	12
Хронични хиперкинетични ентерити и ентероколити, хронични нефрити	450-600	8

* При затлъстяване водите се предписват в милилитри на килограм нормална телесна маса, определена съобразно ръста, възрастта и пола (Караколев, 1990).

Обикновено дневната питейна доза се приема разпределена на три порции - преди закуска, обяд и вечеря, а при язвена болест включително преди следобедната закуска. По-големите дози (25 ml/kg) се разпределят на 6-4 порции, като последната е вечер преди лягане. При жлъчни и стомашни болки, хиперкинетичен ентероколит авторът препоръчва дневната доза да се разпредели на малки порции, които се приемат през 2-3 часа.

Има различни предписания за начин, време и позиция на тялото по време на изпиване на водата. Когато става дума за прием на порции, пациентът трябва да пие водата на малки глътки на празен стомах (1-2 L), докато се разхожда. Хипотензивни, астенични и диспептични пациенти трябва да пият водата в клиностатична позиция: в тази позиция течностите преминават по-лесно през торакса, стимулирайки атриалните рецептори и повишавайки атриалния натриуретичен фактор и диуретичните ефекти, още повече – увеличава се интестиналната абсорбция, а се намалява натоварването на порталното кръвообращение.

Диуретичните води със слаба и умерена минерализация и общ сух остатък по-малък от 2-3 g/L трябва да се пият студени в орто-клиностатично положение на тялото, разпределени на порции, „водният удар“ се препоръчва при камъни в бъбреците (Petraccia et al., 2006)

За бърза диуреза при уретерален конкремент цялото дневно количество вода се изпива нагладно сутрин в продължение на 20-30 мин., съчетано със спазмолитици (Караколев, 1990). При заболявания на жлъчните пътища се прилага „тюбаж“ – аналогичен на водния удар. Тюбажът има ефект на дуоденално сондиране. При него болният ляга на дясната си страна, след като изпие 1 чаша (250 ml - 300 ml) акрототермална вода, обогатена с 2 ч.л. магнезиев сулфат. След 1 час изпива втора чаша акрототермална вода, но без добавка магнезиев сулфат и продължава да лежи на дясната си страна още 1 час. Има предписания, свързани с киселинността на стомашния сок. При нормална киселинност акрототермалната вода се приема нагладно 45 минути преди ядене, при повишена 60-90 минути преди ядене, а при силно изразена киселинност 15 минути след нахранване.

Температурата също има значение, обикновено се предписва минералната вода да е умерено топла до леко гореща (38-42°C). При жлъчни и чревни заболявания водата трябва да е с температура 48-50°C. При затлъстяване, обстипация, хипациден гастрит, водата се назначава хладка (18-22°C). Описани са правила за прием на топлата и горещата вода. Те трябва да се пият по-бавно, в продължение на 5 до 10 минути, за да се избегне изпотяване. Хладните води би трябвало да се пият бързо, както при „воден удар“ с цел бърза и обилна диуреза. При бъбречнокамъчна болест през летните месеци дневната питейна доза от 25 mL/kg се увеличава с 20%, а през зимните да се намалява с 20%. При допълнителен двигателен режим (изминаване на 5 km) дневната питейна доза също се увеличава с 20%. Продължителността на питейния курс, според Караколев трябва да е 4 - 8 седмици. Допустимо е повторение на курса след 3-5 месеца (2, 3, или 4 пъти в годината). Според същия автор най-добре е акрототермалната вода да се употребява в прясно състояние, въпреки че според него тя запазва почти напълно свойствата си в продължение на седмици и месеци. След наливане

съдът трябва се затвори добре, без да се излага на слънчева светлина и контакт с въздуха. Охлаждането на топлите и горещите акратотерми до необходимата температура също трябва да става в добре затворен съд, а подгриването на водата с по-ниска температура – на водна баня. При необходимост затоплената вода може да се съхранява в термос.

При възпалителни инфекции на отделителната система бикарбонатно-алкалните минерални води, консумирани на порции, може да са полезни. Техният диуретичен ефект достига пик след няколкодневно приложение, метаболитни модификации се забелязват след 10-15 дни. Според Petraccia и съавтори (2006) увеличената диуреза не се дължи само на хипотоничния разтвор, но и на физико-химичния състав на водата. При подагра спа-терапията е ефективно помощно средство на фармакологичната и диетична терапия. Слабоминерализирани бикарбонатни води са особено полезни, защото увеличават диурезата и урикурията, алкализират урината и редуцират урикемията. Приемът на вода преди лягане предпазва от физиологична олигоурия през нощта (Petraccia et al., 2006).

Повечето катартични води са солени, солено-сулфатни, сулфатно-алкални или алкалоземни, както и сярасъдържащи. Силноминерализираните води се пият в дози от 50 до 150 mL, а слабоминерализираните - в дози от 1-1.5 L. За да увеличат интестиналната моторика, тези води се пият сутрин на гладно, студени.

Арсениево-железните води могат да се разреждат, в зависимост от концентрацията на йоните в тях. Те трябва да се консумират на празен стомах в дози 1-3 ч.л. при деца и 3 с.л. при възрастни 3 пъти/ден. Води с по-малко съдържание на арсен могат да се пият в по-високи дози (Petraccia et al., 2006).

Караколев препоръчва водата да се пие в точно определени часове на деня. Предупреждава, че по време на питейното лечение (обикновено към 5-10 ден) може да се появи балнеореакция, която да се манифестира с известно усилване на симптомите, присъщи на лекуваното заболяване – най-често болки, колики и общо неразположение (недобро настроение, смутен сън и апетит). Според него питейното лечение със слабоминерализирани води рядко причинява слабо изразена балнеореакция.

Водите с *ниска минерализация* са противопоказани при задържане на течности, бъбречна недостатъчност, кардио-циркулаторна декомпенсация, *води богати на натрий* са противопоказни при високо кръвно налягане; *натриево-хлоридни води* – при хиперсекреция на киселини, пептична язва на стомаха и високо кръвно налягане; *сярасъдържащите* минерални води - при бронхоспазъм; *сулфатните* – при активни лезии на храносмилателния тракт (Petraccia et al., 2006).

6.1. Количество на минералната вода в проучвания с клинично здрави доброволци

В проучване с млади доброволци, оценяващо как приемът на обогатена с алкали бутилирана минерална вода повлиява киселинно-основния баланс и хидратационен статус на организма, доброволците приемали *ad libitum* различни по състав минерални води (Heil, 2010). В друго проучване относно влиянието на вода с умерена минерализация върху липидния профил на кръвта преди и след хранене (Zair et al., 2013), участниците консумирали по 1,25 L/ден от тестваните бутилирани минерални води. При изследване ефекта на минерална вода с високо съдържание на калций при жени след менопауза, дневното количество на изпитата минералната вода било 1 L (съдържание на Ca - 596 mg /L). Резултатите показват, че консумираната в рамките на 6 месеца минерална вода оказва положителен ефект като понижава серумния паратироиден хормон и подобрява биохимичните маркери за метаболизма на костите (Meunier et al., 2005). Един литър/ден натриево-бикарбонатна минерална вода изпивали доброволци с умерена хиперхолестеролемия. Резултатите показват подобряване на липидния профил и намаляване на концентрацията на глюкоза в серум, съдържащите се във водата минерали (натрий и бикарбонат) не оказват ефект върху кръвното налягане (Toxqui and Vaquero, 2016; Perez-Granados et al., 2010). Според Petraccia и съавтори дневният прием на течности при бъбречно-каменни болести не трябва да е по-малко от 2 L/24 часа (Petraccia, 2006).

7. Анализ на състоянието на изследванията по проблема

Сведения за използване на минерални води по нашите земи датират от дълбока древност – от времето на траките, славяните и древните римляни, които са строили градове в близост до термални извори. Така са възникнали Сердика (днес София), Пауталия (днес Кюстендил), Августа (днес Хисар), Аква Калиде - Термополис (Бургас), Германея (Сепарева баня). Богатото историческо минало на страната е свързано с бликащи термални води, с изградени нимфеуми, хамами, балнеологични центрове за здравни процедури. Римските бани, построени в края на II век сл. Хр. - една от археологичните забележителностите на гр. Варна, са най-големите римски бани на Балканския полуостров.

Още през 1955 г. по Северобългарското Черноморие са извършени редица хидроложки проучвания, в резултат на които са разкрити значителен брой видове минерални води. Общият им дебит се равнява на 25% от общия хидроминерален ресурс на страната. Те са предимно слабоминерализирани, хипо- или хомотермални с голям дебит, ниско съдържание на флуор, с добре изразено съдържание на метасилициева киселина, калций и магнезий, с невисока

твърдост. Срещат се и минерални води с по-висока минерализация и съдържание на натриев хлорид, йод и бром (Едрева, 2005; Паскалева, 2003).

Развитието на балнеологията и спа-туризма в България бележи своя бум през 70-те - 80-те години на миналия век и до 1990 г. в страната активно функционират около 40 курорта с местно и национално значение. Днес най-популярните спа-курорти са „Св. Св. Константин и Елена“, „Ривиера“, Златни пясъци, „Албена“, „Поморие“, „Павел баня“, „Наречен“, „Велинград“, „Сандански“, „Хисар“, „Вършец“, „Банкя“, първите четири от които черпят минерални води от Североизточен Черноморски басейнов район.

Минералните води на територията на община Варна са значителен природен ресурс с огромен енергиен потенциал и с възможности за развитие на рекреацията и балнеологията в града. Съществуват три водоносни хоризонта със стопанско значение – горноюрско-долнокреден (познат като малм-валанжски), еоценски водоносен хоризонт и миоценски водоносен хоризонт.

Подземните води от малм-валанжския хоризонт са с напорен характер и на много места се самоизливат на повърхността. В гр. Варна температурата на тези води е около 50°C, в другите области от територията на Варненска община – по-ниска. Еоценският водоносен хоризонт е напорен. Температурата на водата е 11-12°C в зоната на подхранване и 26-36°C в района на Черноморското крайбрежие (Програма за опазване на околната среда на Община Варна 2019–2023 г., март 2019 г.).

Находищата от малмоваланжинския и еоценския водоносни хоризонти –изключителна държавна собственост, на територията на община Варна са разкрити с 37 броя сондажи – 29 броя за малмо-валанжинския водоносен хоризонт и 8 броя за еоценския водоносен хоризонт (Регистър на съоръженията за минерални води – публична държавна собственост в БДЧР-Варна)

По данни от Басейнова Дирекция за Черноморски регион към м.ноември 2018 г., действащите разрешения за водовземане от минерални води за територията на община Варна са 48 броя, от които:

- за обекти на територията на град Варна –28 броя;
- за обекти на територията на к.к. „Св. Св. Константин и Елена” –17 броя;
- за обекти в к.к. „Златни пясъци” –3 броя.

Водовземането се извършва от подземни водни тела BG2G000J3K1040 и BG2G00000Pg026.

Минерални чешми на територията на гр. Варна са общо 4 броя. Техните води са от малмо-валанжинския водоносен хоризонт от подземно водно тяло BG2G000J3K1040:

- „Дом Младост”
- кв. „Аспарухово” (до Багра)
- „Аквариума”
- Плувен комплекс „Приморски”.

Поради общото геологично дъно се очаква водите от минералните чешми на територията на гр. Варна да имат сходни физикохимични характеристики.

Варненските минерални води се използват предимно за отдих и спорт в курортите „Св.св. Константин и Елена“, „Златни пясъци“ и „Албена“ и съгласно Наредба № 2 от 29 януари 2016 г. За условията и реда за сертифициране на "балнеолечебен (медикул спа) център", "спа център", "уелнес център" и "таласотерапевтичен център", издадена от Министерството на туризма и Министерството на здравеопазването, Обн. ДВ. бр.11 от 9 февруари 2016 г., за да се извършват балнео-и спа-процедури с лечебна кал и/или минерална вода, всички хотели и спа центрове трябва да имат сертификати за издадена балнеологична оценка.

В сайта на Министерството на здравеопазването в „Регистър на издадените балнеологични оценки за минерална вода към 26.07.2019 г. фигурират 13 сертификати за издадени балнеологични оценки, 12 от тях са за находища на минерална вода „Район Североизточна България“ – подземни води от малмоваланжския водоносен хоризонт с температура по-висока от 20°C-област Варна, област Добрич, област Шумен, и 1 е за находище на минерална вода „Район Варненски басейн“ – подземни води от еоценския водоносен хоризонт с температура по-висока от 20°C – област Варна и област Добрич.

Две от балнеологичните оценки са за водите на минералните чешми на територията на Община Варна – Балнеологична оценка №117 от 15.03.2019 г., удостоверяваща минералната вода, добита от водовземно съоръжение сондаж №P-106х („Дом Младост“) и Балнеологична оценка №74 от 19.10.2017 г., удостоверяваща минералната вода, добита от водовземно съоръжение сондаж №P-6х. („Естрей“), достъпни на сайта на Министерството на здравеопазването.

През последните години бяха реализирани няколко модерни структурни проекта, използващи природни минерални ресурси („Аква хаус“ и Алея I). За първи път в България минералната вода бе използвана директно от източника за целогодишна климатизация (охлаждане и отопление), за питейни, битови и СПА цели в проект „Варна Сити парк – юг“.

Мониторингът на физикохимичните и микробиологичните показатели на минералните води за питейно прилагане в България е уреден в чл. 12, ал. 2 от Наредба №14 за курортните ресурси, курортните местности и курортите. Периодичният контрол се извършва от регионалните здравни инспекции (РЗИ), съгласно чл. 13, ал. 3. от същата Наредба. Задължителният мониторинг включва контрол на дебита, водното ниво, температурата и радиоактивността, най-малко веднъж на 3 месеца; съкратен физико-химичен анализ, най-малко веднъж на 2 години; пълен физико-химичен анализ, най-малко веднъж на 5 години; санитарно микробиологичен контрол, най-малко веднъж на 2 месеца.

Към момента периодичен мониторинг на физикохимичния състав на минералните водоизточници на територията на гр. Варна не се провежда. Провеждани са съкратени физико-химични анализи, но данни за пълния състав на минералите води на територията на гр. Варна липсват. Във връзка с използването на минералната вода за питейни нужди РЗИ - Варна извършва периодичен микробиологичен контрол. Пълен физикохимичен анализ се извършва от Специализираната лаборатория за анализ на минералните води към Националната специализирана болница за физикална терапия и рехабилитация - гр. София, по искане на концесионера на съответния сондаж, като информацията е конфиденциална, достъпна само за концесионера.

8. Обосновка на дисертабилността на темата

На база получените данни от литературния обзор могат да бъдат формулирани следните изводи:

- Химичният състав на минералните води от гр. Варна е недостатъчно проучен. Провежданите до 2013 г. съкратени физикохимични анализи не дават цялостна представа за количествата на биологично активни елементи в минерална вода от Район Североизточна България. От 2014 г. РЗИ – Варна не изследва химични показатели във водата на местни минерални чешми, съгласно дадените от МЗ указания за планиране на дейности на РЗИ.
- Има данни, че приемът на минерални води значително променя биодоставката на макро- и микроелементи в лесноусвоим вид, водещо до промени в метаболизма.
- Има данни за значим антиоксидантен ефект в резултат на прием на минерална води, съдържащи сероводород и разтворими сулфиди, но те са получени главно в експериментални модели с опитни животни и са често противоречиви.

- Липсват молекулярно-биологични и епигенетични проучвания на ефектите от приема на минерални води, съдържащи сероводород и разтворими сулфиди.
- Няма проучвания за молекулните механизми на действие върху човешкото здраве на минерална вода от Варненски басейн.

По време на изготвянето на литературния обзор бе подадено заявление в НЦОЗА с вх. №1555/03.04.2017 г. за достъп до наличните данни в библиотеката на НЦОЗА, касаещи изследвания и балнеологични оценки на минерални води от Варненски басейн. Получен бе отговор, че в библиотеката на НЦОЗА няма данни от извършени изследвания (химични и микробиологични) на минералните води от Варненски басейн. В отговора се посочва дисертационен труд тема „Биологични контаминати при хигиенната оценка на бутилирани води“, в който не са били включени минералните ресурси на Варненския басейн. В телефонен разговор завеждащият „Специализирана лаборатория за анализ на минерални води“ към Националната специализирана болница за физикална терапия и рехабилитация уточни, че данни от експериментални модели с животни и интервенции с хора за биологичните ефекти Варненските минерални води липсват. Тази липса на информация, както и желанието на потребителите на минерална вода да получат научно обоснована информация относно ефектите (ползи, вреди) от приема на минерални води от обществените градски чешми, очерта необходимостта от изследвания върху молекулните механизми на въздействие на минерални води върху човешкия метаболизъм.

Наличните данни за биологичните ефекти на Варненските минерални води са основно на базата на емпирични наблюдения и съобщения от ползватели на тези води. Съвременните проучвания върху метаболитните ефекти обхващат експериментална работа с клетъчни култури, експериментални животни и интервенционални проучвания върху хора. При приложението на новите молекулярно-биологични технологии, все по-голямо внимание се обръща на периферните кръвни мононуклеарни клетки (РВМС). Те са смесена популация на единични ядрени клетки, богат източник на моноцити, които могат да се диференцират в макрофаги или дендритни клетки чрез култура с различни цитокини. Предимството им пред други видове клетки е, че кръвта е лесно достъпен биологичен материал, особено важно при изследвания с хора. РВМС лесно се изолират от пълна кръв и са представителни за метаболизма в комплексна тъкан. Чрез тях могат да се проследят множествени промени в отговор на различни стимули (Jansky et al., 2003; Hougee et al., 2005; Ngkelo et al., 2012).

Темата на дисертационния труд съответства на целите на Националната стратегия за развитие на научните изследвания 2020 в частта за дефинираните в Програмата за европейско

развитие на българското правителство, цели № 3 и № 4, а именно: „Засилване на интеграцията между научните организации и звена на публичните научни организации и университетите в страната и връзката им с бизнеса в съответствие с приоритетите на обществото“ и „Модернизация на научните организации и повишаване статута на учения в обществото“. То попада изцяло в обхвата на приоритетно направление № 2 „Здраве и качество на живота, биотехнологии и екологично чисти храни“ на тази стратегия.

Фундаменталните изследвания в областта на персонализираното здраве са в пълно съответствие с насоките за регионална специализация на Североизточния регион по тематична област 3 „Индустрия за здравословен живот и биотехнологии“ на Иновационната стратегия за интелигентна специализация на Република България (ИСИС). Евентуалните анализи в областта на нутригеномика биха допълнили в значителна степен научното познание, покриващо се от Националната пътна карта за научна инфраструктура чрез Национален университетски комплекс за биомедицински и приложни изследвания (BBMRI). Предвид локацията на град Варна и възможностите за създаване на консорциуми и партньорства с множество организации от Черноморския регион, темата на проекта на дисертация е в частично съответствие и с Инфраструктурата за устойчиво развитие в областта на морските изследвания, обвързана и с участието на България в Euro-Argo.

Тематиката на дисертационния труд попада частично в обхвата на приоритетни направления № 3 „Биотехнологии, фармация, химия“ и № 4 „Нови материали и нанотехнологии“ на Националния иновационен фонд и има потенциал за допълняемост с операциите по Оперативна програма „Иновации и конкурентоспособност“. В този смисъл, тя съответства и с приоритетите на Хоризонт 2020 за социални предизвикателства за безопасност на храните и биоикономика, за научни изследвания на границите на познанието за нови и нововъзникващи технологии и иновации, както и за водещи индустриални инициативи за лидерство в биотехнологиите, като водещ иновативен сектор.

III. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Настоящото научно изследване има за цел да се проучат молекулните механизми на действие на Варненските минерални води върху човешкия метаболизъм. Очаква се да бъдат получени данни за ефектите на водата върху биохимични маркери в кръв и урина, маркери за оксидативния статус и експресията на гени, свързани с антиоксидантната защита и метаболизма на сярна съдържащи аминокиселини.

Постигането на тази цел налага изпълнението на следните задачи:

1. Изследване на физико-химичния състав на Варненската минералната вода от три обекта: обществена чешма под Аквариума, обществена чешма до "Дом Младост" и балнеология при х-л „Естрея Резиденс“, кк „Св.св. Константин и Елена“;

2. Провеждане на интервенция върху доброволци с прием на минерална вода от обществени чешми в гр. Варна;

3. Фенотипиране на метаболитни промени като резултат от приема минерална вода от обществени чешми в гр. Варна;

4. Проучване влиянието на приема на Варненска минерална вода върху нивата на генна експресия в изолирани РВМС клетки във връзка с антиоксидантната защита и възпалението;

5. Анализ на механизмите на действие на Варненската минерална вода във връзка с потенциални здравни ефекти и възможността за използването ѝ като лечебно питейно средство.

IV. ХИПОТЕЗИ И ПОДХОДИ ЗА ПОСТИГАНЕТО НА ЦЕЛТА И ЗАДАЧИТЕ

Характерно за минералната вода от Варненския басейн е съдържанието на сяра главно под формата на сероводород и разтворими, лесно усвоими сулфиди. Подобно на азотния оксид (NO) и въглеродния оксид (CO), сероводородът (H₂S) е липофилна молекула със сигнални функции, която свободно преминава през мембранни структури и може да бъде измерена в кръвен серум и в тъкани, където присъства в концентрации от порядъка на 50 µM. Физиологичните ѝ нива в мозъка са три пъти по-високи от серумните, близки до токсичните концентрации (Lowicka and Beltowski, 2007). По своята химическа природа сероводородът е добър редуктор, което обуславя потенциална антиоксидантна роля. Освен това, сероводородът е силно реактивоспособна молекула и лесно реагира с активни кислородни и азотни форми, като по този начин ги инактивира (Lowicka and Beltowski, 2007). Така той се свързва с азотния оксид, продуциран при възпаление, и го обезврежда (Whiteman et al., 2006). Друг механизъм на антиоксидантното му действие включва стимулиране на транспорта на цистеин и синтеза на глутатион (Kimura and Kimura, 2004). Съобщава се за ефекти на сероводород върху сигналните пътища, такива като стимулиране на АТФ-зависими калиеви-канални, активиране на аденилатциклазни каскади, повлияване на зависимите от екстрацелуларни сигнали кинази (ERK) сигнални пътища, на индуцируемата азотен оксид синтаза (iNOS), стимулиране повишаването на цитозолния калций и активиране на калций-зависими канали (Lowicka and Beltowski 2007).

Сярата е важен макроелемент, съставляващ 0,25% от телесната маса на възрастен индивид (Sadik et al., 2011). Тя участва в поддържането на редокс-статуса на клетъчно и екстрацелуларно ниво и в изграждането на важния вътреклетъчен антиоксидант глутатион. Необходима е за посттранслационната модификация на белтъците, изграждащи екстрацелуларния матрикс. Като компонент на важни метилиращи агенти в организма, тя има пряко отношение към активността на белтъци и ДНК чрез реакции на метилиране. Като част от важни сярасъдържащи аминокиселини, тя има отношение към активността на ензими, съдържащи SH-групи в активния си център, както и към поддържането на нативна конформация на белтъците, формирайки дисулфидни връзки.

Може да се предположи, че приемът на минерални води, съдържащи сероводород и разтворими сулфиди, ще има измерим ефект върху метаболизма, активирайки гореописаните метаболитни процеси и сигнални пътища. Тези ефекти на минералните води са напълно непроучени. Повечето от наличните в литературата данни са от *in vitro* изследвания върху клетъчни култури и често резултатите са противоречиви. Например, съобщава се, че

сероводород стимулира iNOS в пльши гладкомускулни клетки (Jeong et al., 2006) и инхибира същия ензим в миши макрофаги (Oh et al., 2006). Оскъдни са интервенционални проучвания при хора за механизмите на действие на сероводород и разтворими сулфиди, съдържащи се в минерални термални води.

Чрез изследване на ефектите от приема на минерална вода от района на гр. Варна върху антиоксидантния статус, маркери на възпалението, липидния метаболизъм, съдовия тонус и др. се очаква да се получат нови знания относно механизмите на действие върху човешкия метаболизъм. Очаква се минералната вода от Варненския басейн, съдържаща разтворими сулфиди, индиректно да повлияе антиоксидантната защита и да потисне сигнални пътища, зависими от ядрения фактор капа-В (NF-κB), които образуват на активни кислородни форми активира. Така, приемът на минерална вода би могъл да потисне нискостепенното възпаление - рисков фактор за развитие на съдови заболявания и метаболитни нарушения.

Настоящото предложение за дисертационен труд представлява първото по рода си систематично научно изследване върху молекулните механизми на ефектите от приема на минерални сярсаъдържащи води при хора. Реализирането му ще даде възможност за получаването на оригинални данни за ефекта на сярсаъдържащите минерални води като лечебно-питейно средство върху човешкия метаболизъм.

1. Подходи за постигане на изследователските цели, включително и интердисциплинарност на дисертационния труд

При изпълнението на дисертационния труд ще бъде използван опит, придобит от колектива на Катедрата по биохимия, молекулна медицина и нутригеномика при изпълнението на европейски научен проект в областта на нутригеномиката FP7-KBBE-289511 „*Application of new technologies and methods in nutrition research – the example of phenotypic flexibility – NutriTech*“. Класически подходи, прилагани в науката за хранене, ще бъдат комбинирани със съвременни аналитични технологии и методологии за оценка на взаимоотношенията вода – здраве. Ще се прилагат технологии и методологии на генно, клетъчно, тъканно и организмово ниво с цел да се уловят множество физиологични промени в отговор на стандартизирана интервенция. След физикохимично охарактеризиране на природния ресурс минерална вода от Варненски басейн ще бъдат оценени ефектите от приема ѝ върху човешкия метаболизъм с оглед изясняване на молекулните механизми на нейното действие върху човешкото здраве. Ще бъде приложена съвременна методология, включваща молекулярно биологични и класически клинично-биохимични методи и инструменти на

социалната медицина, такива като анкетно проучване, анализ и обобщаване на данните от изследването.

Научното изследване има интердисциплинарен характер. То комбинира методи и подходи от областта на нутригеномиката, молекулярната биология, химия на водите, биохимия и физиология на човека, екология и медицина и участието на специалисти от съответните научни области.

Научното изследване има изцяло фундаментален характер. Реализирането му ще доведе до получаването на нови знания и оригинални резултати, които ще позволят да се установят нови причинно-следствени връзки за биологичните ефекти на малекулно ниво от приема на минерални води от Варненски басейн с потенциален лечебен ефект.

V. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Изследване на физико-химичния състав на минерална вода

Изследвани сондажи

Предмет на изследването е минералната вода от 3 сондажа от Варненски басейн: обществена минерална чешма до Дом „Младост“ (P-106х), обществена минерална чешма под Аквариума (P-1х) и балнеология при хотел „Естрея Резиденс“, к.к. „Св. св. Константин и Елена“ (P-6х).

Пробовземане

Пробовземането е извършено на 16.03.2017 г. съгласно БДС ISO 5667-11; 11 БДС EN ISO 19458 от представител на Лабораторен изпитвателен комплекс при „ВиК – Варна“ ООД в присъствието на докторанта ас. Тодорка Сократева.

Описание на процедурата по пробовземане

Процедурата по пробовземане включваше следните стъпки:

- темпериране (чрез няколкократно пълнене и изпразване на бутилката с течаща минерална вода);
- измерване на температурата;
- вземане на проба минерална вода в стъклена бутилка на шлиф, тип "Карлсруе" с вместимост 250 ml за изпитване на свободен сероводород и разтворени сулфиди (пробата се съхраняваше на тъмно);
- вземане на проби минерална вода в пластмасови бутилки с вместимост 2.5 L за изпитване на: **класически физико-химични показатели** по Наредба 9/16.03.2001 г. и Наредба 14; **целеви показатели**, невлизащи в Наредба 9; **избрани показатели в динамика**.

Бутилките бяха напълвани с приливане и въздухът бе изгонван преди затварянето им.

Физикохимичен анализ

Взетите проби са кодирани и подадени за анализ в акредитиран Лабораторен изпитвателен комплекс при „ВиК – Варна“ ООД, сертификат за акредитация Рег. №103 ЛИ/29.03.2013 г. валиден до 31.03.2017 г., към датата на изпитването и издаден от ИА БСА съгласно изискванията на БДС EN ISO/IEC 17025:2006.

Анализът на пробите от трите водоизточника (Естрея, Аквариума, Дом Младост) е започнал след темпериране на пробите на стайна температура ($21\pm 3^{\circ}\text{C}$), в 13.30 часа на 16.03.2017 г.

Изследвани са:

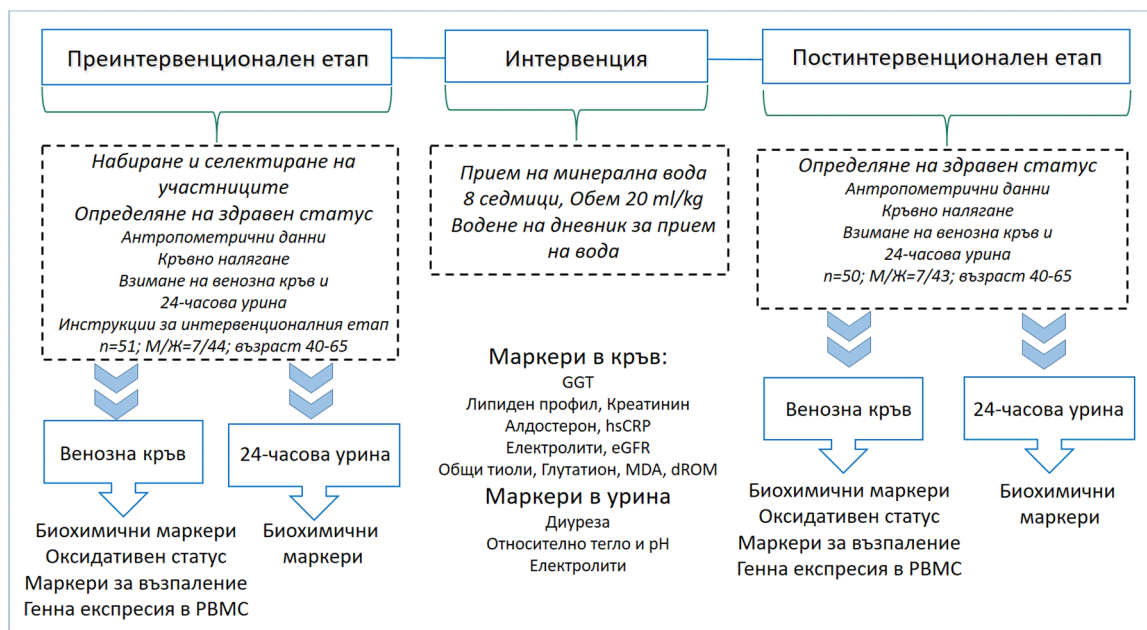
- **класически физикохимични показатели**, включени в Наредба №9 от 16.03.2001 г. за качеството на водата, предназначена за питейно-битови цели, които са идентични с тези, посочени в Наредба №14 за курортните ресурси, курортните местности и курортите (ДВ, бр. 79 от 1987 г., посл.изм.бр. 70 от 2004 г.), Приложение № 4 към чл. 7, ал. 4 „Хигиенни норми за съдържание на химични елементи и съединения, радий, естествен уран и обща бета-радиоактивност в минералните води от водоизточници, предназначени за бутилиране, в трапезни минерални води и тези за производство на безалкохолни напитки, а именно: температура, цвят по Рубльовската скала (БДС 8451:1977), мирис (БДС 8451:1977), мътност (БДС EN ISO 7027-1:2017), активна реакция (БДС EN ISO 10523:2012), амониев йон (ВМИ 3/2003), нитрити (ВМИ 4/2003), нитрати (ВМИ 5/2003), електропроводимост (БДС EN 27888:2002), обща твърдост (БДС 3775:1987), общ органичен въглерод (ВМИ 2/2007), калций (БДС ISO 6058:2002), магнезий (БДС 7211:1982/отменен без замяна), сулфати (ВМИ 9/2004), фосфати (ВМИ 7/2003), хлориди (БДС 3414:1980), желязо (тривалентно), (ВМИ 19/2002), желязо общо (ВМИ 19/2002), хром (шествалентен), (ВМИ 26/2003), флуориди (ВМИ 11/2005), селен (БДС 7213:1978), натрий (ВМИ 17/2007);
- **целеве показатели**, невлизаци в Наредба 9/16.03.2001: амоняк (БДС 17.1.4.10:1979), калий (ВМИ 16/2008), обща и съставна алкалност (БДС EN ISO 9963-1:2003), общ сух остатък (БДС 17.1.4.04:1980), разтворени сулфиди и свободен сероводород (ВМИ 10/2004);
- **избрани показатели са изследвани в динамика** (първи ден; след едно денонощие, след 3 денонощия; след 7 денонощия): цвят, мирис, мътност, активна реакция, амониев йон, амоняк, нитрити, електропроводимост, обща и съставна алкалност, разтворени сулфиди и сероводород.

Анализите са извършени с валидирани, акредитирани и стандартизирани по БДС аналитични методи за изпитване. Температурата на изпитване на всички параметри е $T 21 \pm 3^{\circ}\text{C}$ с изключение на общ сух остатък, анализиран при $T 105^{\circ}\text{C}$, а също активна реакция, електропроводимост и мирис, анализирани при $T 20^{\circ}\text{C}$.

Температурата на минералната вода от трите водоизточника се измерва на място с калибриран термометър И№5.8: $(37.0 \pm 0,6)^{\circ}\text{C}$.

2. Провеждане на проучване със здрави доброволци

Проучването на молекулните механизми на въздействие на сярсаъдържащите минерални води от Варненски басейн върху човешкия метаболизъм е интервенционално и включва три етапа - преинтервенционален, интервенционален и постинтервенционален. Дизайн на изследването е показан на Фигура 4.



Фигура 4. Дизайн на изследването

2.1. Преинтервенционален етап

Набиране и селектиране на участниците

Обект на изследването бяха клинично здрави индивиди от двата пола на възраст 40-65 г. от територията на гр. Варна, отговарящи на критериите за включване в изследването. Планираният брой участници бе 50.

Участниците в изследването са набрани чрез **обяви в:** официалния сайт и фейсбук страницата на МУ-Варна, телевизията на МУ – Варна (МУ-Vi TV), вътрешноведомствената система за документооборот на МУ–Варна, в-к „24 часа“ и неговото електронното издание и **чрез флайери**, разпространени в близост до обществените чешми, сред посетителите на академичната аптека и на Факултета по фармация по време на традиционното провеждане на „Дни на отворените врати“. Броят на доброволците е набран в продължение на 8 месеца след провеждане на анкетно проучване по предварително зададени критерии.

Критерии за включване на участниците:

- Възраст: 40-65 г.
- Произход/раса: Европейски/Европеидна
- Местожителство: гр. Варна
- Месторабота: гр. Варна
- В рамките на предходните три месеца **да не са** консумирали минерална вода от сондажите в района на гр. Варна
- През периода на изследването да не отсъстват от гр. Варна
- Информирано съгласие за участие

Критерии за изключване на участниците:

- Възраст под 40 г. и над 65 г.
- Бременност
- Кърмене
- Наличие на хронични заболявания (диабет, бъбречна недостатъчност и др. бъбречни заболявания, сърдечно-съдови, хипертония, заболявания на ГИТ като гастрит, колит, панкреатит, чернодробни, заболявания на щитовидната жлеза, онкологични, аутоимунни);
- Наличие на остри възпалителни заболявания;
- Психични разстройства
- Извършени хирургични интервенции през последните 6 месеца преди началото на изследването;
- Необяснима загуба на тегло ≥ 3 кг. през последните 3 месеца преди началото на изследването;
- Прием на някои от изброените лекарства: антидепресанти, стероидни противовъзпалителни средства (глюко- и минералокортикостероиди), хормон-заместителна терапия със стероидни хормони, тиреоидни хормони, антикоагуланти, диуретици;
- Прием на хранителни добавки, включващи магнезий, калций, желязо, витамини, селен;

Изследвани доброволци

Работата с изследваните доброволци е одобрена от Комисията по етика на научните изследвания при МУ-Варна, Решение № 62 от 04.05.2017 г. От 68 отзовали се и интервюирани доброволци, одобрени за участие бяха 51 доброволци (мъже/жени = 7/44), на възраст от 40 до

65 години (средна възраст 50.76 ± 7.38). 16 отпаднаха по критериите за изключване (15 с хронични заболявания, 1 е консумирал минерална вода от изследваните източници през последните три месеца). Един участник отпадна поради установен в хода на интервенцията дискомфорт в гастроинтестиналния тракт. Всички участници в изследването са попълнили и подписали „Информирано съгласие“, чрез което подробно са информирани за вида на изследването, извършваните процедури и условията на съхранение на резултатите. Също така всички участници са попълнили и „Анкетна карта“, съдържаща социо-демографски данни, информация за здравния статус, хранителните навици и начин на живот (Приложение 1).

Одобрените и включени в изследването доброволци са поетапно настанявани (преди и след интервенцията) за 2 нощувки на пълен пансион в хотел "Естрея Резиденс", съгласно Договор Рег.№ ДУ-100/13.06.2017 г., където се намира Отделението по рехабилитация на Клиниката по физикална и рехабилитационна медицина към УМБАЛ „Св. Марина“

Определяне на здравен статус

Селектираните участници са настанявани в хотела за период от 3 дни при следната организация:

Ден 1: Настаняване в хотела в 14:00 ч., съгласно политиката за хотелско настаняване, попълване на „Анкетна карта“ (Приложение 1) с информация за хранителните навици, начина на живот и физическата активност и подписване на информирано съгласие за участие в научното изследване. Инструктиране относно организацията на вземането на проби.

Ден 2: Явяване на участниците на указаното място в 7:30-8:30 ч. за антропометрични измервания, измерване на кръвното налягане, вземане на венозна кръв след 12 часово гладуване. Предоставяне на контейнери на участниците за събиране на 24-часова урина със съответните инструкции.

Ден 3: Събиране на контейнерите с 24-часова урина от участниците. Указания за водене на дневник за честотата на прием и количеството на приетата минерална вода. Инструктиране на участниците да не променят хранителните си навици и начин на живот по време на целия интервенционен период. Напускане на хотела.

2.2. Интервенционен етап

Ежедневен прием на минерална вода в продължение на 8 седмици, в зависимост от предварително определената телесна маса на участника в количество 20 mL/kg телесно тегло, но не по-малко от 800 mL в рамките на 24 часа, приемани по 200 mL на всеки втори час.

2.3. Постинтервенционален етап

През последните 2 дни от интервенцията участниците са повторно настанявани в същия хотел за еднократно вземане на венозна кръв и събиране на 24-часова урина и финално верифициране на интервенцията чрез проследяване на дневника за прием на вода, воден от участниците.

2.4. Събиране на проби

Вземане на кръв

Във вакутейнери за плазма с хепарин е взета венозна кръв на гладно преди (T0) и след (T1) интервенцията от всеки доброволец с общ обем 16 mL, разпределена както следва:

- 4 mL за определяне на класически биохимични маркери – изследване на липиди, гамаглутамил трансфераза, алдостерон, натрий, калий, калций, хлориди, фосфор, C-реактивен протеин, креатинин
 - 4 mL се темперират за 15 мин. на стайна температура и се центрофугират 15 мин. на 3500 оборота за отделяне на плазма, разпределена на аликвоти от 200 μ L и съхранявана на -80°C за последващи биохимични изследвания (адхезионни молекули и параметри на оксидативен статус)
 - 8 mL за отделяне на мононуклеарни кръвни клетки (PBMC) и изолиране на РНК, съхранявана при $T - 80^{\circ}\text{C}$ за последващи молекулярно генетични изследвания
- Венозната кръв е взета от квалифицирано медицинско лице.

Събиране на 24-часова урина

24 часовата урина е събирана в контейнери от поливинилхлорид с обем 2,7 L по следния начин: сутрин при събуждане от сън, първата порция се извърля и след това всяка следваща порция се събира в съда до следващата сутрин. При всяко прибавяне на урина, съдът се разклаща добре, съхранява се на хладно. Събирането на урината приключва с добавянето на първата порция урина от следващата сутрин. Диурезата се отчита и записва. От всяка проба са отделяни малки количества в контейнери с обем 50 mL за класически биохимичен анализ: рН на урина, белтък, глюкоза, кетони, еритроцити, левкоцити, нитрити, билирубин, уробилиноген, кръв, седимент.

Антропометрични измервания

Измервани са височина (m) и килограми (kg), изчисляван е индекс на телесна маса (ИТМ) в kg/m^2 ; измервани са обиколки на талия и ханш и са изчислявани съотношенията им преди (T0) и след (T1) интервенцията.

Кръвно налягане

Беше измерено в седнало и релаксирано положение преди (T0) и след (T1) интервенцията с автоматизирано устройство Tensoval comfort classic (Hartman group).

Допълнителни анкетни карти

В хода на изследването някои доброволци споделиха субективни наблюдения по време на интервенцията с прием на минерална вода, несвързани с риска от прием на минерална вода, което наложи включване на две допълнителни анкети карти – една за проучване субективните ефекти от приема минерална вода на включени в изследването доброволци (Приложение 2), и друга – за граждани на гр. Варна, невключени в изследването, но регулярно консумиращи минерални води от обществените чешми в града (Приложение 3). Целта на втората анкетна карта бе да се събере възможно най-пълна информация от потребителите на минерална вода относно техните знания за вида на Варненската минерална вода, причините и/или заболяванията, поради които те я пият; честота и количество на наливане/пиене, условия за съхранение и др. Двете анкети са одобрени от Комисията по етика на научните изследвания при МУ-Варна, Решение № 73 от 29.03.2018 г.

3. Анализ на класически биохимични маркери

3.1. Класически клинично-биохимични показатели в кръвен серум

Анализът на класическите биохимични показатели в кръвен серум на доброволци преди (T0) и след (T1) интервенцията с минерална вода се извърши от СМДЛ „Лаборекспрес 2000“ ООД. Бяха изследвани следните показатели:

- Показатели, оценяващи липидната обмяна: общ холестерол, LDL-холестерол, HDL-холестерол, триацилглицероли
- Показатели, оценяващи аминокиселинната обмяна: гама-глутамил трансфераза (ГГТ)
- Показатели, оценяващи водноелектролитния баланс: алдостерон, калий, натрий, хлориди, калций, фосфор

- Показатели, оценяващи възпалителния отговор: високочувствителен С-реактивен протеин (hs-CRP)

Нивата на ГГТ, общия холестерол, HDL-холестерола, LDL-холестерола, креатинина, триглицеридите, hs-CRP, натрий, калий, хлоридите, фосфор и калций бяха изследвани на анализатор „Olympus AU640“ по методи одобрени от IFCC (International Federation for Clinical Chemistry). Определянето на нивата натрий, калий и хлориди бе провеждано с йон-селективни електроди. Определянето на нивата на алдостерона бе извършено на имунологичен анализатор „Liaison“ чрез хемилуминисцентен имунологичен метод (CLIA).

3.2. Класически клиничко-биохимични показатели в урина

Анализът на биохимичните показатели в урина на доброволци преди (T0) и след (T1) интервенция с минерална вода се извърши от СМДЛ „Лаборекспрес 2000“ ООД. Изследвани бяха следните показатели:

- Показатели, оценяващи филтрационната способност на бъбреците: диуреза, рН, белтък, глюкоза, кетонни тела, еритроцити, левкоцити, нитрити, билирубин, уробилиноген, кръв, седимент в 24-часова урина

Уринните анализи са извършвани на апарат Dirui FUS-2000 urinalysis hybrid.

Всички изследвания в кръвен серум и урина са извършени в рамките на същия ден на вземане на пробите при спазени правила за качествен вътрешен и външен контрол в лабораторията.

3.3. Изчисляване на индекс на гломерулна филтрация на бъбреците (ИГФ) мл/мин

Индексът на гломерулна филтрация на бъбреците е изчислен по формулата на Кокрофт-Гаут, наречена на името на учените, които са я публикували за пръв път ([Cockcroft and Gault, 1976](#)). Формулата използва серумната концентрация на креатинина и измереното тегло на пациента, за да се предскаже отделеният креатинин. В настоящия дисертационен труд серумният креатинин е измерван в $\mu\text{mol/L}$ и приложената формула има следния вид:

$$eCr = \frac{(140 - \text{age}) \times \text{Mass}(\text{kg}) \times \text{Const}}{SCr(\mu\text{mol/L})}$$

eCr – изчислен клирънс на креатинин (на английски: estimated creatinine clearance)

Age – възраст

Mass (kg) – маса в килограми

SCr – серумен креатинин, концентрация (на английски: serum creatinine concentration)

Const (константа) = 1,23 – мъже; 1,04 - жени.

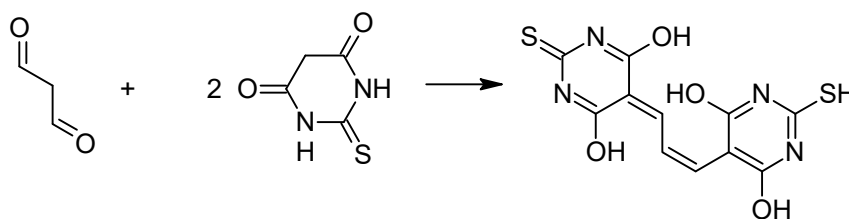
4. Определяне на оксидативен статус и антиоксидантна защита чрез оценка на специфични биохимични маркери

За оценка на оксидативния статус и антиоксидантната защита са използвани търговски китове. Изследвани са показатели, свързани с генерирането на активни кислородни форми и такива, които оценяват антиоксидантната защита на клетката и кръвен серум.

4.1. Показатели в кръвена плазма/серум, оценяващи генерирането на активни кислородни форми: малонов диалдехид (МДА), реактивни кислородни метаболити (РКМ)

Определяне концентрацията на малонов диалдехид

Определянето на МДА в серум е извършено посредством търговски кит на Northwest Life Science Specialties, LLC, Vancouver, Canada със спазени инструкции за приложение на кита. Принципът на метода се основава на реакция на МДА с тиобарбитурова киселина (ТК) и формиране на стабилни МДА-ТК₂ комплекси (Фигура 5), които абсорбират при 532 nm и могат да бъдат измерени колориметрично или флуорометрично.



Фигура 5. Реакция между МДА и ТК

Бутилиран хидрокситолуен (БХТ) и етилендиаминтетраоцетна киселина (ЕДТК) са добавени във всички проби и реакционната смес, за да се сведе до минимум окислението на липидите по време на пробоподготовката и реакцията с ТК. За да се избегне разграждане на липидните хидропероксиди, всички пипетираня са извършени върху лед. Тъй като по-голяма част от МДА е свързан с протеини посредством Шифови бази, рН на реакцията се оптимизира, за да се улесни хидролизата на МДА.

Пробоподготовката включваше размразяване на пробата плазма (200 μL) на стайна температура и центрофугиране за 3 мин. на 1000 оборота \times g за отделяне на супернатантите, с които се работи впоследствие. За построяване на стандартна крива в Епендорф епруветки от 1.5 μL с капачка на винт се приготвят стандарти по следната схема:

Реактив	Празна проба	Стандарт МДА 0 μM	Стандарт МДА 1 μM	Стандарт МДА 2 μM	Стандарт МДА 3 μM	Стандарт МДА 4 μM
БХТ [μL]	4 μL	4 μL	4 μL	4 μL	4 μL	4 μL
Стандарт МДА	-	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL
Физ. разтвор	100 μL	-	-	-	-	-
Реактив к-на	-	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL
Реактив ТК	-	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL

Легенда: БХТ - бутилиран хидрокситолуен; ТК - тиобарбитурова киселина; МДА - малонов диалдехид.

Пробата и стандартите се вортексират на 5 степен за 1 мин. и се инкубират при 60°C за 60 мин. в термоблок. След триминутно центрофугиране при 10 000 оборота \times g 100 μL от всяка проба се прехвърлят на 96-ямкова плака в две повторения. Отчита се абсорбция при дължина на вълната $\lambda=532$ nm на спектрофотометър Synergy 2 (BioTek). Концентрацията на МДА се определя по стандартна крива. Нивата на МДА (μM) са представени като средни стойности \pm SEM.

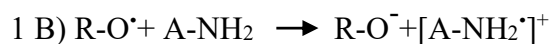
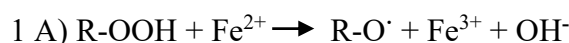
Схема на накапване на пробите и реактивите:

Реактив	Проба	Калибратор	Празна проба
БХТ [μL]	4 μL	4 μL	4 μL
Плазма	100 μL	-	-
Калибратор	-	100 μL	-
Физиологичен разтвор	-	-	100 μL
Реактив киселина	100 μL	100 μL	100 μL
Реактив ТК	100 μL	100 μL	100 μL

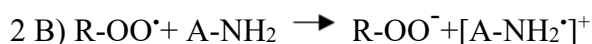
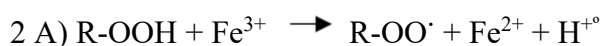
Определяне концентрацията на реактивни кислородни метаболити (РКМ)

Реактивните кислородни метаболити, предимно хидропероксици и органични радикали в плазма, са определяни с търговски кит на Diacron International (Grosseto, Italy), според указанията на производителя. В присъствието на желязо, освободено от плазмените протеини в ацетатен буфер (Реагент 2), РКМ генерират алкоксилни ($\text{R-O}\cdot$) и пероксилни ($\text{ROO}\cdot$) радикали в реакцията на Fenton. Тези радикали окисляват алкилно-заместени ароматни амини (A-NH_2 , присъстващи в хромогенна смес (Реагент 1), като образуват оцветени в розово съединения ($[\text{A-NH}_2.\text{J}^+$), съгласно реакциите:

За алкоксилни радикали:



За пероксилни радикали



Пробоподготовката включваше: размразяване на хепаринизирана плазма всяка с обем 200 μL , центрофугиране при 24°C на 10000 оборота $\times g$ за 5 мин. за отделяне на супернатантите, с които се работи. Предварително се анализира контрола с две проби със всички реактиви и стандартни серуми - с висока концентрация на РКМ и с ниска концентрация на РКМ. Всички проби са мерени в две повторения. Празна проба на реагентите и калибратора са приготвяни за всяка серия.

Схема на накапване на плаката:

Реактиви	Празна на реагента	Калибратор	Проба	Стандартен серум ¹	Стандартен серум ²
Реагент 2	800 μL	800 μL	800 μL	800 μL	800 μL
Реагент 1	8 μL	8 μL	8 μL	8 μL	8 μL
д.Н ₂ О	4 μL	-	-	-	-
Калибратор	-	4 μL	-	-	-
Плазма	-	-	4 μL	4 μL	4 μL

Легенда: Реагент 1 – хромоген, ароматен алкил-амид; Реагент 2 – ацетатен буфер, рН 4.8; д.Н₂О – дейонизирана вода; ¹Стандартен серум с висока концентрация на РКМ; ²Стандартен серум с ниска концентрация на РКМ.

Плаката се вортексира на 3 степен за 10 секунди след което се инкубира 90 мин. в термостат на 37°C. Спектрофотометрично измерване на абсорбцията на пробите е извършено на Synergy 2 (BioTek) срещу празната на реагента при дължина на вълната $\lambda=505 \text{ nm}$. Нивата на РКФ са изчислявани по формулата:

$$\frac{A_{\text{пр}}}{A_{\text{кал}}} \times C_{\text{кал}},$$

където $A_{\text{пр}}$ е абсорбция на пробата

$A_{\text{кал}}$ е абсорбция на калибратора

$C_{\text{кал}}$ е концентрация на калибратора.

Получените резултати в Caratelli Units (CARR U), са преизчислявани в mg H₂O₂/dL, като 1 CARR U = 0.08 mg H₂O₂/dL. Нивата на РКМ (mg H₂O₂/dL) са представени като средни стойности ± SEM. Стойности между 300-320 CARR U (24.08-25.60 mg H₂O₂/dL) са индикация за липса на оксидативен стрес. Съгласно указанията в кита, нивото на оксидативен стрес се интерпретира в зависимост от концентрацията на РКМ:

CARR U	mg H ₂ O ₂ /dL	
321-340	<27.20 mm	ниско ниво на оксидативен стрес
341-400	27.28 -32.00	средно ниво на оксидативен стрес
401-500	32.08 – 40	високо ниво на оксидативен стрес
> 500	> 40 mm	много високо ниво на оксидативен стрес

4.2. Показатели в кръвен серум, оценяващи антиоксидантната защита: концентрация на общи тиоли, общ и редуциран глутатион

Определяне концентрацията на общи тиоли

Нивата на общите тиоли са измерени с търговски кит на Diacron International (Grosseto, Italy). Методът се базира на способността на тиоловите групи в плазма в буфериран разтвор (Реагент 1) да реагират с 5,5 дитиобис-2-нитробензоена киселина (DNFB), образувайки фотометрично измерим цветен комплекс, разтворим в хромоген (Реагент 2). Пробоподготовката включва размразяване на плазмата (200 µL на проба) при стайна температура; центрофугиране 5 мин. при 4°C на 10 000 оборота x g за отделяне на супернатантите, които се накапват на 96-ямкови плаки върху лед. Докато трае накапването, реактивите също са върху лед. Приготвят се по две паралелни проби и три празни проби при следната работна схема:

Реактив	Реагент бланк	Калибра тор бланк	Калибрато р	Празна проба	Проба	Бланк ¹	Стандарт ²	Бланк ³	Стандат ⁴
Реагент 1	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL
Реагент 2	4 µL	-	4 µL	-	4 µL	-	4 µL	-	4 µL
д.Н ₂ О	10 µL	4 µL	-	4 µL	-	4 µL	-	4 µL	-
Плазма	-	-	-	10 µL	10 µL	-	10 µL	10 µL	10 µL
Калибра тор	-	10 µL	10 µL	-	-	-	-	-	-

Легенда: Реагент 1 (буфер); Реагент 2 хромоген 5,5 дитиобис-2-нитробензоена киселина; д.Н₂О – дейонизирана вода; ¹Бланк на стандартен серум с висока концентрация на тиолови групи; ²Стандартен серум с висока концентрация на тиолови групи; ³Бланк на стандартен серум с ниска концентрация на тиолови групи; ⁴Стандартен серум с висока концентрация на тиолови групи.

Плаката се инкубира 3 мин. в термостат на 37°C. Преди отчитане на абсорбцията се вортексира на 3 степен за 1 мин. Съгласно закона на Lambert-Beer интензитетът на оцветяването е пропорционално на концентрацията на тиолите. Абсорбцията се мери при дължина на вълната $\lambda=405$. Концентрациите на общите тиоли преди и след интервенцията се изчисляват по формулата:

$$\frac{A \text{ проба} - (A \text{ празна проба} + A \text{ реагент бланк})}{A \text{ кал.} - (A \text{ кал. бланк} + A \text{ реагент бланк})} \times C \text{ кал.}, \text{ където}$$

A проба – абсорбция на проба

A празна проба – абсорбция на празната проба

A реагент бланк – абсорбция на празната на реагента

A кал. – абсорбция на калибратора

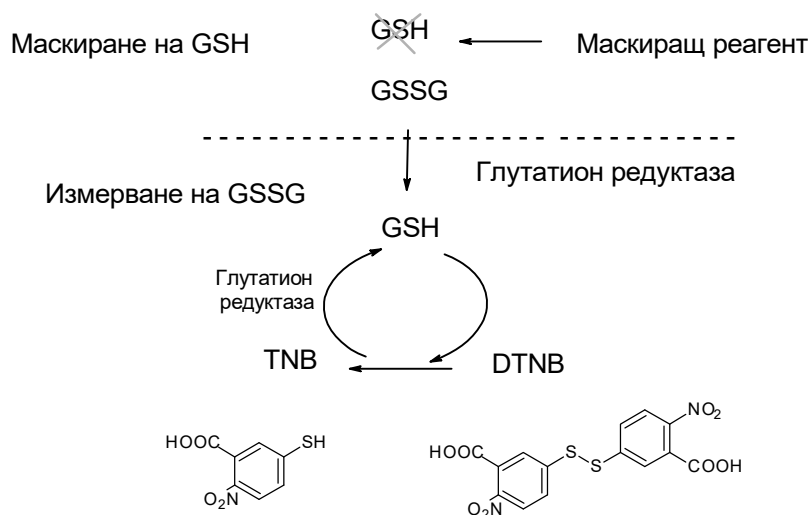
A кал. бланк – абсорбция на празната на калибратора

C кал. – концентрация на калибратора.

Резултатите са представени в $\mu\text{mol/L}$. Референтните стойности на общите тиоли, измерени с кита, съгласно достъпните литературни данни са между 450-650 $\mu\text{mol/L}$. Според инструкциите нива под 450 $\mu\text{mol/L}$ са показател за понижаване на антиоксидантната бариера в плазма и са индикатор за оксидативен стрес. Нивата на общите тиоли ($\mu\text{mol/L}$) са представени като средни стойности \pm SEM.

Определяне концентрацията на окислен и редуциран глутатион

Концентрациите на окислен и редуциран глутатион в плазма са определени чрез търговски кит на Sigma-Aldrich Co (USA). Методът е ензимен, базиран на редукцията на окисления глутатион (GSSG) с глутатион редуктаза и последваща колориметрична реакция с DTNB или реактив на Елман до получаване на 5-меркапто-2 нитробензоена киселина (TNB), вещество с жълт цвят, чиято абсорбция се измерва при дължина на вълната $\lambda=412 \text{ nm}$ (Фигура 6). Определянето на GSSG е извършено след добавяне на маскиращ реагент за редуциран глутатион (GSH). Количеството на редуцирания глутатион е изчислено от разликата между общия глутатион (tGSH) и окисления. Като индекс на оксидативен стрес е изчислено съотношението окислен глутатион/редуциран глутатион (GSSG/GSH).



Фигура 6. Принцип на метода

Подготвят се по два набора проби за определяне на GSH и GSSG. За определяне концентрацията на tGSH в пробата се подготвят серийни разреждания на стандартите за GSSG и GSH.

Стандартен разтвор на GSSG (100 μL) с концентрация 100 $\mu\text{mol/L}$ се смесват с 300 μL 0.5% сулфосалицилова киселина (ССК) за получаване на стандартен разтвор на GSSG с концентрация 25 $\mu\text{mol/L}$. Следващите стандартни разтвори се приготвят със серийни разреждания с 200 μL 0.5% ССК до получаване на стандарти с обеми 200 μL и концентрации: 12.5 $\mu\text{mol/L}$, 6.25 $\mu\text{mol/L}$, 3.13 $\mu\text{mol/L}$, 1.57 $\mu\text{mol/L}$, 0.78 $\mu\text{mol/L}$, общо 6 стандарта.

В Епендорф епруветка с вместимост 1.5 mL се смесват 100 μL стандартен разтвор на GSH (200 $\mu\text{mol/L}$) и 300 μL 0.5% ССК за получаване на стандарт на GSH с концентрация 50 $\mu\text{mol/L}$. Следващите стандартни разтвори се приготвят със серийни разреждания с 200 μL 0.5% ССК до получаване на стандартни разтвори с обеми 200 μL и концентрации: 25 $\mu\text{mol/L}$, 12.5 $\mu\text{mol/L}$, 6.25 $\mu\text{mol/L}$, 3.13 $\mu\text{mol/L}$, 1.57 $\mu\text{mol/L}$, общо 6 стандарта.

Подготовката на пробата за определяне на GSSG (проба А) се извършва след размразяване при стайна температура и центрофугиране на 10 000 оборота хг за 3 мин. В Епендорф епруветка към 100 μL супернатанта се добавят 10 μL маскиращ агент. След едноминутно вортексиране на 4 степен към пробата се добавят 50 μL 5% ССК за утаяване на белтъка, последвано от 2 мин. вортексиране и 2 мин. центрофугиране на 14 000 оборота хг. 100 μL от супернатантата се прехвърлят в нова епруветка и към тях се добавят 230 μL дестилирана вода за намаляване концентрацията на ССК до 0.5%. Към пробата се добавят 990 μL дихлорметан (ДНМ) за екстрахиране на маскиращия агент, който в излишък би инхибирал

глутатион редуктазата. След 5 минутен вортекс и центрофугиране на 14 000 оборота xg следва прехвърляне на пробите на в 96-ямкови плаки за спектрофотометричен анализ.

Пробоподготовката за определяне на общ глутатион (проба В) е същата с тази разлика, че в пробата не се добавят маскиращ агент и дихлорметан.

20 μL от разредените стандартни разтвори на GSSG, GSH и от пробите А и Б се накапват по схема в две повторения. Добавят се по 60 μL буферен разтвор. Плаката се покрива с капак и се инкубира в термостат при 37°C за 1 час. После се добавят 10 μL субстрат (DTNB), 10 μL коензим (НАДФН), 10 μL ензим (глутатион редуктаза). Плаката с капак се инкубира в термостат при 37°C за 10 мин. Абсорцията се отчита при дължина на вълната $\lambda=412$.

Концентрациите на GSSG (проба А) и концентрациите на общия глутатион (GSH + GSSG) на проба В преди и след интервенцията се отчитат чрез стандартни криви съответно за GSSH и за tGSH. Концентрацията на GSH в пробите се изчислява по формулата:

$$\text{GSH} = \text{общ глутатион} - \text{GSSG} \times 2 \times 3.3, \text{ където}$$

3.3 е фактор на разреждане.

Нивата на общия глутатион, GSH и GSSG ($\mu\text{mol/L}$) са представени като средни стойности \pm SEM.

5. Анализ на специфични биохимични маркери за възпаление в кръвен серум

5.1. Определяне концентрацията на ICAM-1

Нивата на междуклетъчната адхезионна молекула (ICAM-1) са определени чрез ензимно-свързан имуносорбентен анализ ELISA посредством търговски кит “Human ICAM-1 ELISA Kit“ на Sigma-Aldrich, USA. Методът използва специфично улавящо антитяло, имобилизирано върху 96 ямкова плака. Стандартите и пробите в обеми от 100 μL се пипетират в ямките на плаката за свързване на целевия протеин в пробата от имобилизираното антитяло. Ямките се покриват и инкубират за 2,5 часа при стайна температура с леко разклащане. Следва четирикратно промиване с 300 μL промиващ буфер и добавяне на 100 μL специфично биотинилирано антитяло за откриване на таргетния протеин (ICAM-1). След 1 час инкубиране на стайна температура и леко разклащане ямките се промиват 4 пъти с 300 μL промиващ буфер от несвързаното биотинилирано антитяло. След това в тях се накапват 100 μL ензим (конюгиран с пероксидаза от хрян стрептавидин, известен като HRD-стрептавидин). След 45-мин. инкубация на стайна температура ямките отново се промиват 4 пъти с буфера и се накапват със субстрата на пероксидазата - 3,3', 5,5'-тетраметилбензидин (ТМВ). Последното

30-мин. инкубиране е на тъмно, при леко разклащане, на стайна температура. Образуваното оцветяване е пропорционално на количеството ICAM-1. Реакцията се спира с 50 μ L стоп разтвор във всяка ямка, което променя цвета от син в жълт. Интензивността на цвета се измерва при дължина на вълната $\lambda=450$ nm. Всички проби са в две повторения и са съотнесени към стандартна крива. Резултатите са представени като средните стойности \pm SEM.

5.2. Определяне концентрацията на VCAM-1

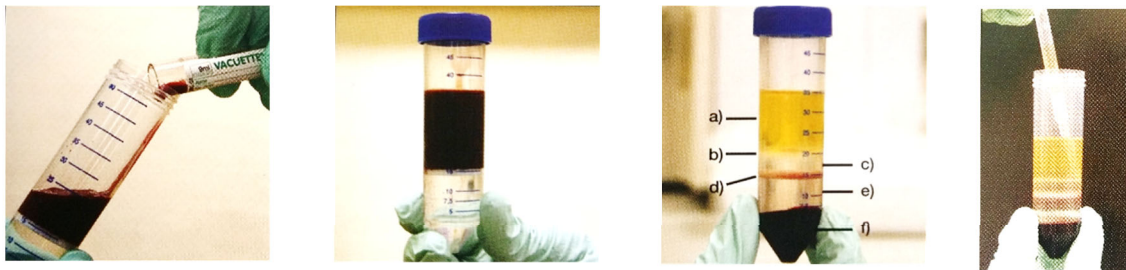
Нивата на съдовата клетъчна адхезионна молекула (VCAM-1) са определени чрез ензимно-свързан имуносорбентен анализ ELISA посредством търговски кит „Human VCAM-1 ELISA Kit“ на Sigma-Aldrich, USA. Подготовката на реактивите следва инструкциите в кита, като преди извършване на анализа те заедно с пробите се темперират на стайна температура (18-25°C). Методът използва специфично улавящо антитяло, имобилизирано върху 96 ямкова плака. Стандартите и пробите в обеми от 100 μ L се пипетират в ямките на плаката за свързване на целевия протеин в пробата от имобилизираното антитяло. Ямките се покриват и инкубират за 2,5 часа при стайна температура с леко разклащане. Следва четирикратно промиване с 300 μ L промиващ буфер и добавяне на 100 μ L специфично биотинилирано антитяло за откриване на таргетния протеин (VCAM-1). След 1 час инкубиране на стайна температура и леко разклащане ямките се промиват 4 пъти с 300 μ L промиващ буфер от несвързаното биотинилирано антитяло. След това се добавя 100 μ L ензим (конюгиран с пероксидаза от хрян стрептавидин, известен като HRD-стрептавидин). След 45-мин. инкубация на стайна температура ямките отново се промиват 4 пъти с буфера и се добавя субстратът на пероксидазата - 3,3', 5,5'-тетраметилбензидин (TMB). Последното 30-мин. инкубиране е на тъмно, при леко разклащане, на стайна температура. Образуваното оцветяване е пропорционално на количеството VCAM-1. Реакцията се спира с 50 μ L стоп разтвор във всяка ямка, което променя цвета от син в жълт. Интензивността на цвета е измерена при дължина на вълната $\lambda=450$ nm. Всички проби са мерени в две повторения и са съотнесени към стандартна крива. Резултатите са представени като средните стойности \pm SEM.

6. Изследване на гена експресия на избрани гени в периферни мононуклеарни клетки (PBMC) във връзка с оценка на антиоксидантния статус и противозъпалителния отговор

Анализирана е степента на експресия на гени, свързани с антиоксидантната защита – глутамат-цистеин лигаза (GCL), възпалителния отговор - съдови адхезионни молекули (sICAM-1, VCAM-1).

6.1. Изолитане на РВМС от пълна крѳв

Част от взетата пълна крѳв от доброволците в интервенцията е използвана за изолитане на периферни мононуклеарни клетки (РВМС). За целта са използвани готови търговски сепарационни центрофужни епруветки LeucoSep™ (Greiner Bio-One GmbH, Germany), съдържащи пореста бариера, която осигурява разделяне на клетъчните фракции посредством плътностно-градиентно разпределение по центробежната сила. По време на центрофугирането от еритроцитната и гранулоцитна маса се отделят лимфоцити и РВМС, които се концентрират в интерфаза над сепарационната среда. Стъпките, които са следвани са съобразени с протокола на производителя (Фигура 7):



Фигура 7. Изолитане на РВМС от антикоагулирана пълна крѳв: 1. Прехвърляне на крѳта в сепарационна епруветка; 2. Крѳта преди центрофугиране; 3. Фракции, получени след центрофугиране на пълна крѳв в сепарационна епруветка (от горе надолу): а) плазма; б) интерфаза, обогатена с РВМС; в) сепарационна среда; д) пореста бариера; е) сепарационна среда; ф) фракцията, богата на еритроцити и гранулоцити; 4. Отнемане на фракцията, обогатена с РВМС.

- Антикоагулирана пълна крѳв се разрежда в съотношение 1:1 с фосфатен буфериран физиологичен разтвор (PBS) и внимателно се разбърква чрез разклацане
- Разредената крѳв внимателно се прехвърля в сепарационната епруветка
- Епруветките с пробите се центрофугират 10 мин. при стайна температура на 1000 x g без спиращка на ротора
- След центрофугирането се наблюдават видими фракции (Фигура 7.3). Фракцията, съдържаща РВМС, внимателно се отнема с пипета и се прехвърля в друга стерилна епруветка
- Фракцията, обогатена с РВМС, се промива двукратно с по 10 ml PBS, като всяко промиване е последвано от центрофугиране за 10 мин. при стайна температура и на 250 x g
- Промитата фракция РВМС се разрежда с 200 µl PBS и се използва за изолитане на РНК

6.2. Изолиране на РНК

Изолирането на РНК от моноклнерани клетки от периферна кръв е извършено с помощта на Ron's FastTri reagent (Bioron, Germany), като лабораторният протокол по изолирането следва указанията на производителя. Концентрацията на изолираната РНК е измерена спектрофотометрично с цел проверка ефективността от изолирането. За да се премахнат остатъци от ДНК от изолирания материал, РНК е третирана ДНКазно.

6.3. ДНКазно третиране на тотална РНК

Протоколът на ДНКазното третиране следва указанията на производителя (Promega, USA, кит с наименование RQ1 RNase-Free DNase). Реакцията се провежда в RQ1 RNase-Free DNase 10x Reaction buffer и добавен ензим RQ1 RNase-Free DNase I (1U/μg РНК) към предварително разредена (3-4 пъти) РНК с нуклеазно чиста вода до достигане на краен обем на реакцията 10 μL.

При накапване на реактивите в ямките на плаката се спазва следната последователност:

- Нуклеазно чиста вода
- DNase 10x Reaction butter
- РНК
- Ензим RQ1 RNase-Free DNase I

След нужната инкубация за протичане на реакцията (30 мин. на стайна температура) се добавя 1 μL Стоп разтвор и плаката се инкубира 10 мин. при 65°C за инактивиране на ензима. Реакцията е осъществена на GeneAmp PCR 7500 thermal cycler (Applied Biosystem). След това пречистената РНК се мери спектрофотометрично за определяне на окончателната ѝ концентрация.

6.4. Обратна транскрипция – RT-PCR

Първата стъпка при количествен Real-Time PCR анализ е осъществяване на обратна транскрипция на изолираната РНК и синтез на кДНК.

РНК (100 ng) е обратно транскрибирана с помощта RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, USA), съдържащ всички необходими реагенти за работа – олиго (dT)₁₈ праймер, реакционен буфер, нуклеазно чиста вода, РНКазен инхибитор, микс от нуклеотиди (дНТФ) и RevertAid™ обратна транскриптаза. Реакцията се провежда според указанията на производителя на GeneAmp PCR 7500 thermal cycler (Applied Biosystem), при краен обем на реакционната смес 10 μL, инкубация за синтез на кДНК при 42°C за 60 мин. и

терминация на процеса при загряване на пробите до 70°C за 5 мин. Синтезираните кДНК се разреждат с 30 µL TE буфер.

6.5. Real Time qPCR

Втората стъпка при количествен Real-Time PCR анализ е амплификация на кДНК в реално време с ген-специфични праймери. Нуклеотидната последователност на праймерите, използвани за анализ е представена в Таблица 8.

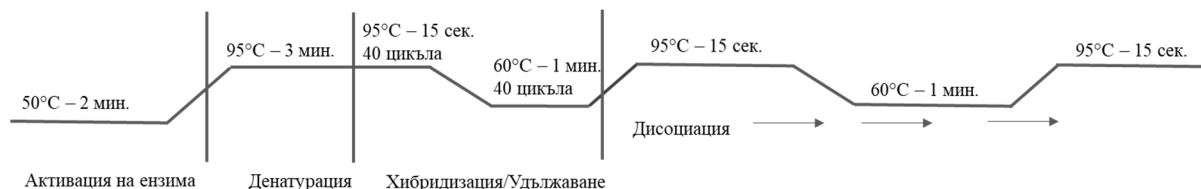
Таблица 8. Нуклеотидната последователност на праймерите, използвани за анализ на нивото на генната експресия

Гени	Нуклеотидна последователност
RPLP0 (Sigma Aldrich, USA)	Forward 5'-AGCCCAGAACACTGGTCTC -3', Reverse 5'-ACTCAGGATTTCAATGGTGCC -3'
ACTB1 (Bioneer, USA)	Forward 5'-ATTGCCGACAGGATGCAGA -3' Reverse 5'-GCTGATCCACATCTGCTGGAA -3'
RPL37A (Bioneer, USA)	Forward 5'-ATTGAAATCAGCCAGCACGC -3' Reverse 5'-AGGAACACAGTGCCAGATCC -3'
ICAM-1 (Bioneer, USA)	Forward 5'-TTGGGCATAGAGACCCCGTT -3', Reverse 5'-GCACATTGCTCAGTTCATACACC -3'
VCAM-1 ((Sigma Aldrich, USA)	Forward 5'-GGGAAGATGGTCGTGATCCTT -3' Reverse 5'-TCTGGGGTGGTCTCGATTTTA -3'
GCLc (Bioneer, USA)	Forward 5'-GGAGGAAACCAAGCGCCAT -3', Reverse 5'-CTTGACGGCGTGGTAGATGT -3'
CBS (Sigma Aldrich, USA)	Forward 5'-GGCCAAGTGTGAGTTCTTCAA -3' Reverse 5'-GGCTCGATAATCGTGTCCCC -3'
CTH (Sigma Aldrich, USA)	Forward 5'-CATGAGTTGGTGAAGCGTCAG -3' Reverse 5'-AGCTCTCGGCCAGAGTAAATA -3'
iNOS (Sigma Aldrich, USA)	Forward 5'-TTCAGTATCACAACCTCAGCAAG -3' Reverse 5'-TGGACCTGCAAGTTAAAATCCC -3'

В хода на изследването бяха извършени експерименти за установяване експресията на гените: цистатионин бета-синтаза (CBS), цистатионин гама-лиаза (CGL), глутатион пероксидаза (GPx), индуцируема азотен окис синтаза (iNOS), метилтрансфераза (DNMT3b) с различни ендогенни контроли RPL0, RPL37a и ACTβ1, но бяха получени неспецифични амплификации и поради тази причина бяха изключени от докладваните резултати.

Като матрица за провеждане на количествен Real Time PCR е използвана 0.01-0.1 µg кДНК. Крайната концентрация на праймерите в реакционната смес е 300 nM. Амплификацията е извършена с помощта на търговски кит КАРА SYBR Fast Universal qRT-PCR kit (Кара Biosystems, USA). Крайният обем на реакционната смес бе 5 µL.

Реакциите са извършени в 96 ямкови плаки при използвана програма на Real Time qPCR, Фигура 8.



Фигура 8. Програма на Real Time qPCR

За потвърждение на амплификацията на специфичните транскрипти след всеки Real Time PCR цикъл е добавена стъпка на дисоциация. Анализът е извършен на апарат ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems). RPLP0 се използва като ендогенна контрола. Стойностите на генната експресия на GCL, ICAM-1 и DNMT-1 са изчислени по $2^{-\Delta\Delta Ct}$ метода (Livak and Schmittgen, 2001) и са изразени в относителни единици (пъти) иРНК, като нивата на експресия за всеки доброволец преди интервенцията (T0) се приемат за 1 и тези стойности се използват като контрола за изчисляване на експресията след интервенцията (T1).

7. Статистическа обработка и графично представяне на данните

Статистическата обработка на резултатите е извършена с помощта на статистическите пакети GraphPad Prism, версия 6 и IBM SPSS, версия 19. Бяха използвани следните методи:

- Deskriptiven анализ – в табличен вид е представено честотното разпределение на разглежданите фактори, разбити по групи на изследване;
- Вариационен анализ – за оценка на характеристиките на централната тенденция и разсейване на данните;
- t-тест на Student – за проверка на хипотези за различие между две зависими или независими извадки;
- Непараметричен корелационен анализ на Spearman - за търсене на зависимост между два количествени признака;
- Графичен анализ – за визуализация на получените резултати.

Получените стойности са представяни като средна стойност от минимум две измервания \pm стандартна грешка на средната стойност (Mean \pm SEM). За ниво на значимост, при което се отхвърля нулевата хипотеза, бе прието $p < 0.05$

VI. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Определяне на физико-химичен състав на минерална вода от Варненски басейн

1.1. Подбор на водоизточниците

Проучване на регистрите, публикувани в сайта на Министерството на здравеопазването и сайта на Басейнова дирекция "Черноморски регион", с издадените сертификати за балнеологични оценки и за бутилиране на минерални води от Варненски басейн показва, че водите от сондажи **P-6x** и **P-106x** спадат към находище на минерална вода Район "Североизточна България" - подземни води от малмоваланжския водоносен хоризонт с температура, по-висока от 20° - област Варна, област Добрич, област Шумен. Показанията за лечение, характерни за водите от този водоносен хоризонт чрез питейното приложение, са основно върху заболявания на стомашно-чревния тракт, жлъчно-чернодробната и бъбречно-отделителната система (Обща информация за находищата на минерални води - изключителна държавна собственост, по Приложение № 2 към чл. 14, т.2 от Закона за водите). В регистъра за издадените сертификати за бутилиране на натурална минерална вода, последно актуализиран на 1 февруари 2019 г., има данни, че за сондажи №P-6x, „Св. св. Константин и Елена“ и №P-106x, "Дом Младост" са били издадени сертификати, които към момента на провеждане на проучването са с изтекъл срок. За водовземно съоръжение сондаж №P-6x „Св. св. Константин и Елена“ е направена балнеологична оценка №74/19.10.2017 г., фигурираща в Регистър на издадените от МЗ балнеологични оценки за минерални води актуален към 02.01.2019 г. За водовземно съоръжение сондаж №P-106x „Дом Младост“ също е издадена балнеологична оценка №117/15.03.2019 г. В регистъра на Басейнова дирекция "Черноморски регион" за издадени разрешителни за водовземане на минерални води - изключителна държавна собственост е вписан сондаж №P-1x, до Аквариума, за който е издадено разрешително за ползване на минералната вода за лечебни и питейни цели от Специализирана болница за рехабилитация-Варна" АД (СБР), валидно до 2031 г.

На база гореизложеното и на база данните от литературния обзор относно физико-химичната характеристика на водите на Варненски басейн – слаба минерализация, термалност и липса на балнеоспецифични компоненти, ограничаващи приложението (като например въглекиселите не се прилагат в басейн, радоновите - по време на бременост, флуорните със съдържание на флуор над 1.5 ml/L се пият по лекарско предписание (Кароколев, 1990; Владева, 2011), **широката област на приложение** на слабоминерализираните води (*бъбречнокамъчна*

болест, подагра, хронични интоксикации с тежки метали и лекарства, хронични възпалителни процеси на пикочопроводите и жлъчните пътища, жлъчно каменна болест, хипокинетични колити, единствен бъбрек, начална бъбречна недостатъчност, оксалатна, фосфатна и уратна диатеза, хронични бронхити, диабет, затлъстяване, хронични бронхити, гастрити, хепатити, язвена болест, храносмилателно обусловено кожни заболявания и др.), (Караколев, 1990 г.) и имайки предвид фактора "достъпност, популярност сред гражданите", беше решено да се анализират минералните води от три водоизточника: обществена чешма под Аквариума (сондаж Р-1х), обществена чешма до "Дом Младост" (сондаж Р-106х) и „Естрея Резиденс“, к.к. „Св. св. Константин и Елена“ (сондаж Р-6х), с изнесената база на Клиника по физиотерапия, рехабилитация, морелечение, МБАЛ Св. Марина – Варна, МУ- Варна.

1.2. Пробовземане

Пробовземането бе извършено на 16.03.2017 г. в следната последователност: *Проба 1* хотел „Естрея Резиденс“, к.к. „Св. св. Константин и Елена“; *Проба 2* обществена минерална чешма под Аквариума и *Проба 3* обществена минерална чешма до "Дом Младост“.

Проба 1 Естрея (Р-6х)

Пробовземането бе извършено в присъствието на преставител на хотел „Естрея Резиденс“. Час на пробовземане - 10.20 часа. Температура на минералната вода - 37°C.

Бяха взети 2 проби - 1 стъклена бутилка на шлиф (тип „Карлсруе“), с вместимост 250 mL за изследване на разтворени сулфиди и свободен сероводород и 1 пластмасова бутилка с вместимост 2,5 L за изпитване на класически и целеви физико-химични показатели в нулев час.



Снимка 1. Пробовземане от хотел „Естрея Резиденс“



Снимка 2. Измерване на T°

Проба 2, Аквариум (P-1x)

Час на пробовземане - 10.45 часа. Температура на минералната вода – 37.5°C.



Снимка 3. Чешма „Аквариум“



Снимка 4. Измерване на T°

Взети бяха 3 проби - 1 стъклена бутилка на шлиф (тип „Карлсруе“), с вместимост 250 mL за изследване на разтворени сулфиди и свободен сероводород и 2 пластмасови бутилки с вместимост 2,5 L всяка – за изпитване на класически и целеви физико-химични показатели, както и за изпитване на избрани показатели в динамика (първи ден; след едно денонощие, след 3 денонощия; след 7 денонощия).

Проба 3, Дом Младост (P-106x)

Час на пробовземане – 11.15 часа. Температура на минералната вода – 45°C.



Снимка 5. Чешма „Дом Младост“



Снимка 6. Информационна табела „Дом Младост“

Взети бяха 2 проби - 1 стъклена бутилка на шлиф (тип „Карлсруе“), с вместимост 250 mL за изследване на разтворени сулфиди и свободен сероводород и 1 пластмасова бутилка с

вместимост 2,5 L за изпитване на класически и целеви физико-химични показатели в нулев час.

1.3. Резултати от анализ на класически физико-химичния състав на минерална вода по показатели, включени в Наредба 9/16.03.2001 г.

Резултатите са предоставени с Приемо-предавателен протокол ВЙ-239/31.03.2017 г. от ръководителя на ЛИК при „ВиК – Варна“ ООД, инж. Дора Славчева ведно с протокол за вземане на проби №107/16.03.2017 и 4 бр. протоколи от изпитване.

Резултатите от анализите за физико-химичния състав на минералната вода от трите изследвани водоизточника са представени на Таблица 9.

Таблица 9. Резултати от анализ на физико-химичния състав на минерална вода от Естрея, Аквариум и Дом Младост по показатели, включени в Наредба 9/16.03.2001 г.

Показател	Единица	Естрея	Аквариум	Дом Младост	МДК*
Цвят	градус	0	0	0	Без значими колебания
Мирис (20°C)	бал	2	2	3	Без значими колебания
Мътност	FNU	0,24 ± 0,05	<0,05	1,26 ± 0,09	Без значими колебания
Активна реакция (20°C)	pH единици	7,5 ± 0,1	7,6 ± 0,1	7,18 ± 0,05	6,5-9,5
Амониев йон	mg/L	0,18 ± 0,02	0,29 ± 0,003	0,20 ± 0,02	0,50
Нитрити	mg/L	<0,05	<0,05	<0,05	0,50
Нитрати	mg/L	<3	<3	<3	50
Електропроводимост (20°)	µS/cm	677 ± 30	768 ± 34	743 ± 33	2000
Обща твърдост	mg eqv/L	4,4 ± 0,1	3,9 ± 0,1	4,1 ± 0,1	12
Калций	mg/L	44 ± 1	43 ± 1	42 ± 1	150
Магнезий	mg/L	27 ± 1	27 ± 1	24 ± 1	80
Сулфати	mg/L	54 ± 5	77 ± 7	50 ± 7	250
Фосфати	mg/L	<0,03	<0,03	0,040±0,004	0,50
Хлориди	mg/L	77 ± 3	104 ± 5	100 ± 4	250
Желязо тривалентно	µg/L	44 ± 5	34 ± 4	17 ± 2	200
Желязо общо	µg/L	70 ± 8	59 ± 7	37 ± 4	200
Хром шествалентен	µg/L	<10	<10	<10	50
Флуориди	mg/L	0,50 ± 0,07	0,71 ± 0,09	0,62 ± 0,08	1,5
Селен	µg/L	<1	<1	<1	10
Натрий	mg/L	46 ± 6	39 ± 5	69 ± 8	200
Общ органичен въглерод	mg/L	9,3 ± 0,9	7,5 ± 0,8	12 ± 1	Без значими колебания

Резултатите са представени като стойност и неопределеност ±U; „< ...“ – под границата на количествено определяне на метода; * МДК - максимална допустима концентрация по нормативен документ, Наредба 9/16.03.2001. Условието на изпитване за всички параметри са T 21 ± 3°C с изключение за параметрите електропроводимост, активна реакция и мирис, изследвани при T 20°C.

В резултат от извършените дейности по *пробовземане и класически физикохимични анализи* бяха получени нови данни за физико-химичния състав на минерална вода от Варненски басейн по показателите, регламентирани в Наредба № 9 и Наредба №14.

1.4. Резултати от анализ на целеви физико-химични параметри

Целта на настоящия дисертационен труд, свързана с проучване на молекулните механизми на действие на сярасъдържащи минерални води от Варненски басейн върху човешкия метаболизъм, наложи изследването и на показатели извън Наредба 9, но с потенциален ефект върху човешкото здраве.

Така например, сероводородът (H_2S) е липофилна молекула, която свободно преминава през мембранни структури и, подобно на азотния оксид (NO) и въглеродния оксид (CO), има сигнални функции. Освен това, сероводородът е силно реактивоспособна молекула и лесно реагира с активни кислородни и азотни форми като по този начин ги инактивира. Може да се предположи, че приемът на минерални води, съдържащи сероводород и разтворими сулфиди, ще има измерим ефект върху метаболизма, активирайки антиоксидантни процеси и сигнални пътища.

Друг пример е микроелементът калий, който има роля в регулирането на вътреклетъчното и извънклетъчното налягане, алкално-киселинния баланс на кръвта, участва в работата на нервната система, стимулира активността на ензимите, бъбречната функция, въглехидратната и белтъчната обмяна.

Ето защо, в допълнение на показателите по Наредба №9 и Наредба №14, бяха изследвани също и **съдържанието на разтворени сулфиди и свободен сероводород, калий, амоняк, обща и съставна алкалност, общ сух остатък** в минералната вода. Резултатите са представени на Таблица 10.

Таблица 10. Резултати от анализ на целеви физико-химични параметри на минерална вода от Естрейя, Аквариума и Дом Младост извън Наредба №9 и Наредба №14.

Обект	Естрейя	Аквариума	Дом Младост	Условия на изследването
Амоняк [mg/L]	0,24 ± 0,03	0,38 ± 0,04	0,94 ± 0,10	(21±3)°C
Калий [mg/L]	<5	7,0 ± 0,8	7,8 ± 0,9	(21 ± 3)°C
Обща и съставна алкалност [mmol H ⁺ /L]	4,6 ± 0,2	4,2 ± 0,2	4,2 ± 0,2	(21 ± 3)°C
Общ сух остатък[mg/L]	400 ± 19	445 ± 21	377 ± 18	(105 ± 1)°C
Разтворени сулфиди и свободен сероводород [mg/L]	1,2 ± 0,1	1,7 ± 0,1	2,8 ± 0,3	(21 ± 3)°C

Резултатите са представени като стойност и неопределеност ±U; „< ...“ – под границата на количествено определяне на метода.

В резултат от извършените *целеви анализи* са получени **нови данни за химичния състав** на минерална вода от Варненски басейн по показателите, оценяващи съдържанието на биологично активни съставки и имащи отношение към здравето на човека.

2.5. Резултати от мониторинг на минерална вода

С цел да се проследят в динамика промените във физико-химичния състав на минералната вода, избрани показатели са изследвани през първия ден от вземане на пробата, след едно денонощие, след 3 и след 7 денонощия (лагеруване на водата), при стайна температура. Резултатите са представени в Таблица 11.

Проследени са в динамика промените във физико-химичния състав на минералната вода през първия ден от вземане на пробата, след едно денонощие, 3 денонощия и 7 денонощия (лагеруване на водата), при стайна температура. Съществена промяна в физикохимичния състав на минералната вода при лагеруване не бе наблюдавана, следователно не се очакваха промени и в ефектите ѝ при пиене след престой на водата до 7 дни, което е обичайният краен срок на съхранение на минерална вода, налята от водоизточника за лечебно-питейни нужди. Единствените установени значими промени бяха в рН, което с времето на престой на водата нарастна от 7.6 до 8.2. Отчетено бе понижение на разтворените сулфиди и сероводород след

първия ден от 1.7 mg/L до 0.040 mg/L, както и на амонияк от 0.38 до 0.085, което бе съпроводено с отслабване на мириса на водата, който от бал 2 намалява на бал 1 също след първия ден.

Таблица 11. Резултати от изследване на избрани физико-химичния параметри в динамика (първи ден, след едно денонощие, след 3 денонощия, след 7 денонощия) на проба от обществена чешма до Аквариума.

Показател/единици	Първи ден	След 24 часа	След 3 дни	След 7 дни
Цвят [градус]	0	0	0	0
Мирис [бал]	2	1	0	0
Мътност [FNU]	<0,05	0,15±0,03	0,17±0,03	0,26±0,05
Активна реакция [pH]	7,6±0,1	7,9±0,1	7,9±0,1	8,2±0,1
Амониев йон [mg/L]	0,29±0,03	0,26±0,03	0,24±0,02	0,22±0,02
Амонияк [mg/L]	0,38±0,04	0,085±0,009	<0,05	<0,05
Нитрити [mg/L]	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Електропроводимост [µS/cm]	768±34	764±34	765±34	762±34
Обща и съставна алкалност [mmol H+/L]	4,2±0,2	4,3±0,2	4,1±0,2	4,0±0,2
Разтворени сулфиди и свободен сероводород [mg/L]	1,7±0,2	0,040±0,004	<0,02	<0,02

Резултатите са представени като стойност и неопределеност ±U; „< ...“ – под границата на количествено определяне на метода. Всички стойности са в рамките в на максималните допустими концентрации по нормативен документ, Наредба 9/16.03.2001.

2.6. Допълнителни данни

На основание чл.28, ал. 2 от Закона за достъп до обществена информация и Заявление с вх. №9074/28.05.2017 г. до управителя на РЗИ, бе предоставена писмена справка, касаеща наличните резултати от микробиологични и химични анализи от мониторинга на изследваните три обекта с обществено предназначение: местна минерална чешма до дом „Младост“, захранвана от сондаж Р-106х, местна минерална чешма под Аквариума, захранвана от сондаж Р-1х и Балнеология при Хотел „Естрея Резиденс“, кк „Св. св. Константин и Елена“ („МДУ Ж.Кюри“ захранвана от сондаж Р-6х), за период от пет години – от 2012 г. до 2017 г.. Резултатите от микробиологичните анализи обхващат седем показателя и са представени в Таблица 12.

Таблица 12. Резултати от микробиологични изследвания в минерални води през периода от 2012 г. до 2013 г., получени по Закон за достъп до обществена информация от РЗИ – Варна.

Общ брой колонии на жизнеспособни микроорганизми при 20 до 22°C за 72 ч.	<1КОЕ/см ³
Общ брой колонии на жизнеспособни микроорганизми при 37°C за 24 ч.	<1КОЕ/см ³
Колиформи при 37 и 44.5°C	0/250 см ³
Ешерихия коли при 37 и 44.5°C	0/250 см ³
Фекални стрептококи (ентерококи)	0/250 см ³
Спорообразуващи сулфитредуциращи анаеробни бактерии	0/50 см ³
Псевдомонас аеругеноза	0/250 см ³

Легенда: КОЕ – колонообразуващи единици

Резултатите от мониторинга на химични анализи обхващат 14 показателя: арсен, кадмий, никел, олово, антимон, селен, нитрати, флуорид, амоний, мед, манган, окисляемост, цинк, нитрити и са представени в Таблица 13.

Таблица 13. Резултати от химични анализи в минерални води, получени по Закон за достъп до обществена информация от РЗИ – Варна.

Пункт	Дата	Арсен	Кадмий	Хром	Никел	Олово	Антимон	Селен	Нитрат
Норма		0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.01	0.01	45
ДМ	21.03.12	<0,001	<0,0005	<0,005	<0,003	<0,001	<0,001	<0,001	<2,2
ДМ	15.06.12	<0,001	<0,0005	<0,005	<0,003	<0,001	<0,001	<0,001	<2,2
ДМ	19.09.12	<0,001	<0,0005	<0,005	<0,003	<0,001	<0,001	<0,001	<2,2
ДМ	28.11.12	<0,001	<0,0005	<0,005	<0,003	<0,001	<0,001	<0,001	<2,2
А	28.11.12	<0,001	<0,0005	<0,005	<0,003	<0,001	<0,001	<0,001	<2,2
ДМ	29.03.13	<0,001	<0,0005	<0,005	<0,003	<0,001	<0,001	<0,001	<2,2
А	29.03.13	<0,001	<0,0005	<0,005	<0,003	<0,001	<0,001	<0,001	<2,2
Пункт	Дата	Флуорид	Амоний	Мед	Манган	Окисляемост	Цинк	Нитрит	
Норма		5	0.02*	0.2	1.0	3	5	0.005	
ДМ	21.03.12	0,56	0,2	<0,02	<0,001	1,8	0,03	0	
ДМ	15.06.12	0,49	0,21	<0,02	<0,001	1,6	0,03	0	
ДМ	19.09.12	0,46	0,14	<0,02	<0,001	1,8	0,03	0	
ДМ	28.11.12	0,48	0,21	<0,02	<0,001	1,8	0,03	0	
А	28.11.12	0,41	0,19	<0,02	<0,001	2,2	0,03	0	
ДМ	29.03.13	0,58	0,2	<0,02	<0,001	1,4	0,03	0	

Легенда: ДМ – Дом Младост; А-Аквариум. Резултатите са представени в mg/L. Посочените норми са съгласно Наредба №14 за курортните ресурси, курортните местности и курортите. Нормата за амониеви йони е 0.02 mg/L, освен когато произходът му е свързан с минералните води.

2.7. Дискусия на резултатите от физико-химичния анализ на минерална вода от Североизточен Черноморски басейнов район

Минерализацията на водата е един от показателите, който определя дали една вода може да се консумира неограничено. Слабоминерализираните води могат да се пият непрекъснато, без ограничение, освен ако не съдържат във висока концентрация специфичен

елемент, какъвто е например флуоридът (Петрова и Костадинов, 2008). Всички тествани показатели в минералните води от Варненския басейн отговарят на нормативните изискванията на българското и европейско законодателство за минерални води (Директива 2009/54 / ЕО; Наредба № 14 за курортните ресурси, курортните местности и курортите, обнародвана на 10 август, 2004 г.). В наредбата за бутилиране на минерални води („Наредба за изискванията към бутилираните натурални минерални, изворни и трапезни води, предназначени за питейни цели“, в сила от 03.08.2004 г. Приета с ПМС № 178 от 23.07.2004 г.) е пояснено, че натурална минерална вода с минерализация под 50 mg/L се класифицира като вода с много ниска минерализация; ако съдържанието на разтворените в нея соли е до 500 mg/L – с ниска минерализация; над 1500 mg/L – с висока минерализация. Наредбата за качеството на водата, предназначена за питейно-битови цели (Наредба №9 от 16 март 2001 г. за качеството на водата, предназначена за питейно-битови цели), не поставя лимит за общата минерализация, но лимитира друг показател, който е пряко свързан с нея – електропроводимостта. Стойността на този показател за питейно-битови цели не трябва да надвишава 2000 $\mu\text{S}/\text{cm}$. За минералните води от Варненски басейн електропроводимостта бе както следва: Естрея - $677\pm 30 \mu\text{S}/\text{cm}$; Аквариум - $768\pm 34 \mu\text{S}/\text{cm}$; Дом Младост - $743\pm 33 \mu\text{S}/\text{cm}$. Според класификацията на водите по показателя електропроводимост (Таблица 3) изследваните минералните води са с ниско съдържание на минерали, което е в съгласие с резултатите в издадените балнеологични оценки за водите на два от сондажите (Регистър на издадените от МЗ балнеологични оценки за минерални води).

Физични характеристики

Температура

В зависимост от температурата на излива минералните води се класифицират като: студени ($<20^{\circ}\text{C}$), хипотермални ($20^{\circ} - 33^{\circ}\text{C}$), хомотермални ($34^{\circ} - 36^{\circ}\text{C}$), термални ($37^{\circ}-39^{\circ}\text{C}$), хипертермални ($>40^{\circ}\text{C}$) (Караколев, 1990; Albertini et al., 2007). Съгласно тази класификация изследваните минерални води на гр. Варна са термални (Естрея - 37°C и Аквариум – 37.5°C) и хипертермални (Дом Младост - 45°C).

Активна реакция рН

рН на минералната вода се обуславя от минералния състав на земната кора, от наличието на въглероден диоксид и от специфичността на скалите, формиращи подземните резервоари и пътя на водата преди извирането ѝ на повърхността. Наличието на карбонатни йони е индикация за алкална вода. Те взаимодействат с водните йони, отделяйки хидроксилни йони, които повишават рН. Стойностите на рН на всички проби са в препоръчителни граници

(6.5 - 9.5). Няма статистическа разлика за този показател в минералните води от трите водоизточника ($p > 0.05$). Най-висока рН стойност има минералната вода от обществена чешма под Аквариума (7.6 ± 0.1), следвана от минералната вода на Естрея (7.5 ± 0.1). Съгласно получените резултати изследваните минерални води се класифицират като слабо алкални. Повече от 50% от българските минерални води са алкални - $pH > 8$ (Владева и Бошев, 2011). Минералната вода с най-високо рН от обществена чешма под Аквариума е избрана за изследване на избрани показатели в динамика.

Електропроводимост и обща твърдост

Електропроводимостта и общата твърдост са индикатори за минерализацията на водите или за концентрацията на минералните соли, които съдържат. Твърдостта на водата се определя от разтворените в нея поливалентни метални йони предимно калциеви и магнезиеви, но също алуминиеви, бариеви, железни, магнезиеви, цинкови и др. Изследваните от нас минерални води са с електропроводимост под максимално допустимата граница ($2000 \mu S/cm$), съгласно Наредба 9 за качеството на водите за питейно-битови цели. Най-висока електропроводимост бе отчетена в пробата от източник при Аквариума ($768 \pm 34 \mu S/cm$). Резултатите на трите водоизточника бяха под $800 \mu S/cm$. Счита се, че минерални води с електропроводимост от $800 \mu S/cm$ до $850 \mu S/cm$ са с ниско съдържание на минерални соли. Нашите резултати са в потвърждение на данните от литературата (Владева и Костадинов, 2007; Караколев, 1996) и издадените балнеологични оценки за сондаж Р-6х (Естрея) и Р-106х (Дом Младост), според които минералните води от Варненски басейн са слабоминерализирани с обща минерализация - Естрея $565 mg/L$; Дом Младост – $568 mg/L$.

Твърдостта показва наличието на алкалоземни метали. Твърдостта на водата се формира в резултат на отмиване от подземните пластовете на калций и магнезий. Разтварянето на варовици и креда е причина за калциевата твърдост, а в райони с повече доломит може да преобладава магнезиевата твърдост. Високата твърдост влошава органолептичните характеристики на водата и има негативно влияние върху храносмилателната и отделителната система. Именно твърдостта предизвиква образуването на накип в домакинските уреди, използващи вода. Общата твърдост в питейната вода не трябва да бъде по-висока от $12 mg eq/L$. По този показател водите се класифицират като много меки ($\leq 1.4 mg eq/L$), меки ($1.8-2.8 mg eq/L$), средно твърди ($3,2-4,2 mg eq/L$), твърди ($4,6 - 6,4 mg eq/L$), много твърди ($6.8-9.0 mg eq/L$), изключително твърди ($> 11 mg eq/L$) (Albertini et al. , 2007). Средната твърдост на изследваните от нас проби ($4.13 mg eq/L$) бе под максимално допустимата стойност ($12 mg eq/L$), което класифицира минералните води към групата със средна твърдост. Питейната вода във Варна от водопроводната мрежа е сред най-твърдите у нас. Според специалистите тя

не трябва да се консумира постоянно от хора с бъбречни заболявания. В този смисъл натуралната минерална вода със слаба минерализация, каквато е Варненската, би била добра алтернатива в превенцията на тези заболявания.

Химични характеристики. Йонен състав

Аниони

Количествата на изследваните аниони: нитрати (NO_3^-), нитрити (NO_2^-), сулфати (SO_4^{2-}), фосфати (PO_4^{3-}), хлориди (Cl^-), флуориди (F^-) са под максимално допустимите стойности. Три от тях (SO_4^{2-} , Cl^- и F^-) са с най-висока концентрация: сулфати, хлориди (Естрея - 77 mg/L; Аквариума - 104 mg/L; Дом Младост - 100 mg/L) и флуориди (Естрея - 0.50 mg/L; Аквариума - 0.71 mg/L; Дом Младост - 0.62 mg/L). Най-високи концентрации на преобладаващите аниони са установени в пробата от Аквариума (77 ± 7 mg/L, 104 ± 5 mg/L и 0.71 ± 0.09 mg/L, респективно за SO_4^{2-} , Cl^- , F^-).

Почти всички природни води съдържат **хлоридни йони**. Те са лесно разтворими и широко разпространени във водата поради най-разпространената сол на Земята – натриевият хлорид. Те не образуват неразтворими соли с макрокомпонентите на природните води и не се извличат от състава на водите от природни адсорбенти. Те са преобладаващ анион във води с минерализация над 5 g/L. Пределно допустимата концентрация на хлориди във води за питейно-битови нужди според Наредба №9/16.01.2001 е 250 mg/L, а бутилираните минерални води със съдържание на хлориди над 200 mg/L трябва да съдържат тази информация на етикета си, съгласно Наредба за бутилиране на води. Хлорният йон е широко разпространен електролит и главен анион на извънклетъчните течности и кръвта, съществен за солнокиселата стомашна секреция. Приемането на хлориди се препоръчва при загуба на соли от човешкия организъм. Съдържанието му в изследваните минерални води е най-високо във водоизточника при Аквариума, където е 104 mg/L (Естрея - 77 mg/L; Дом Младост 100 - mg/L).

Сярата влиза в състава на аминокиселини и най-разпространените протеини в човешкото тяло - колаген и кератин. Тя е част от глюкозаминогликаните, поддържащи тургора на кожата, стави и хрущяли; сулфогалактозилцереброзидите, изграждащи миелиновите обвивки на мозъка; биологично активни молекули като 3-фосфоаденозин-5-сулфофосфат (PAPS), сулфатиращ агент със значение при елиминиране на ксенобиотици, биосинтеза на катехоламини и комплексни липиди; участва във функционални групи (тиолови групи) на ензими и коензими с ключова роля в метаболизма и окислително-редукционните процеси в

клетката. Пределно допустимата концентрация на сулфати във води за питейно-битови нужди е 250 mg/L. Завишената концентрация на сулфати във водата влошава нейните органолептични характеристики и оказва физиологично въздействие върху човешкия организъм – има слабително действие. Пиенето на сулфатни минерални води, съдържащи магнезиев бикарбонат, е много популярно в европейските спа-центрове. Прилага се за лечение на чернодробни и гастроинтестинални заболявания. Под форма на инхалации се лекуват хронични заболявания на горните и долните дихателни пътища (Altman, 2000).

Източник на **сулфатите** е процесът на химично изветряне и разтваряне на сярата съдържащи минерали, основно гипс, на скалите, а също и окислението на сулфидите и сярата. Сулфатите участват в кръговрата на сярата. В отсъствие на кислород в земните недра и под действието на сулфатредуциращи бактерии те се трансформират до сероводород и сулфиди, които при появата на кислород в природните води отново се окисляват до сулфати. Растенията и бактериите извличат разтворените във водата сулфати за изграждане на белтъчни вещества. След отмиране на живите клетки в процеса на разлагане сярата се отделя във вид на сероводород, който лесно се окислява до сулфати в присъствието на кислород. Сулфатите отсъстват в минерални води с висока минерализация. Количеството им във водата се лимитира от количеството на калция, с който образуват малко разтворима сол - калциев сулфат (гипс). Сулфатите, заедно с хидрогенкарбонатите, са доминиращ анион в българските натурални минерални води от Хисаря, Велинград, Горна Баня, Банкя и др., като в ~ 85% от бутилираните минерални води концентрацията на сулфати е под 100 mg/L (Кънева и сътв., 2012.). Сулфатите стимулират функциите на жлъчния мехур и улесняват храносмилането. Те дразнят леко лигавицата на стомашно-чревния тракт и имат умерено изразено слабително действие. Действат добре при наличие на магнезиеви йони (Владева и Костадинов, 2007). Сулфатните йони са сред преобладаващите аниони и във Варненската минерална вода. Анализът на резултатите от трите водоизточника показва, че минералната вода от обществена чешма под Аквариума е с най-високи стойности по този показател (77 ± 7 mg/L), следвана от Естрея (54 ± 5 mg/L) и Дом Младост (50 ± 7 mg/L). Тези резултати са идентични с резултатите на Караколев, 1990; Владева и Костадинов, 1996 и съизмерими с концентрацията на сулфатите в бутилирани минерални води – „Банкя“ (107.20 mg/L), „Хисаря“ (28.39 mg/L), „Велинград“ (24.48 mg/L). Във Варненските минерални води установихме наличие и на магнезиеви йони. Очакван е положителен ефект върху лигавицата на стомашно-чревния тракт.

По данни от литературния обзор съдържанието на **флуорни йони** в минералните води от Варненски басейн е в концентрации, позволяващи използването им за профилактика на

зъбния кариес, без ограничение от всички възрасти (Караколев, 1990, Владева и Костадинов, 1996). Анализът на резултатите от трите водоизточника показва, че минералната вода от обществена чешма под Аквариума е с най-високи стойности по този показател (0.71 ± 0.09 mg/L), следвана от Дом Младост (0.62 ± 0.08 mg/L) и Естрея (0.50 ± 0.07 mg/L). Тези резултати са идентични с резултатите на цитираните автори и балнеологичните оценки №74/19.10.2017 г. за минералната вода от сондаж Р-6х (хотел „Естрея Резиденс“), и №117/15.03.2019 г. за минералната вода от сондаж Р-106х („Дом Младост“), издадени съгласно Наредба № 2 от 29 януари 2016 г. за условията и реда за сертифициране на "балнеолечебен (медикъл спа) център", "спа център", "уелнес център" и "таласотерапевтичен център". Тези резултати показват също, че физико-химичният състав на Варненската минерална вода е стабилен. Съдържанието на флуорид е един от показателите, който трябва да се има предвид при подбор на минералната вода за ежедневна употреба. Съгласно действащото законодателство - Наредба за изискванията към бутилираните натурални минерални, изворни и трапезни води, предназначени за питейни цели, хармонизирана с Директива 2009/54/ЕО относно експлоатацията и предлагането на пазара на натурални минерални води, се допуска бутилиране на натурални минерални води със съдържание на флуорид до 5 mg/L. Наредбата изисква в случаите, когато натуралната минерална вода е със съдържание на флуорид над 1,5 mg/L, на етикета да се поставя текст, че водата не е подходяща за всекидневна употреба от кърмачета и деца под 7-годишна възраст. Надписът трябва да се поставя в непосредствена близост до търговското наименование (търговската марка) на продукта и трябва да е ясно различим. В Националната програма за профилактика на оралните заболявания при деца от 0 до 18 годишна възраст в Република България 2015-2020 г. има данни от анализ на пуснатите на пазара национални минерални води. Според тях в 11 съдържанието на флуорид е над 1,5 mg/L. От тях 9 са със съдържание на флуорид в диапазон от 3 до 5 mg/L и 2 в диапазон от 1,5 до 3 mg/L. Според авторите почти 1/2 от всички бутилирани български минерални води са със съдържание на флуорид над 1,5 mg/L., докато във Варненската минерална вода съдържанието на флуорид е под 1 mg/L и те могат да бъдат приемани без ограничение от всички възрасти и имат потенциал за бутилиране. Пример за бутилирана минералната вода от Североизточна България е "Извор". Тя се добива в гр. Каварна и е от същия водоносен хоризонт – малмоваланжския.

Според доклад на Европейската агенция по безопасност на храните (The EFSA Journal, 2005) съдържанието на флуор не се контролира физиологично от биологичните системи в човешкия организъм, а флуоридът присъства в храни, води, дентални продукти за устна хигиена и като добавка в готварска сол в Австрия, Белгия, Чехия, Франция, Германия,

Испания, Швейцария и България. Според Европейската агенция по безопасност на храните консумирането на води, съдържащи флуорни йони в концентрации над 2.0-3.0 mg/L, може да превиши допустимата дневна доза 5.0 mg/L, каквато е за бутилирани минерални води, и да стане причина за проява на токсичността на флуорида. Симптоми за хронично отравяне са виене на свят, гадене, главоболие, декалцифициране на костите и др. Съществуват данни за канцерогенност вследствие хроничното излагане на повишени концентрации на флуориди (Maurer *et al.*, 1990; Maurer *et al.*, 1993).

Катиони

Сред катионите доминират йоните на натрия (Na^+), калция (Ca^{2+}) и магнезия (Mg^{2+}). Трите елемента са сред макроминералите с важна функция в човешкия организъм.

Най-висока концентрация на Na^+ е установена в минералната вода от обществената чешма до Дом Младост (69 ± 8 mg/L). **Натрият** е широко разпространен в минералните води. Той не образува неразтворими соли с хидрогенкарбонатите, карбонатите, сулфатите и хлоридите. В зависимост от това дали е под формата на натриев хлорид или натриев хидрогенкарбонат, може да доведе или не до повишаване на кръвното налягане (Владева и Костадинов, 2007). Когато концентрацията на натрий в минералната вода е под 20 mg/L, тя е подходяща за бедна на натрий диета и това се указва на етикета на бутилираните минерални води (Наредба за изискванията към бутилираните натурални минерални, изворни и трапезни води, предназначени за питейни цели).

Концентрациите на **магнезиевите** и **калциевите** йони са почти идентични и в трите изследвани проби. **Калцият** е доминиращ катион в слабо минерализираните води. С увеличаване на минерализацията дялът му намалява, тъй като калциевият карбонат и калциевият сулфат имат малка разтворимост (Беленький и колектив, 1982). Препоръчителният дневен прием на калций зависи от възрастта, при възрастни е 1000 mg/ден (НАРЕДБА № 1 на МЗ от 22 януари 2018 г. за физиологичните норми за хранене на населението). Нормата за съдържание на калций във води е 150 mg/L. В изследване на йонния състав на бутилираните минерални води в България е установено, че в ~ 65% от тях съдържанието на калций е под 50 mg/L (Кънева и съавтори, 2011). При възрастни нормата е 300 mg/ден за жени и 350 mg/ден за мъже. Калцият и магнезият изграждат костната тъкан. Калцият участва в мускулното съкращение, кръвосъсирването, изпълнява ролята на вторичен посредник в клетъчната сигнализация. В изследваните минерални води на гр. Варна съдържанието на калций е почти идентично (Естрея – 44 ± 1 mg/L; Аквариум – 43 ± 1 mg/L; Дом Младост - 42 ± 1 mg/L) и

многократно по-високо в сравнение с повечето български бутилирани минерални води („Горна Баня“ – 1.40 mg/L ; „Банкя“ – 8.29 mg/L ; „Девин“ – 1 mg/L ; „Хисаря“ – 3.01 mg/L).

Магнезият рядко е доминиращ йон във водите независимо, че е разпространен в природата и разтворимостта на сулфата и карбоната му са по-големи от тази на калциевия сулфат и карбонат. Причината за това е, че магнезият се включва в кристални решетки на вторични силикати и доломити, като се отделя от водата (Беленький и колектив, 1982). Катионите на магнезия активират над 300 ензими, сред които са ензимите, свързани с преноса на фосфатни групи - синтез и разграждане на АТФ и ключови ензими от метаболизма в клетката. Особено важна е ролята на магнезия в състава на АТФ-азата, доставяща енергия за работата на K^+/Na^+ -помпа и Ca^{2+} - помпа, както и в превръщането на витамини, като например В6, в активни коензими. При концентрация на сулфати над 60 mg/L (Аквариума) и особено в присъствие на магнезиеви йони, минералните води леко дразнят лигавицата на стомашно-чревния тракт, повишават неговата кинетика и предизвикват умерено изразено слабително действие. Магнезиевите и калциевите йони принадлежат към минералните, които могат да се набавят с храната и водата. Дневните необходими дози от магнезий са 300-350 mg при възрастни (НАРЕДБА № 1 на МЗ от 22 януари 2018 г. за физиологичните норми за хранене на населението). Количеството на йоните на тези елементи в повечето български минерални води е ограничено, защото те са слабо минерализирани. Ако е необходимо с приеманата вода да се покрива дефицит в организма, то съдържанието на магнезиеви йони трябва да е над 50 mg/L, а на калциевы йони над 100-150 mg/L. Макар и в по-ниски концентрации в изследваните проби минерална вода, макро минералите са напълно йонизирани, предполага се че се усвояват полесно и действат по-добре в сравнение с хранителните и лекарствени добавки, които ги съдържат и могат да причинят камъни в бъбреците. Според наредбата за качеството на питейните води (Наредба №9) магнезият не трябва да надвишава 80 mg/L и ако неговото съдържание в минералната вода е над 50 mg/L, това се отбелязва с надпис на видно място в етикета. За сравнение, в една от най-известните българска минерална вода с висока минерализация 2914 mg/L „Михалково“ – син етикет, концентрацията на магнезиеви йони е 48.5 mg/L, а в световно известната италианска натурална минерална вода S.Pellegrino тя е 52 mg/L (Кънева и съавтори, 2011). Във водата от Варненски минерален басейн концентрацията на магнезиеви йони в два от водоизточниците е 27 ± 1 mg/L, а при Дом Младост е 24 ± 1 mg/L. Тези резултати са в съответствие с по-рано публикуваните резултати (Владева и Костадинов, 1996; 2007) и в съответствие с издадената балнеологична оценка на сондаж № Р-6х (Естрея).

Концентрациите на йоните на **общото желязо и фери йоните** (Fe^{3+}) са най-високи в пробата на Естрея (70 ± 8 μ g/L и 44 ± 5 μ g/L, респективно) и най-ниски в пробата от Дом

Младост ($37 \pm 4 \mu\text{g/L}$ и $17 \pm 2 \mu\text{g/L}$). Нашите резултати са идентични с данните от други проучвания на съдържанието на микроелементи в българските минерални води (Владева и Костадинов, 1996), както и с данните, докладвани от българското Министерство на здравеопазването (<https://www.mh.government.bg/bg/administrativni-uslugi/registri>).

Нитратите, нитритите и амониевите йони са нежелани компоненти на питейните води, тъй като оказват вредно влияние върху човешкото здраве. Така например, нитратите причинят метхемоглобиноемия и кръвта губи способността си да пренася кислород до клетките. Концентрацията на амониевите йони (NH_4^+) е в границата на максимално допустимите концентрации за питейни води ($0,50 \text{ mg/L}$). Най-високи стойности са отчетени в пробата от Аквариума ($0.29 \pm 0.003 \text{ mg/L}$). Източник на амониевы йони в природните води е газът амоняк (NH_3). Той се образува от биохимичния разпад на азотсъдържащите органични съединения или в резултат на промишленото производство. Концентрацията на амониевы йони във водите обичайно не достига опасни за здравето на човека нива, но те могат да взаимодействат с други съединения и да образуват токсични вещества. Нивата на неорганичните съединения на азота (нитрити и нитрати) в изследваните проби бяха под границата на количествено определяне на метода. Тъй като количеството им е под максималното, може да се предположи, че амониевите йони са с геоложки произход (Владева и Костадинов, 1996).

Целеви анализи

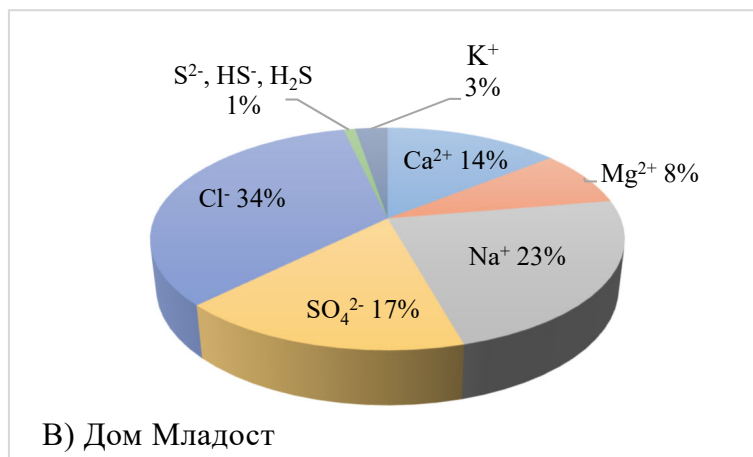
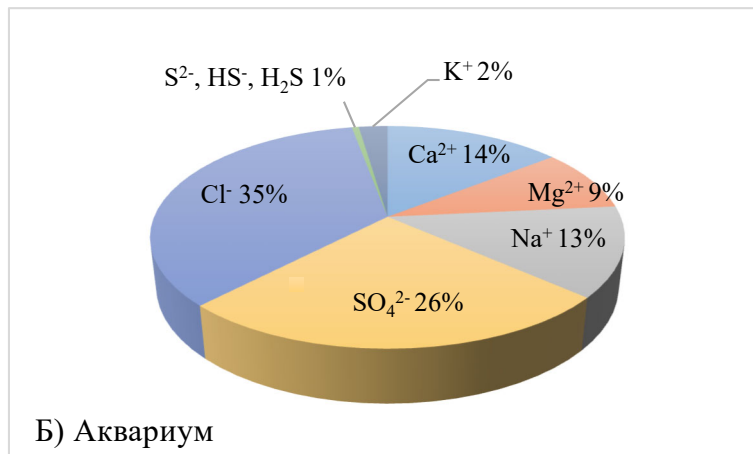
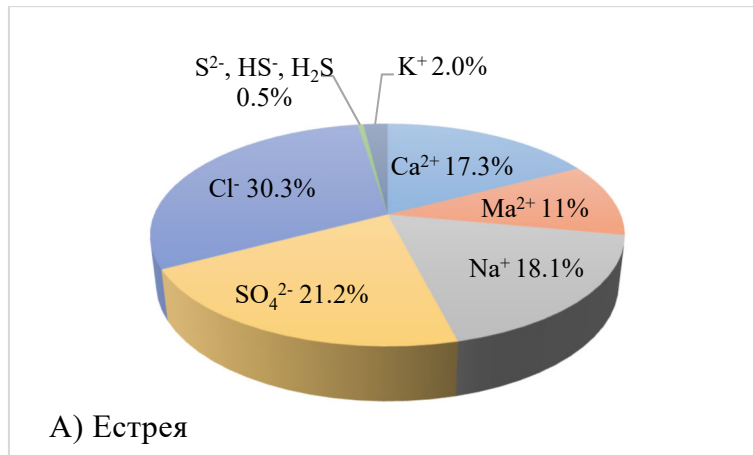
Сярата е типичен доминиращ елемент сред изследваните целеви микроелементи в минерални води на Варна. Във водна среда сярата е под формата на разтворими сулфиди (S), хидросулфиди (SH^-) и сероводород (H_2S). Най-високи концентрации на разтворими сулфиди и свободен сероводород бяха установени в пробите от Дом Младост ($2,8 \text{ mg/L}$) спрямо $1,2 \text{ mg/L}$ в Естрея и $1,7 \text{ mg/L}$ в пробите от Аквариума.

H_2S е слаба киселина и при ниско рН е в протонирана форма, докато при алкално рН сероводородът се депротонира, образувайки хидросулфиден анион (HS^-). Въпреки че е газ, около една трета от H_2S остава в протонирано състояние във воден разтвор при рН 7.4, дори и при съхранение на водата в бутилки. H_2S е липофилна молекула и преминава свободно през клетъчните мембрани и, подобно на азотния оксид (NO) и въглеродения оксид (CO), има сигнални функции в човешкото тяло. H_2S е силно реактивна молекула, реагирайки с активни кислородни и азотни форми, ги обезврежда. Може да се предположи, че приемът на минерални води, съдържащи сероводород и разтворими сулфиди, ще има измерим ефект върху

метаболизма, активирайки антиоксидантни процеси и сигнални пътища (Carbajo and Maraver, 2017).

В сравнение с останалите йони концентрациите на йоните на **калия, хрома и селена** (K^+ , Cr^{6+} , Se^+) са много по-ниски, като концентрациите на K^+ са най-високи в пробите от Дом Младост (7.8 ± 0.9 mg/L) и по-ниски в Естрей (<5 mg/L). Съдържанието на Cr^{6+} и Se^+ бе изключително ниско във всички проби и бе под долната граница за количественото определяне на метода. Като цяло, калият се съдържа в много по-малки количества в природните води, тъй като се извлича от растителни и животински организми и лесно и се натрупва в кристалните решетки на глинестите минерали. Калият, заедно с натрия и хлора регулират вътреклетъчното и екстрацелуларното осмотично налягане, водния и електролитен баланс. Докато натриевите йони са извън клетката, калиевите катиони са основните катиони вътре в клетката (150 mmol/L). Концентрацията на калиевите йони в кръвта е строго регулирана (3.5-5.5 mmol/L), поради риск от тежка сърдечна асистолия, наблюдавана при хиперкалиемия. Калият регулира функционирането на нервната система и бъбреците, стимулира ензимната активност, играе роля във въглехидратния и протеиновия метаболизъм. Приемът на калий чрез разнообразна диета, съдържаща плодове и зеленчуци, съчетана с рестрикция в приема на сол, намалява кръвното налягане и риска от инфаркт и инсулт при хипертоници (Weaver, 2013). Минералните води с ниско съдържание на Na^+ (<20 mg/L) и повишено на K^+ спомагат за засилване на диурезата и ускорено освобождаване на Na^+ . Средният хранителен дневен прием на калий при възрастни е $\sim 3-4$ g и приемът обикновено не надвишава 5-6 g. Поради липсата на достатъчно изследвания EFSA не определя пределно допустима дневна доза за калий. В зависимост от възрастта и пола, се препоръчват различни дози на калий (EFSA, Summary of Tolerable Upper Intake Levels–version 4 (September 2018)). Сред българските бутилирани натурални минерални води с най-висока концентрация на калий е „Михалково“ – 29.73 mg/L, но съдържанието на натрий е над 400 mg/L (Кънева и съавтори, 2011). Други известни марки, като „Горна Баня“, „Хисаря“ и „Банкя“ са със съдържание на калий и натрий, респективно K^+/Na^+ : 0.35 mg/L/29.24 mg/L; 1.57 mg/L/45.74 mg/L; 0.57 mg/L/84.21 mg/L. Сравнителният анализ на резултатите в настоящото изследване с горните данни показва подобие по отношение съдържанието на натрий (Естрей: 46 mg/L; Аквариум 39 mg/L; Дом Младост 69 mg/L), докато концентрацията на калий е в пъти по-висока: 7.8 ± 0.9 mg/L - Дом Младост; 7 ± 0.8 mg/L - Аквариума; под 5 mg/L - Естрей. Приемът на минерална вода от Варненски басейн може да окаже влияние върху кръвното налягане, като го понижи.

Процентните разпределения на изследваните йони в пробите от трите минерални водоизточника са представени на Фигура 9.



Фигура 9. Процентно разпределение на преобладаващите йони в пробите от трите водоизточника на минерална вода.

Мониторинг

Извършеният анализ на десет избрани физико-химични параметъра в проба от обществена чешма под Аквариума в динамика показва слабо повишение в рН (от 7.6 до 8.2), понижение в концентрацията на амоняка (от 0.38 до <0.05 mg/L), както и понижение в нивата на разтворените сулфиди, хидросулфиди и сероводород (от 1.7 до <0.02 mg/L) във водата.

Възможно обяснение за увеличаването на рН на водата след седмия ден е присъствието на хидросулфидни йони (слаба основа), докато свободният сероводород (слаба киселина) е газообразен и се освобождава. Освен това, хидролизата на калциевите и магнезиевите карбонати във водата също допринася за повишаването на рН.

Допълнителни данни

В получената справка относно резултатите от мониторинга на микробиологичните изследвания е указано, че не са установени отклонения от микробиологичните норми и изисквания, съгласно чл. 7, ал. 5 Приложение №5 от Наредба №14 за курортните местности и курортите, ДВ бр. 79/1987 г., изм. ДВ бр.70/2004 г. Микробиологичен мониторинг на минерални води за обществено ползване се извършва сезонно/4 пъти годишно от РЗИ – Варна, съгласно Чл. 12, ал. 2, т. 4 от същата наредба. Анализите са извършени по методите, определени с БДС 17336 - 93 и БДС 17335 - 93. Наредба №14 разглежда и мониторинга на физико-химичния състав на минералните води за обществени цели, като съкратен физико-химичен анализ се прави най-малко веднъж на 2 години, а пълен физико-химичен анализ - най-малко веднъж на 5 години. Всички резултати за минералните води от Варненски басейн са в рамките на установените от законодателството норми. От 2014 г. РЗИ – Варна не изследва химични и микробиологични показатели във водата на местните минерални чешми, съгласно дадените указания на МЗ за планиране на дейности на РЗИ. Ето защо цитираните резултати от извършените физико-химични и микробиологични анализи са за периода 2012-2013 г.

2.8. Заключение

Качеството на водите, включително съдържанието на макро и микроминерали в тях, както и тяхната стабилност по време на съхранение, е от първостепенно значение за потребителите. Минералните води са сред най-чистите води на планетата и през последните години хората ги използват масово за утоляване на ежедневните си питейни нужди. Не само количеството на изпитата вода е важно за човека. Що се касае до приема на минерална вода, от значение е най-вече нейният химичен състав - комбинацията между отделните компоненти, катионите и анионите, които варират в различните видове минерална вода. Минералните води от Варненски басейн се използват като питейно средство от векове. Към днешна дата не се изследва физико-химичният състав на минералните води от чешмите за обществено ползване на територията на гр. Варна. До 2014 г. са извършвани съкратени физикохимични анализи, пълен физико-химичен анализ не е правен. В резултат на настоящото проучване са получени нови данни за химичния състав на минерална вода от Варненски басейн по показателите,

оценяващи съдържанието на биологично активни съставки и имащи отношение към здравето на човека, не включени в Наредби № 9 и 14. Получена е информация относно промените, които настъпват в състава на водата и нейните органолептични характеристики при съхранение. Не са установени отклонения от нормите. Резултатите от настоящото изследване ще допринесат за по-доброто разбиране на ефекта от минералната вода на гр. Варна върху метаболизма на човека и механизмите на неговите лечебни свойства. Нашите резултати допълват данните от минали проучвания (Владева и Константинов, 1996) и показват, че минералните води от Варненски басейн са със сходен физико-химичен състав и с минимални вариации. Трите изследвани сондажа са от един и същ водоносен хоризонт - малмвалажинския, представен в литоложко отношение от варовици, доломитизирани варовици и доломити. Поради голямата дълбочина, от която извират, те нямат контакт с атмосферния въздух, поради което имат по-силно изразени редукиционни свойства и по-активно действащи биологично активни елементи. Те са чисти, не се нуждаят от хлориране, озониране и друг вид пречистване, което окислява биологично активните им микроелементи и намалява физиологичното им действие. Характерно е наличието на сероводород и амоняк, които са естествени, а не антропогенни и се отстраняват при престояване (Караколев, 1990 г.). Поради сходните физикохимични характеристики водите от трите изследвани водоизточника биха имали сходни физиологични ефекти. Взето бе решение за по-нататъшните интервенционни проучвания да се използват като по-достъпни минералните води от обществената чешма под Аквариума и тази до Дом Младост.

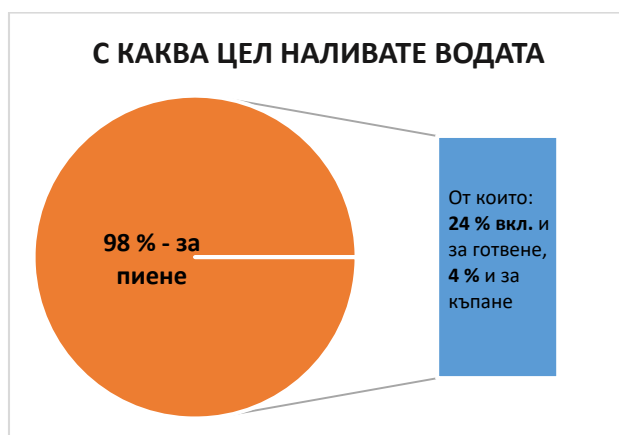
2. Резултати от анонимно анкетно проучване, проведено сред жители на гр.

Варна и резултати от анкетно проучване, проведено сред доброволците в изследването относно режима на наливане – честота, количество и съхранение на минералната вода, и установяващо причините за наливане на минерална вода

Анкетното проучване сред жителите на гр. Варна бе проведено при обществените чешми, в момент на наливане на минерална вода. Анкетираните (50 души) не бяха подходящи по критериите за включване в изследването, тъй като регулярно приемаха минерална вода от достъпните обществени чешми. Проведената анкета имаше за цел да внесе яснота относно режима на наливане на минерална вода - честота, количество и съхранение, причини за наливане на минералната вода, а така също и да внесе яснота относно дневното количество на изпиваната минерална вода. Анкетата бе анонимна. Подобна анкета попълниха 30 от общо 50 доброволци, участници в изследването. Тяхната анкета съдържаеше освен въпросите, свързани с режима на наливане, но също и въпроси, свързани с ефектите, наблюдавани по време на

интервенционния период, чиито отговори са обобщени отделно в подточка 3.1. Резултати от анкетно проучване за ефектите от приема на минерална вода.

Отговорите на 98% от анкетираните жители (49 от 50) показват, че целта им да наливат минерална вода е за да я консумират като ежедневно питейно средство. Дванадесет от тях (24%), използват водата включително за готвене, други двама (4%), включително за къпане. Само един не уточнява причините, поради които налива минерална вода (Фигура 10). Този въпрос не бе включен в анкетата на доброволците в изследването, целта на наливане на минералната вода при тях бе ясна.



Фигура 10. Цел за наливане на минералната вода.

Режимът на наливане на минерална вода, според отговорите на 80 анкетирани (50 жители и 30 доброволци), е показан в Таблица 13.

Преобладаващото количество на налятата вода наведнъж при 47.5 % от общо 80 анкетирани жители и доброволци е 20 л и над 20 л. От тях 13.75 % отговарят, че наливат 50 л и над 50 л наведнъж.

Анкетата съдържаше въпроси, свързани с вида на водата и специфичния мирис на сероводород. На въпроса „При какви условия и кога започвахте да пиете от налятата вода?“, само 10 % отговарят, че започват да пият веднага след наливане; 11.25% - след като водата е изстинала със затворени капачки на бутилките, 52.5% - след като водата е престояла едно денонощие в стаята с отворени капачки на бутилките, 25% - след като е престояла едно денонощие с отворени капачки навън на терасата.

Потребителите знаят какъв е видът на минералната вода - 88.75 % от тях посочват, че водата съдържа съединения на сярата, но не знаят за промените, които настъпват във физикохимичния ѝ състав при съхранение.

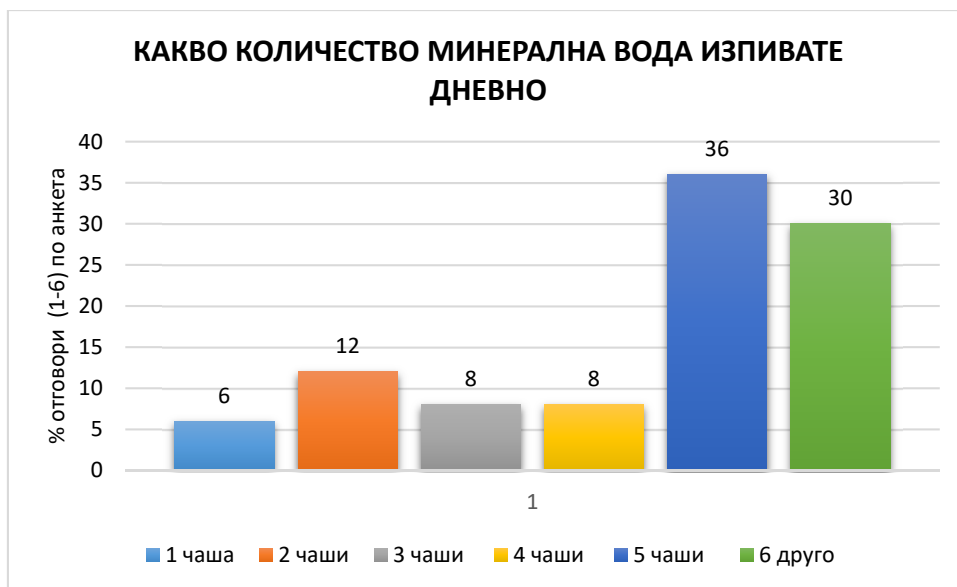
Таблица 13. Отговори на въпроси, свързани с режима на наливане на минерална вода – честота, количество, съхранение и прием на минералната вода, еднакви, както за жителите на гр. Варна, регулярно консумиращи минерална от обществените чешми и поради тази причина неподходящи за включване в изследването, така и за доброволците, включени в изследването.

Въпроси и отговори по анкета	Отговори жители	Отговори доброволци	Общ брой	%
<i>1. Колко често наливате/наливахте минерална вода?</i>				
• Един път на две седмици	18	9	27	33.75
• Един път седмично	13	15	28	35
• Един път на 3-4 дни	13	3	16	20
• Не мога да преценя	3	2	5	6.25
• Друго (моля, посочете)	3 - всеки ден	1 - през ден	4	5
Общо отговори/%	50	30	80	100
<i>2. Какво е приблизителното количество минерална вода, което наливате/наливахте наведнъж?</i>				
• 1,5 л	2	1	3	3.75
• 3 л	4	0	4	5
• 5 л	8	2	10	12.5
• 10 л	7	13	20	25
• Друго (моля, посочете)	0	0	0	0
○ Над 50 л	5	0	5	6.25
○ 50 л	3	3	6	7.5
○ 40 л	1	2	3	3.75
○ 30 л	1	2	3	3.75
○ 20 л	19	2	21	26.25
○ 12 л	0	3	3	3.75
○ 6 л	0	2	2	2.5
Общо отговори/%	50	30	80	100
<i>3. В какви съдове наливате/наливахте минералната вода?</i>				
• В пластмасови бутилки	45	27	72	90
• В стъклени бутилки	3	3	6	7.5
• В бидони	2	0	2	2.5
• Друго (моля, посочете)	0	0	0	0
Общо отговори/%	50	30	80	100
<i>4. При какви условия съхранявате/съхранявахте налятата минерална вода?</i>				
• В хладилник	9	0	9	11.25
• На студено на терасата	9	7	16	20
• При стайна температура	28	23	51	63.75
• Друго (моля, посочете)	4 - не посочват	0	4	5
Общо отговори/%	50	30	80	100
<i>5. При какви условия и кога започвате/започвахте да пиете от налятата вода?</i>				
• След като е престояла в бутилките с отворени капачки на терасата едно денонощие	7	13	20	25

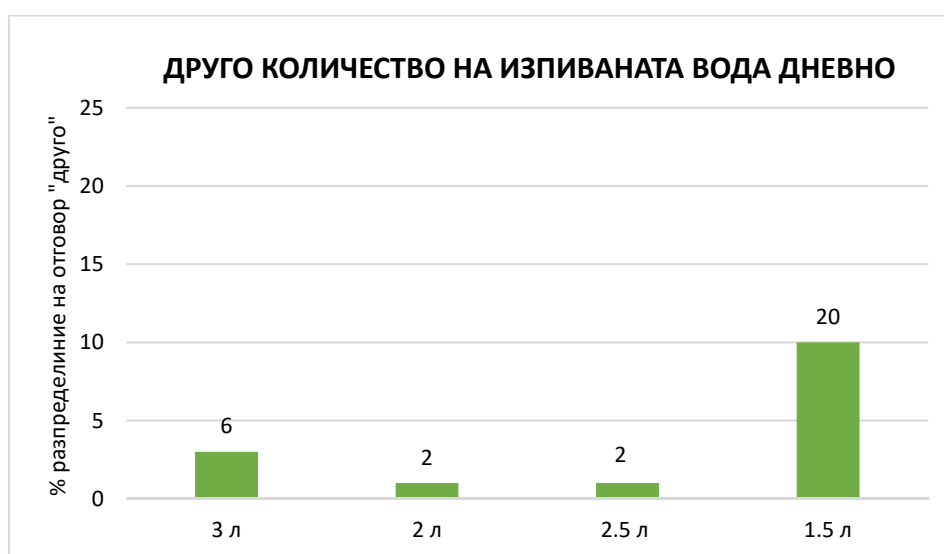
• След като е престояла в бутилките с отворени капачки в стаята за едно денонощие	30	12	42	52.5
• След като е изстинала в бутилките, чиито капачки са затворени	7	2	9	11.25
• Веднага след наливане	5	3	8	10
• Друго (моля, посочете)	1 – не посочва	0	1	1.25
Общо отговори/%	50	30	80	100
<i>6. Знаете ли, че минералната водата се причислява към сярасъдържащите минерални води?</i>				
• Да	45	26	71	88.75
• Не	5	4	9	11.25
Общо отговори/%	50	30	80	100
<i>7. Известни ли са Ви препоръки и/или заболявания, при които се пие такъв вид вода?</i>				
• Да	21	12	33	41.25
• Не	29	18	47	58.75
Общо отговори/%	50	30	80	100
<i>8. Считате ли, че изпитата минерална вода е подобрила общото Ви здравословно състояние?</i>				
• Да	29	6	35	43.75
• Не	1	1	2	2.5
• Не мога да преценя	16	22	38	47.5
• Друго (моля, посочете)	4 – не посочват	1 – не посочва	5	6.25
Общо отговори/%	50	30	80	100

Имаше въпроси зададени само на жителите на гр. Варна, свързани с дневното количество на изпиваната минерална вода и въпроси, уточняващи причините за прием на минералната вода. Те не бяха включени в анкетата на участниците в проучването. Дневното количество на минералната водата на всеки участник бе индивидуално определено по литературни данни.

Количеството на изпиваната вода дневно според отговорите на гражданите на гр. Варна, регулярно консумиращи Варненска минерална вода е отразено на Фигура 11. Петдесет и шест процента от анкетираните са отговорили, че изпиват между 1 л (~5 чаши) и 1.5 л/ден.



Фигура 11. Дневно количество на изпиваната от жители на гр. Варна налята минерална вода; в легендата са отговорите (1-6) по анкета. 30 % от анкетираните (15 души) посочват отговор 6 - „друго“- количество, което е указано във Фигура 12.



Фигура 12. Дневно количество на изпиваната вода по отговорите на 30 % (15 анкетирани), посочили отговор 6 - „друго“.

На въпрос „Пиете ли водата поради здравословни причини?“, 15 души (30%) от 50 анкетирани жители отговарят утвърдително (Фигура 13).



Фигура 13. Отговори на въпрос „Пиете ли водата поради здравословни причини?“. Отговори по анкета 1. „ДА“ (15 души); 2. „НЕ“ (35 души). Здравословните причини за прием на отговорилите с „ДА“ също са показани на фигурата.

Сред здравословните причини, които потребители посочват, преобладават бъбречните заболявания. На следващия въпрос за граждани „Назначаван ли Ви е прием на минерална вода от лекар?“, 3-ма отговарят утвърдително, като двама от тях казват, че в момента изпълнявали такава препоръка, 42 отговарят с „НЕ“, 5 не отговарят.

В таблица 14 са обобщени отговорите на въпроса „Известни ли са Ви препоръки и/или заболявания, при които се използва сярсъдържаща минерална вода?“ на анкетираните граждани при чешмите (50 души) и на доброволците, участващи в проучването (30 души). Отговорите са повече от 80 (101), защото някои от анкетираните са посочвали повече от един отговор.

Таблица 14. Обобщени отговорите на въпроса „Известни ли са Ви препоръки и/или заболявания, при които се използва сярасъдържаща минерална вода?“. Отговорите са снети от общо 80 анкетирани – 50 граждани при чешмите на гр. Варна и 30 доброволци, участващи в проучването.

Приложение на Варненската минералната според анкетираните	Брой	%
Не знае	44	43.56
Бъбречни заболявания	21	20.79
Заболявания на гастроинтестиналния тракт	15	14.85
Заболявания на опорно двигателен апарат	6	5.94
Общо укрепващо средство	4	3.96
Болести на обмяната	4	3.96
Дерматологични заболявания	3	2.97
Заболявания на периферна нервна система	2	1.98
Сърдечно-съдови заболявания, хипотонично средство	2	1.98
Общо отговори	101	100

2.1. Дискусия на резултатите от анкетните проучвания относно режима на наливане - честотата, количество и съхранение на минералната вода, както и на причините за наливане на минерална вода

Хидрирането е от съществена важност за здравето на организма. От гледна точка на източниците за хидриране, безспорно първенството се пада на чистата питейна вода, която не натоварва организма с излишни калории. Основната разлика между водата, доставяна от водопреосната система, и минералната вода е, че в минералната се съдържат минерали в концентрации, които могат да окажат въздействие върху процесите в организма. Минерали се съдържат и в чешмяната вода, те варират според местоизточника. Проучване показва, че хората предпочитат минералната вода, заради нейната природна чистота и положителните ползи за здравето (Eske, 2019). Производството на минерална вода, обаче, се свързва с един от основните проблеми на съвременното - мащабното производство на пластмасови бутилки, имащо сериозни последици за околната среда.

Питейната вода в Европа е с високо качество (Escors SEE, 2015; Roberts, 2018), а в страни като Холандия и Белгия се счита, че чешмяната вода е с физико-химични характеристики, сходни с минералните води на тези страни (van der Aa, 2003). В Холандия питейната вода се доставя от различни обществени фирми и една от задачите им е да осигуряват обществено достъпни чешми - част от инициатива да се популяризира приема на

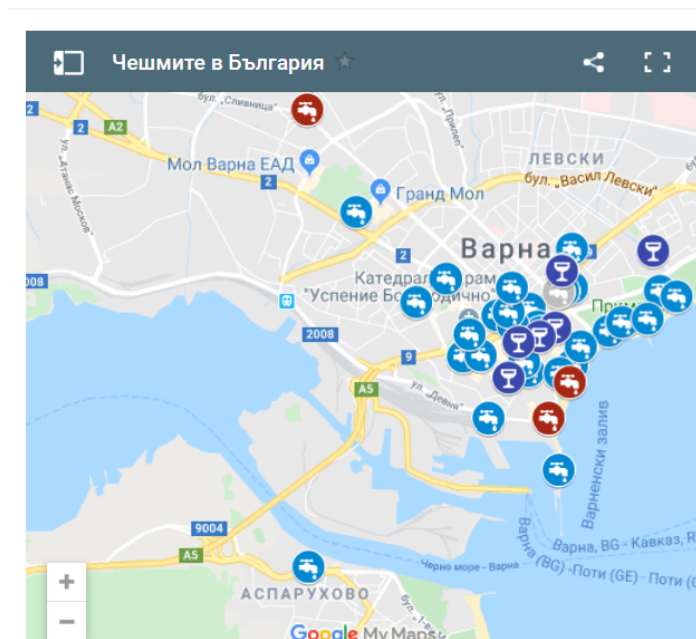
вода от чешмата с цел ограничаване на пластмасовите отпадъци. Тази инициатива („Refill your water bottle. Anywhere, anytime“) все повече набира популярност в страни, като Холандия, Германия, Великобритания, Италия. Докато много потребители изпитват непреодолима бариера да помоят за чешмяна вода на обществено място, 9 от 10 собственици на заведения са съгласни да се монтират кранове в заведенията (ресторанти, магазини, барове), за осигуряване достъп до чешмяна вода (Dijk, 2019). Включването на бизнеса в инициативата и нарастващият брой на достъпните източници на вода генерира създаване на електронни приложения, указващи достъпните източници на вода в цял свят (Refill app, Closca Water App, BluHop), включително в Африка, където чистата питейна вода е дефицитна.

Подобна инициатива стартира и в България („Нулев Отпадък София“, 2019), чиято цел е да се редуцират отпадъците чрез промяна на навиците. Според Стоянова (2019), в България има достатъчно на брой достъпни обществени чешми, тъй като изграждането на чешми и фонтани е част от традициите на българина („Best Practices: Zero Waste Sofia“, 2019). Само че, модерното общество, възприело т.нар. „култура на изхвърляне“, изпращало ~ 5 млн пластмасови бутилки за еднократна употреба на депото за отпадъци всеки ден. В световен мащаб тази цифра е огромна. В предаване на BBC през 2018 г. („Blue Planet II“) се съобщава, че всяка минута се купуват 1 млн. напитки, като само през 2016 г. са продадени 480 млрд. От тях по-малко от 50% са събрани за рециклиране, а 7% са превърнати отново в бутилки.

През 2019 г. е проведено национално проучване сред 600 участници („Нулев Отпадък София“, 2019), което разкрива три основни причини да не се използват обществените чешми в България. Според 89.4 % причината е липсата на информация относно качеството на водата; 64% смятат, че обществените чешми не се използват, защото са счупени и замърсени; 54% не знаят къде се намират тези чешми. Организаторите на инициативата заедно с местни общини и организации, започват маркиране на местонахожденията на чешмите в карта, а в рамките на проекта „Да изчистим България заедно, 2019“, част от чешмите са почистени. В карта „Чешмите в България“ са посочени и обществените чешми на гр. Варна, в това число и тези с минерална вода, (Снимка 7).

Настоящата анкета не целеше да се проучи мнението на потребителите относно екологичните проблеми, качеството на питейната чешмяна вода, или икономическия аспект като потенциална причина да се използват обществено достъпните минерални води, вместо да се закупуват бутилирани. В България не само чешмяната вода е с отлично качество. Поради слабата минерализация и липсата на ограничаващи приема компоненти, повече от половината български минерални води (70%) са подходящи за ежедневна употреба. София, Варна, Велинград, Хисар, Павел Баня, Сапарева баня, Стара Загора, Бургас са градове, които трябва

да бъдат популяризирани и заради обществено достъпните им минерални води, които имат лечебен потенциал.



Снимка 7. Карта „Чешмите в България“, в която са включени и достъпните обществени чешми с минерални води в гр. Варна, обект на настоящото изследване. Източник <http://zerowastesofia.com/>

Проведеното анкетно проучване сред 50 граждани при чешмите на гр. Варна показва информираност на гражданите за местоположението на обществените чешми с минерална вода в града. Регулярно наливащите вода най-често посещават чешмите веднъж на две седмици (Таблица 13), като наливат в относително голямо количество минерална вода (над 20 литра). Някои от потребителите използват минералната вода за профилактика на конкретни заболявания, най-често бъбречни заболявания (Таблица 14).

Резултатите в таблица 13 показват, че 35 % от анкетираните са наливали необходимото количество вода наведнъж – един път в седмицата, 33.75 % - веднъж на две седмици, 20% – през 3-4 дни и само 5% (4 души от общо 80 анкетираните) - през ден или всеки ден. По литературни данни Варненската минерална вода запазва стабилен физикохимичен състав при лагеруване на водата най-малко 2 месеца (Владева и Костадинов, 1996). Същите автори подчертават, че при бутилиране на минерални води, съдържащи сероводород, в бутилки от поливинилхлорид, неговата концентрация се запазва без значими промени повече от две седмици, а в стъклени бутилки - 4 дни. Те препоръчват съдовете да са плътно затворени, без досег до пряка слънчева светлина (Караколев, 1990). В нашето изследване бе установено, че 90 % от анкетираните са наливали минерална вода в пластмасови бутилки и 7.5 % в стъклени.

По данни в литературата ССМВ трябва да се пият директно след наливане, (Albertini et al. 2007), както са проведени интервенциите с хора в някои изследвания (Benedetti et al. 2007, 2009, 2010). Други подчертават, че във воден разтвор при рН 7.4, около една трета от H_2S остава в недисоциирана форма (Wang, 2002), дори след като водата е била съхранявана. Резултатите от анкетата показват, че 52.5 % от анкетираните започват да консумират от налятата минерална вода след като е престояла едно денонощие с отворени капачки в стаята и само 10 % започват да пият от водата веднага след наливане.

При изследването в динамика се установи, че количеството на разтворените сулфиди и сероводород намалява чувствително след третия ден и се запазва без промяна до седмия ден. Тъй като изследването в динамика е осъществено само за водата от Аквариума, чието съдържание на сероводород е 1.7 mg/L, и не е извършено за водата от „Дом Младост“, която е с по-високо съдържание на сероводород (2.8 mg/L), от която според дневника с дневния прием на минерална вода са пили 33-ма доброволци, и, имайки предвид различните начини на съхранение на налятата вода, е трудно да се прецени дори с приблизителна точност реалното съдържание на сероводород във водата, с която е проведена интервенцията. Въпреки че целта на настоящето изследване бе да се установят ефектите на минералната вода така, както я консумират варненци, интересно би било в бъдеще да се проучат и съпоставят данните, ако приемът на вода е планиран веднага след наливането или *in vitro* с човешки гастроинтестинални клетки.

Една от целите на анкетите бе да се събере възможно повече информация от потребителите на Варненската минерална вода за нейното лечебно приложение, които са допълващи настоящото изследване. От всички отговори (общо 101), получени от 80 анкетираните бе установено, че 44 души (43.56 %) не са информирани за препоръки или заболявания при които се пие Варненска минерална вода. Обобщените резултати на отговорителите, че знаят за приложението на Варненската минерална вода открояват бъбречните заболявания (20.79 %), заболяванията на гастроинтестиналния тракт (14.85 %) и на опорно-двигателната система (5.94 %), виж таблица 14. Тези знания се припокриват с данните от литературния обзор за приложението на слабоминерализираните хипертермални акратотерми, които се прилагат най-вече за лечение на бъбреците (Караколев, 1990; Albertini et al., 2007; Petracia et al., 2006). Посоченото количество на изпиваната минерална вода при повече от половината (56%) анкетираните граждани (Фигури 12 и 13) и определеното количество минерална вода на доброволците в интервенцията (20 mL/kg) също са в унисон с други проведени проучвания с прием на минерална вода, в които количествата на изпиваната

слабоминерализирана минерална вода варират между 1.2 L – 2 L (Караколев, 1990; Petracia et al., 2006; Zair et al., 2013).

2.2. Заключение

Проведеното анонимно анкетно проучване сред жителите на гр. Варна, а също и сред доброволците в настоящото изследване, обогати научното изследване с информация относно приложението на Варненската минерална вода при различни заболявания, като откри бърбечните и стомашно-чревните заболяванията на опорно двигателната система. Събраните данни относно дневното количество на изпиваната от потребителите минерална вода, бе в унисон с определеното дневно количество на водата за доброволците в настоящото научно изследване. Въпреки че варненци са информирани за вида на минералната вода те не са наясно с промените, настъпващи във физикохимичния ѝ състав при съхранение. По време на проучването бе популяризирана научната разработка на Медицински университет сред потребителите на минерална вода и ползите от нея по литературни данни.

3. Интервенция с прием на минерална вода

3.1. Резултати от анкетно проучване за ефектите от приема на минерална вода

Одобрените за участие доброволци бяха разделени на групи и от месец септември 2017 г. до месец май 2018 г. поетапно проведеха интервенция с 8-седмичен прием на минерална вода. От стартирали 51 бр. доброволци, успешно приключили интервенцията бяха 50 души (Ж/М=43/7). Интервенционалното проучване включваше две анкети. Първата анкета (Приложение 1) определяше здравния статус на доброволците, приема на лекарства и добавки и разглеждаше навиците, свързани с начина на живот, които на по-късен етап бяха корелирани с резултатите от анализа на някои биохимични маркери, имащи отношение към начина на живот (Глава 5). Втората анкета бе въведена в хода на изследването и попълниха 30 от общо 50 доброволци след приключване на интервенцията. Тя съдържаше въпроси за наблюдаваните от тях субективни ефекти по време на приема и след приема на минерална вода, и въпроси относно режима на наливане и съхранение на минералната вода (Приложение 2). Отговорите на доброволците относно режима на наливане на минерална вода бяха обобщени с отговорите на анкетиранияте граждани при чешмите, които регулярно приемат Варненска минерална вода (Приложение 3).

Въпросите, свързани със субективните ефекти на минералната вода, наблюдавани от доброволците по време на интервенция, бяха подбрани по литературни данни и съобразно

възможните реакции на организма, наблюдавани по време на лечение с прием на минерална вода.

Така, на въпрос дали приемът на минерална вода е причинил дискомфорт в гастроинтестиналния тракт 27 от анкетиранияте отговарят с „НЕ“, 3-ма с „ДА“, като последните уточняват, че дискомфортът е свързан със запек, отделяне на песъчинки и кръв или газове. Според 29 души приемът на минерална вода не е причинил нито недобро настроение и/или раздразнителност, нито смущение в съня, 1 участник подчертава, че приемът на вода му е причинил гадене, а 1 участник е отбелязал, че не може с точност да прецени дали приемът на вода е причина за смущението в съня му. 26 доброволци не свързват приема на минерална вода със зачестило главоболие, 1 участник не счита, че главоболието му се дължи на приема на вода, а трима са отговорили, че не могат да преценят. Последният въпрос от тази група е свързан с влиянието на водата върху кръвното. Той гласи следното: „*Свързвате ли приема на минерална вода с понижаване на кръвното Ви налягане?*” и две трети от участниците в изследването (21 души) отговарят на въпроса отрицателно, 9-ма – посочват, че не могат да преценят, нито един не отговоря положително на поставения въпрос.

Следващата група въпроси от анкетата са свързани с режима на наливане на минералната вода. Отговорите на 30-те анкетирани са систематизирани в таблица 13, стр.101, която включва и данните от отговорите на жителите на гр. Варна, които регулярно консумират минерална вода, но не са доброволци в изследването.

Събраната информация от въпрос №7 (таблица 13, стр. 101), относно знанията за препоръки и/или заболявания, при които се пие такъв вид вода (12 отговорили с „ДА“), е отразена на Фигура 14. Отговорите са обобщени с отговорите на жителите, които не са участници в изследването, но регулярно консумират Варненска минерална вода.

3.2. Дискусия на резултатите от проведеното анкетно проучване за ефектите от приема на минерална вода

Целта на анкетата бе да се установи мнението на доброволците относно субективните ефекти по време на прием и след прием на минерална вода, от една страна, а от друга, да се събере информация за начина на съхранение и количеството на наливане на минералната вода, което е свързано с динамиката на физикохимичния ѝ състав, обсъдени по-рано в т.2.1.

Резултатите от проведеното анкетно проучване за субективните ефекти по време и след прием на минерална вода сред 30 доброволци показват, че 8-седмичният прием на минерална вода не е свързан с поява на значим дискомфорт в гастроинтестиналния тракт, зачестило

главоболие, раздразнителност, лошо настроение, или смущения в съня. Отчетени са общо 4 субективни ефекта: отделяне на газове, отделяне на пясъчинки и кръв с урината, запек и гадене.



Фигура 14. Приложение на сярасъдържащата Варненска минерална вода, според отговорите на всички анкетиранни – 80 души (50 жители и 30 доброволци).

Балнеореакцията не е често срещана при питейното лечение с минерална вода, ако се появи, обикновено е слабо изразена. Според литературни данни тя се появява между 5-10-тия ден и може да засили симптомите, присъщи на лекуваното заболяване. Свързана е с появява на болки, колики и общо неразположение - недобро настроение, смутен сън и апетит, астения (КаракOLEV, 1990; Albertini et al., 2007). В настоящото изследване участниците са клинично здрави, няма данни за бъбречни или други хронични заболявания сред анкетираните.

България е сред ендемичните области, в които хората по-често страдат от уролитиаза, която засяга както жени, така и мъже (Atanassova and Panchev, 2013). Има данни, че 60% от оплакванията на пациентите, посетили уролог в България, са свързани с уролитиаза („Как да опазим бъбреците от камъни“, интервю с проф. Петър Панчев). Според водещи специалисти в областта много хора имат камъни/пясъчинки в бъбреците без да знаят и да усещат дискомфорт.

Дискомфорт се появява, ако конкрементът започне да мигрира в отделителната система, което се съпровожда с болки, следи от кръв в урината, които оставя преминаващият през пикочните пътища конкремент, нараняващ лигавицата (“Камъни в бъбреците, пясък в бъбреците (уролитиаза, нефролитиаза)”). Като превенция срещу заболяването на първо място е приемът на достатъчно количество вода (“Как да опазим бъбреците от камъни, интервю с проф. Петър Панчев”). Настоящото анкетното проучване показва, че основните здравословни причини, поради които се пият Варненските минерални води от достъпните чешми на града, са заболяванията на бъбреците (виж Фигури 12, 13).

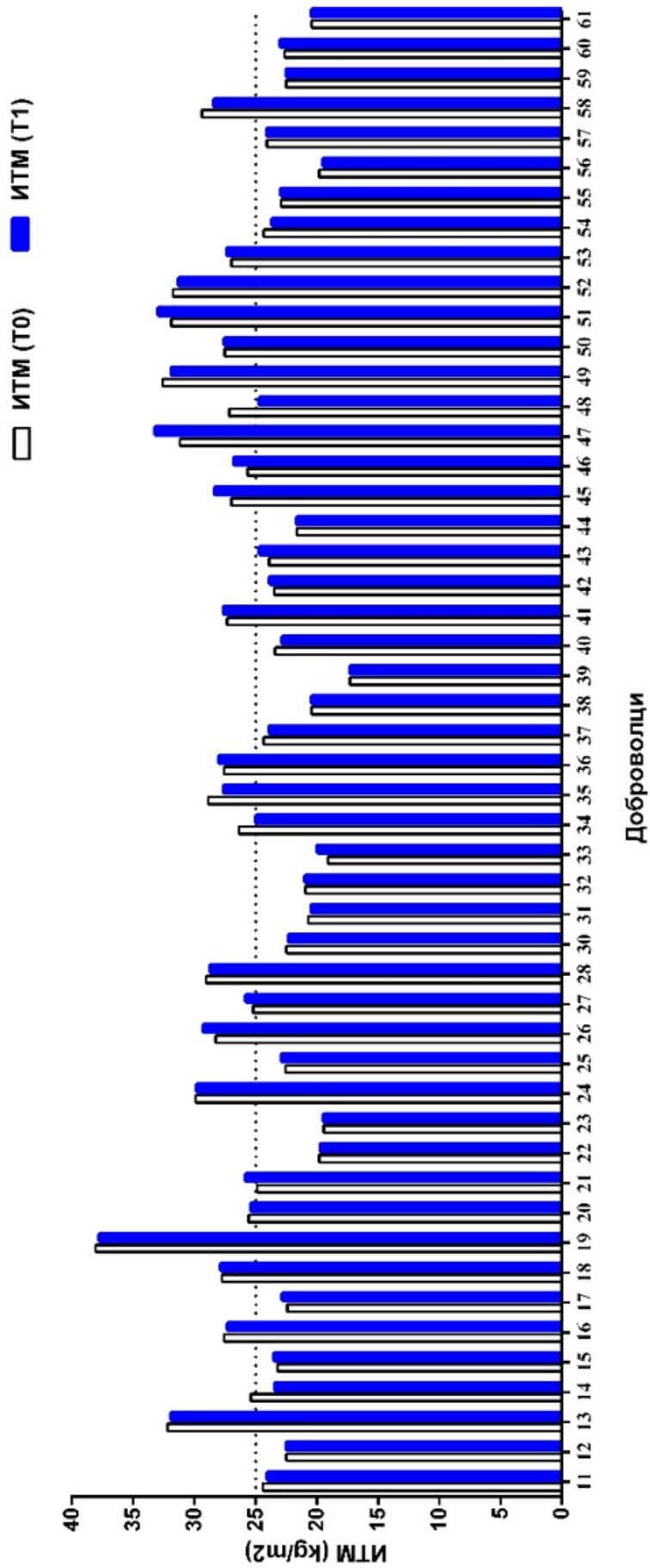
3.3. Заключение

Възможно е приемът на минерална вода да е причина за отделяне на пясъчинки и кръв с урината (при 1 участник). Сред анкетирания не бе установена информация за поява на болки, типични при бъбречна криза. Останалите отбелязани ефекти (газове, гадене, запек) вероятно се дължат на слабо изразена балнеореакция, която не е попречила на доброволците (3-ма участници) да завършат успешно интервенцията.

3.4. Ефект на минералната вода върху антропометричните показатели

Участниците в изследването са със средна възраст 50.76 ± 7.38 г. и средна височина 1.66 ± 0.071 см. Тридесет и пет участници (70%) са с висше образование „магистър“, останалите 30% са разпределени както следва: висше „бакалавър“ 8%, средно специално, 18%, средно гимназиално 4%. Данните за тегло и свързания с него показател индекс на телесната маса (ИТМ), както и средните стойности на систолично и диастолично кръвно налягане преди (Т0) и след (Т1) интервенцията са представени в Таблица 15. Изчисленият ИТМ преди интервенцията е <25 при 26 участници, а при останалите 24 участници е >25 , 6 от които 6 са с $\text{ИТМ} \geq 30$. След интервенцията при 28 участниците $\text{ИТМ} < 25$ (Фигура 15).

След интервенцията статистически значимо повишаване бе установено в антропометричните показатели – средната обиколка на талията 84.86 ± 1.59 см (Т0) спрямо 87.36 ± 1.69 см, (Т1), $p < 0.001$ и средното съотношение талия/ханш 0.80 ± 0.009 (Т0) спрямо 0.83 ± 0.011 , (Т1), $p < 0.001$ (Таблица 15).



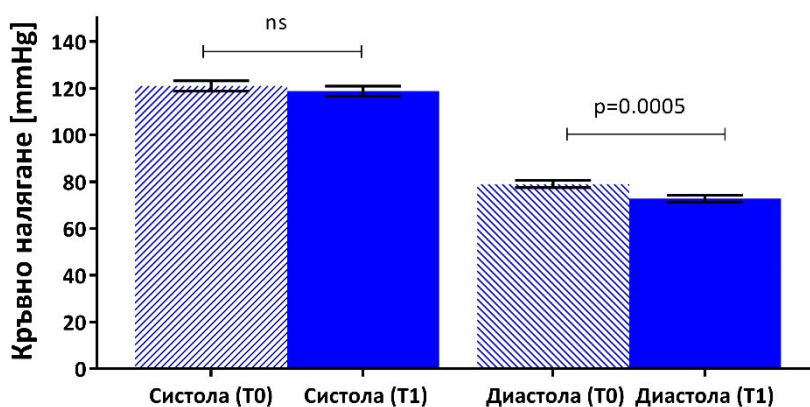
Фигура. 15. Индекс на телесна маса на доброволците преди (Т0) и след (Т1) интервенцията.

Таблица 15. Антропометрични данни на участниците преди (T0) и след (T1) интервенцията (n=50).

Показател	T(0) Средна \pm SEM n=50	T(1) Средна \pm SEM n=50	P стойност
Тегло [кг]	70.62 \pm 1.96	70.52 \pm 1.94	ns
ИТМ [кг/м ²]	25.29 \pm 0.59	25.26 \pm 0.59	ns
Талия [см]	84.86 \pm 1.59	87.36 \pm 1.69	***
Ханш [см]	105.50 \pm 1.32	104.64 \pm 1.17	ns
Талия/ханш	0.80 \pm 0.009	0.83 \pm 0.011	***
Кръвно налягане – систолично [mmHg]	121 \pm 2.23	118.8 \pm 2.14	ns
Кръвно налягане – диастолично [mmHg]	79 \pm 1.55	72.82 \pm 1.50	**

Данните са представени като средна стойност \pm стандартна грешка на средната (SEM). Статистическа значимост ** p<0.01; ***p<0.001 спрямо базовите стойности измерени преди началото на интервенцията; Легенда: ИТМ, индекс на телесната маса.

Отчетена бе разлика и в кръвното налягане след интервенцията, като статистически значимо понижение бе наблюдавано при диастолата 79 \pm 1.55 mmHg (T0) спрямо 72.82 \pm 1.50 mmHg, (T1), p<0.01. При систолата се наблюдава тенденция към понижаване без значимост за изследването (Фигура 16).



Фигура. 16. Кръвно налягане преди (T0) и след (T1) интервенцията. Данните са представени като средни стойности \pm стандартна грешка на средната (SEM). Статистическа значимост спрямо базовите стойности измерени преди началото на интервенцията *p<0.001.**

3.5. Ефект на минералната вода върху нивата на класически биохимични маркери в кръв

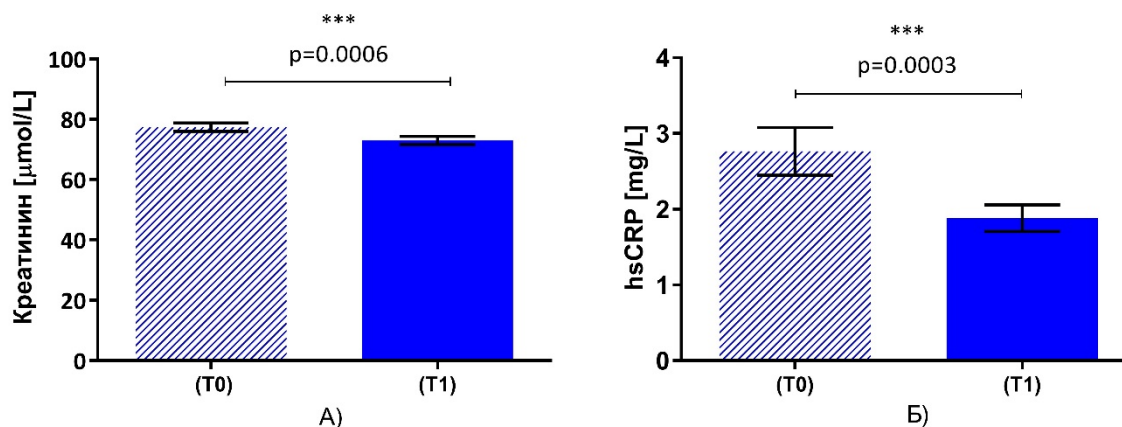
Резултатите от измерените класически биохимични маркери преди и след интервенцията с прием на минерална вода са представени в Таблица 16. Установено бе статистически значимо понижаване в плазмените концентрации на креатинина при 66% от доброволците ($77.36 \pm 9.99 \mu\text{mol/L}$ (T0) спрямо $72.94 \pm 9.38 \mu\text{mol/L}$, (T1) $p < 0.05$), Фигура 17А. Високочувствителният С-реактивен протеин при 64 % от доброволците също се понижава значимо ($2.76 \pm 2.22 \text{ mg/L}$ (T0) спрямо $1.88 \pm 1.24 \text{ mg/L}$ (T1), $p < 0.05$), Фигура 17Б. Всички показатели са в границата на референтните стойности. Не е открита статистически значима разлика в останалите анализирани биохимични маркери. В около половината от участниците (54%) се наблюдава леко повишаване в нивата на алдостерона след интервенцията (Таблица 16).

Таблица 16. Нива на класически биохимични маркери в проби от кръвен серум преди (T0) и след (T1) интервенцията с прием на минерална вода.

Показател, единици	T(0) Средна \pm SEM n=50	T(1) Средна \pm SEM, n=50	P	Референтни граници
ГГТ [U/L]	22.09 ± 2.85	20.80 ± 2.34	ns	М до 60 ; Ж до 39
Креатинин [$\mu\text{mol/L}$]	77.36 ± 1.41	72.94 ± 1.32	**	до 120
Холестерол общ [mmol/L]	5.57 ± 0.134	5.46 ± 0.127	ns	Нормални: до 5,2; Гранични: 5.2 – 6.2; Високи: > 6.2
LDL-холестерол [mmol/L]	2.63 ± 0.083	2.59 ± 0.070	ns	до 3,36 - нормален риск; > 4.14 - висок риск
HDL-холестерол [mmol/L]	1.64 ± 0.055	1.58 ± 0.060		М>1.0; Ж>1.2
Триглицериди [mmol/L]	1.09 ± 0.074	1.14 ± 0.085	ns	до 1.7
Калий [mmol/L]	4.15 ± 0.045	4.20 ± 0.053	ns	3.5 – 5.6
Натрий [mmol/L]	140.6 ± 0.23	140.7 ± 0.24	ns	136 – 151
Хлориди [mmol/L]	104.3 ± 0.26	104.6 ± 0.32	ns	95.0 – 110
Калций [mmol/L]	2.31 ± 0.009	2.33 ± 0.013	ns	2.12 – 2.62
Фосфор [mmol/L]	1.12 ± 0.027	1.15 ± 0.027	ns	0.87 – 1.50
Алдостерон покой, [nmol/L]	0.34 ± 0.030	0.39 ± 0.036	ns	0.049 – 0.643
hs-CRP [mg/L]	2.76 ± 0.314	1.88 ± 0.176	**	до 6,0

Данните са представени като средна стойност \pm стандартна грешка на средната (SEM). Статистическа значимост ****** $p < 0.01$ спрямо базовите стойности измерени преди началото на интервенцията.

Легенда: ГГТ – гама-глутамил трансфераза; hs-CRP – високочувствителен С-реактивен протеин; М – мъже; Ж – жени. ns – липса на статистическа значимост; n – брой доброволци.



Фигура 17. А) Нива на креатинина преди (Т0) и след (Т1) интервенцията; Б) Нива на високочувствителния С-реактивен протеин преди (Т0) и след (Т1) интервенцията. Данните са представени като средни стойности ± SEM. Статистическа значимост * $p < 0.001$ спрямо базовите стойности измерени преди началото на интервенцията.**

3.6. Ефект на минералната вода върху нивата на класически биохимични показатели в урина

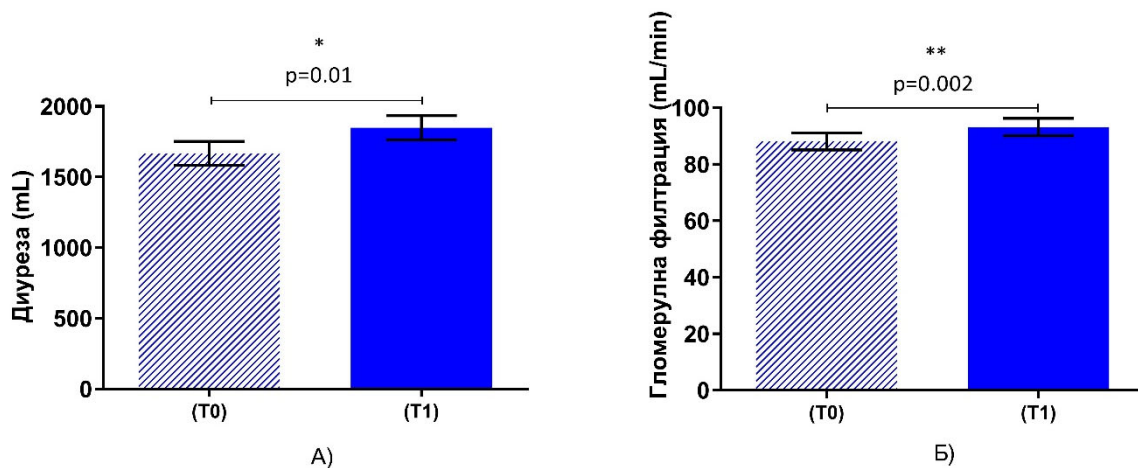
След приема на минерална вода бе установено статистическо значимо повишаване в средните нива на диурезата (1849 ± 85.19 mL (Т1) срещу 1668 ± 84.84 mL (Т0), $p=0.01$), Фигура 18А. Понижаването на креатинина и едновременното повишаване на диурезата бяха индикация да се провери гломерулната филтрация на бъбреците, което бе извършено по формулата на Cockcroft-Gault (Cockcroft and Gault, 1976). Статистически значимо повишаване в индексът на гломерулната филтрация на бъбреците (ИГФ) има при 31 участници, или при 62% от тях (93.22 ± 3.070 mL/min (Т1) срещу 88.19 ± 3.059 mL/min (Т0), $p=0.002$), Фигура 18Б. За останалите маркери: рН, белтък, глюкоза, кетониви тела, билирубин, уробилиноген и относително тегло в 24-часова урина, не бяха установени статистически различия след 8-седмичния прием на минерална вода. На Таблица 17 са показани данните, чиито стойности са числен израз и са без значими промени.

Таблица 17. Нива на биохимични маркери в урина преди (Т0) и след (Т1) интервенцията.

Показатели, единици	Т(0) Средна ± SEM, n=50	Т(1) Средна ± SEM, n=50	P	Референтни граници
Киселинност [pH]	5.980 ± 0.076	6.000 ± 0.084	ns	4.5 – 8.2
Относително тегло [g/L]	1.018 ± 0.001	1.016 ± 0.001	ns	1.001 – 1.028

Данните са представени като средна стойност ± SEM. Статистическа значимост * $p < 0.05$ спрямо базовите стойности измерени преди началото на интервенцията.

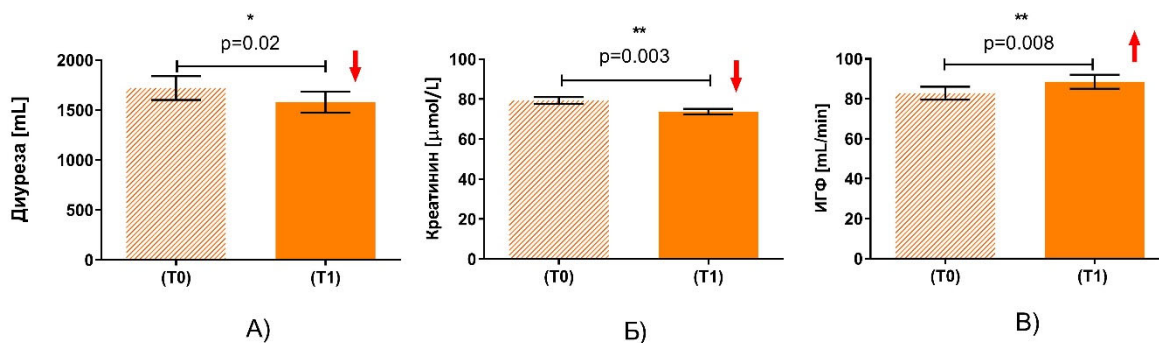
Легенда: ns – липса на статистическа значимост; n – брой доброволци.



Фигура. 18. А) Нива на диурезата преди (T0) и след (T1) интервенцията; Б) Нива на гломерулната филтрация на бъбреците преди (T0) и след (T1) интервенцията. Данните са представени като средни стойности ± SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ спрямо базовите стойности измерени преди началото на интервенцията.

3.7. Ефект на минералната вода върху функцията на бъбреците

За да установим дали подобрението в ефективността на бъбречната функция (понижено ниво на креатинин в плазма, съпроводено с повишена гломерулна филтрация), се дължи на увеличаване на обема диуреза след интервенцията, бяха анализирани данните на 28 участници (56%), чиито диурези бяха завишени с не-повече от 200 mL, бяха без промяна, или с намалени обеми след приключване на интервенцията. В подгрупата от селектирани участници със статистически значимо понижаване в обема на диурезата в T1, бе установено значимо понижаване в средните нива на креатинина в плазма, съпроводено със завишаване на филтрационната способност на бъбреците в същата подгрупа (Фигура 19).



Фигура 19. А) Средни нива на диурезата преди (T0) и след (T1) интервенцията; Б) средни нива на креатинина преди (T0) и след (T1) интервенцията; В) средни нива на индекса на гломерулна филтрация на бъбреците преди (T0) и след (T1) интервенция при 28 селектирани участници.

3.8. Сравнение на резултатите по групи в зависимост от предпочитания източник на минерална вода

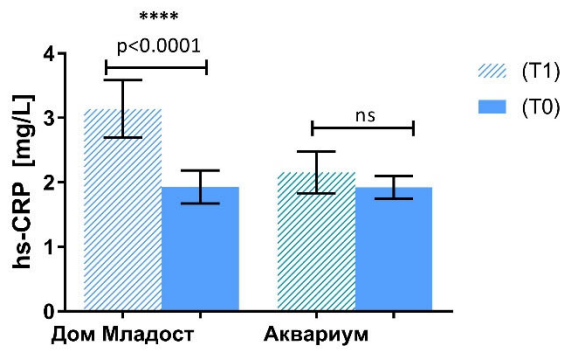
В зависимост от предпочитания източник, доброволците бяха разделени на две групи: група „Дом Младост“ (n=33) и група „Аквариум“ (n=13). Четирима доброволци не са класифицирани по групи, тъй като в индивидуалните си дневници за прием на вода са посочили, че са консумирали вода от двата водоизточника. Минералните води от двата водоизточника са със сходен физико-химичен състав, като съдържанието на сероводород и разтворени сулфиди, амоняк и натрий на излива е по-високо във водата при Дом Младост (Таблица 10). Статистически значимите разлики, установени в общата група доброволци след интервенцията, се откриват само в група „Дом Младост“: установени бяха статистически значими понижения в средните нива на hs-CRP (1.92 ± 0.25 mg/L (T1) срещу 3.13 ± 0.44 mg/L (T0), $p < 0.0001$), Фигура 20А, както и в нивата на креатинина (73.42 ± 1.63 μ mol/L (T1) срещу 78.91 ± 1.80 μ mol/L (T0), $p = 0.0005$), Фигура 20Б, докато в група „Аквариум“ не се установяват разлики. На границата на значимостта, с леко завишаване, са нивата на алдостерона в група „Дом Младост“ (Таблица 16). Нивата на калций в плазма се повишават статистически значимо в T1 при група „Дом Младост“ (2.34 ± 0.01 mmol/L (T1) срещу 2.31 ± 0.009 mmol/L (T0), $p = 0.04$), Фигура 20В. Значими увеличения в средния обем на диуреза (1694 ± 103.7 mL (T1) срещу 1517 ± 98.22 mL (T0), $p = 0.04$) и в ИГФ (93.36 ± 4.06 mL/min (T1) срещу 87.66 ± 4.21 mL/min (T0), $p = 0.04$) се откриват отново само в група „Дом Младост“ в T1, Фигура 20Г, Д. В група „Аквариум“ не се установяват статистически значими разлики, вероятно поради по-малкия брой на извадката, но тенденцията е същата, каквато е при „Дом Младост“. Долната граница на кръвното налягане намалява статистически значимо при участниците и в двете групи след интервенцията. В група „Аквариум“ прави впечатление, че разликата е по-значима (Аквариум: 71.15 ± 1.71 mmHg (T1) срещу 81.77 ± 1.92 , mmHg, (T0), $p = 0.0002$; Дом Младост: 72.34 ± 1.55 mmHg (T1) срещу 77.88 ± 2.10 (T0), $p = 0.007$), Фигура 20Е. Горната граница на кръвното налягане остава без промяна след интервенцията (Дом Младост: 118.5 ± 2.20 mmHg (T1) срещу 118.5 ± 2.76 mmHg (T0), $p = ns$; Аквариум: 121.4 ± 3.47 mmHg (T1) срещу 127.2 ± 3.81 mmHg (T0), $p = ns$). За всички останали маркери в двете групи преди и след интервенцията не се наблюдават значими разлики. Данните са представени в Таблица 18.

Таблица 18. Промени в нивата на класически биохимични маркери в група „Дом Младост“ и група „Аквариум“ преди (T0) и след (T1) интервенцията.

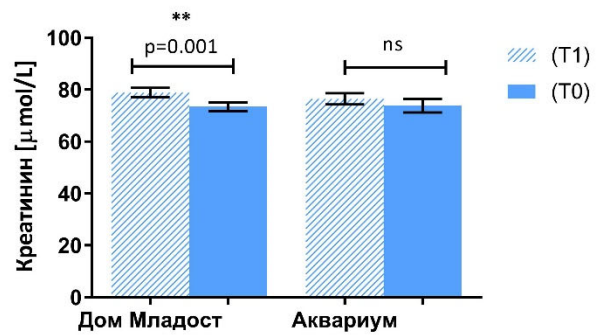
Параметър	Дом Младост Средна ±SEM T0 (n=33)	Дом Младост Средна ±SEM T1 (n=33)	P стойност	Δ (T1-T0)
Маркери в плазма				
ГГТ [U/L]	24.02±4.09	22.3±3.186	ns	-1.72
Алдостерон [nmol/L]	0.30±0.02	0.36±0.03	0.06	0.06
Холестерол общ [mmol/L]	5.53±1.53	5.45±0.16	ns	0.08
LDL-холестерол [mmol/L]	2.64±0.08	2.59±0.087	ns	-0.05
HDL-холестерол [mmol/L]	1.60±0.06	1.54±0.06	ns	-0.6
Триглицериди [mmol/L]	1.14±0.09	1.19±0.11	ns	0.05
Калий [mmol/L]	4.09±0.05	4.17±0.07	ns	0.08
Натрий [mmol/L]	140.5±0.28	140.8±0.33	ns	0.3
Хлориди [mmol/L]	104.5±0.32	105.1±0.38	ns	0.6
Фосфор [mmol/L]	1.068±0.02	1.128±0.03	ns	0.06
Маркери в урина				
Киселинност [pH]	5.98±0.08	6±0.08	ns	0.02
Относително тегло [g/L]	1.019±0.001	1.018±0.001	ns	-0.001
Параметър	Аквариум Средна ±SEM T0 (n=13)	Аквариум Средна ±SEM T1 (n=13)		Δ (T1-T0)
ГГТ [U/L]	19.25±3.33	18.92±3.878	ns	-0.33
Креатинин [μmol/L]	76.45±2.19	73.85±2.64	ns	-2.6
Алдостерон [nmol/L]	0.42±0.08	0.42±0.07	ns	0
hs-CRP [mg/L]	2.15±0.32	1.92±0.17	ns	-0.23
Холестерол общ [mmol/L]	5.73±0.26	5.57±0.24	ns	-0.16
LDL-холестерол [mmol/L]	2.65±0.14	2.67±0.08	ns	0.02
HDL-холестерол [mmol/L]	1.70±0.11	1.64±0.13	ns	-0.06
Триглицериди [mmol/L]	1.06±0.13	1.12±0.12	ns	0.06
Калий [mmol/L]	4.26±0.08	4.3±0.07	ns	0.04
Натрий [mmol/L]	140.8±0.37	140.8±0.32	ns	0
Хлориди [mmol/L]	103.3±0.53	103.1±0.54	ns	-0.02
Калций [mmol/L]	2.34±0.02	2.32±0.01	ns	-0.02
Фосфор [mmol/L]	1.20±0.05	1.21±0.05	ns	0.01
Маркери в урина				
Киселинност [pH]	5.96±0.17	6.03±0.22	ns	0.07
Относително тегло [g/L]	1.014±0.002	1.011±0.0008	ns	-0.003
Диуреза [mL]	1852±165.5	2054±124.4	ns	202
ИГФ [mL/min]	84.75±4.01	88.02±4.40	ns	3.27

Данните са представени като средна стойност ± SEM. Използван е цифтен t-test за оценка на статистическата значимост между групите (T1 спрямо T0). Δ (T1 - T0), делта - показва разликата между двете времеви точки на изследване

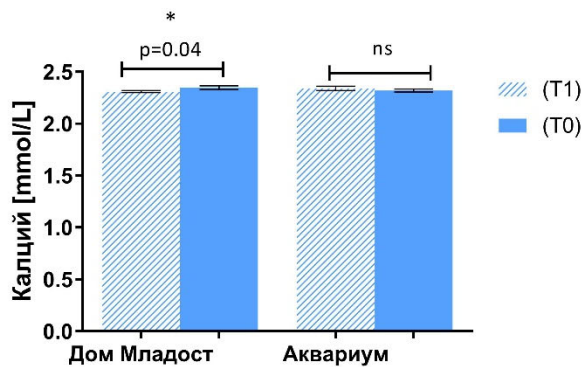
Легенда: ГГТ – гама-глутамил трансфераза; sh-CRP – high sensitive C-reactive protein, от английски високочувствителен С-реактивен протеин; ИГФ - индекс на гломерулна филтрация;; ns – липса на статистическа значимост; n – брой доброволци.



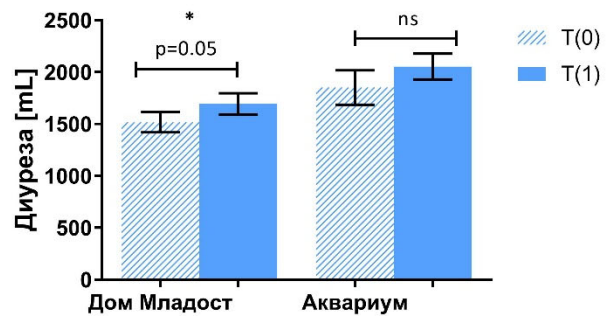
А) hs-CRP



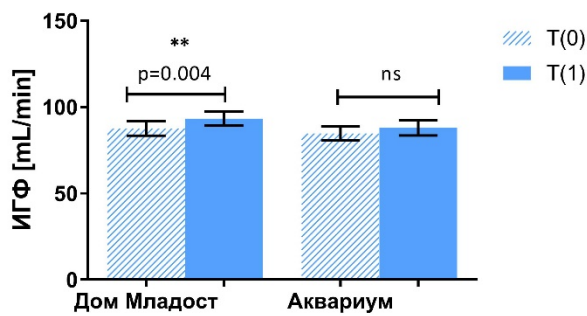
Б) Креатинин



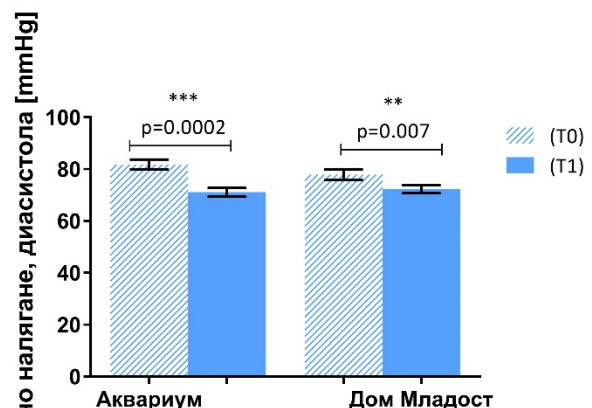
В) Калций



Г) Диуреза



Д) Индекс на гломерулна филтрация



Е) Диастолично кръвно налягане

Фигура 20. Разлики в средните нива на класически биохимични маркери при доброволците в зависимост от предпочетения източник на минерална вода („Дом Младост“ или „Аквариум“). Стойностите са представени като средна стойност \pm SEM. Статистическа значимост е отчитана при * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ спрямо базовите стойности измерени преди началото на интервенцията; ns – липса на статистическа значимост.

3.9. Дискусия на резултатите от анализа на класическите биохимични маркери в кръв и урина

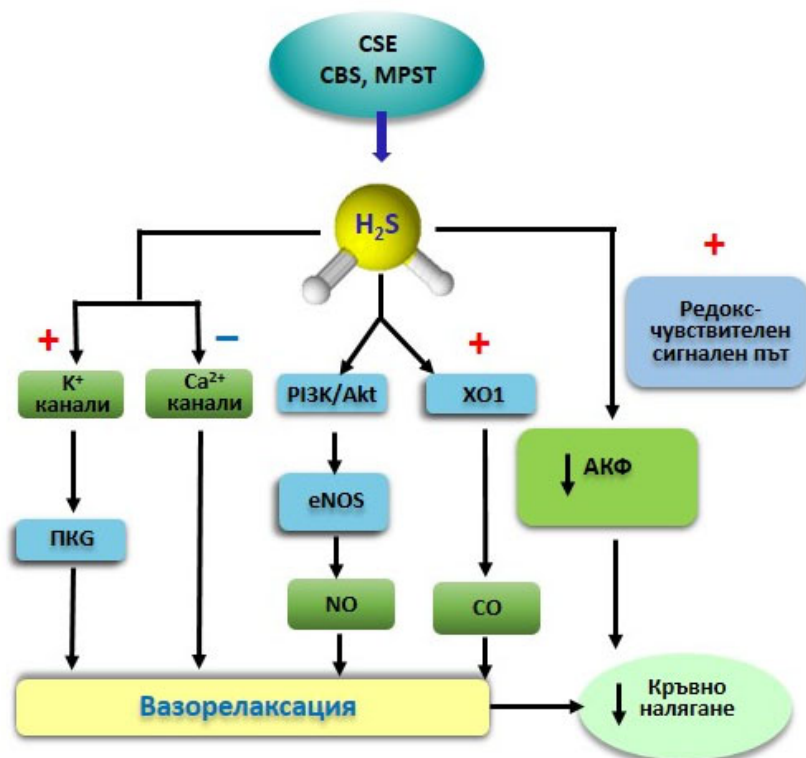
Завишеният прием на вода се свързва с по-голям обем диуреза и повишено ескретиране на креатинин с урината (Calomino, et al., 2010). По-големият обем диуреза може да наруши деликатния баланс на електролити и минерали в организма, да причини хипонатриемия, промени в кръвното налягане и нивата на телесните флуиди, да доведе до хиперкалиемия или дори до дехидратация. В настоящото изследване след двумесечен прием на Варненска минерална вода установяваме статистически значимо повишаване в средния обем на диурезата (Фигура 18А). При анализа на съдържанието на натрий, калий, хлор, фосфор и калций в плазма не се отчитат промени в нивата им след интервенцията. Същевременно при 54% от участниците бе открито повишение в нивото на алдостерон, което не е статистически значимо. По отношение на кръвното налягане наблюдаваме значимо понижаване в диастолата (Фигура 16). Наблюдаваното увеличение на обема на диурезата вероятно е свързано с повишена екскреция на натрий с урината. Организмът се адаптира като повишава нивата на алдостерон в кръвта. Ролята на алдостерона е да регулира нивата на натрий и калий в кръвта и така да регулира кръвното налягане, баланса на течности, електролити и рН на кръвта. Свързвайки се със специфични клетъчни рецептори в дисталните тубули на бъбречните нефрони, той стимулира отварянето на йонни канали и повишаване реабсорбцията на натрий в кръвта и екскрецията на калий с урината. В отговор на понижените концентрации на натрий, завишените концентрации на калий и пониженото кръвно налягане се активира ензимът ренин. Ренинът стимулира секрецията на алдостерон, който пък активира обратната резорбция на натрий и това взаимодействие може да е причина за липса на разлики в концентрациите на йоните в кръвта. Повишени плазмени нива на алдостерон са идентифицирани при хора със затлъстяване (Tsuboi et al., 2017). Авторите обясняват завишаването на алдостерона със секрецията на адипоцитни фактори от мастната тъкан, които активират системата ренин-ангиотензин-алдостерон, повишавайки плазмените нива на алдостерона. В края на интервенцията на настоящото проучване не са отчетени статистически значими разлики в телесното тегло. Наблюдаваното значимо повишение в обиколката на талията, респективно и в съотношението талия/ханш считаме, че се дължи на регулярната консумация на вода, която е довела до по-голямата обиколка на талията. Във тази връзка тенденцията за повишаване на алдостерона най-вероятно е в следствие на описания компенсаторен механизъм на организма да регулира нивата на електролитите в кръвта.

От друга страна, Варненската минерална вода съдържа също калций, който също може да е причина за увеличаване на диурезата, съдържа още сероводород и разтворени сулфиди.

Макар да не сме наясно колко точно сяра са приели с минералната вода доброволците в хода на интервенцията, допускаме че някои от резултатите се дължат именно на сярасъдържащите компоненти и в частност на сероводорода, който влияе върху редица физиологични и патологични процеси, сред които най-изследвани са релаксацията на кръвоносните съдове, кардиопротекцията и атеросклерозата (Liu et al., 2011; Yang et al., 2013; Bos et al., 2014; King et al., 2014; Mani et al., 2014). Съобщават се ефекти свързани с понижаване на кръвното налягане по механизми, свързани с регулацията на различни йонни канали. Установено е, че високото кръвно налягане при хора, животни (в това число мишки с дефицит на цистатионин- γ -лиаза), е съпроводено със занижени нивата на ендогенно синтезирания H_2S . Авторите предполагат, че високото кръвно налягане се понижава по механизъм, свързан с регулиране на съдовия тонус посредством активиране на АТФ-зависимите калиеви канали (K_{ATP}), предизвиквайки хиперполяризация, и/или инхибиране на Ca^{2+} инфлукс чрез съответните Ca^{2+} канали. Сероводородът и азотният оксид в кръстосано взаимодействие регулират вазорелаксацията чрез сигнален път PI3K/Akt-eNOS-NO (фосфатидил инозитол-3 киназа/Akt-катализирано фосфорилиране на ендотелна NO-синтаза), съпроводено с активиране на хем-оксигеназа, генерираща CO и инхибират генерирането на АКФ посредством редокс-чувствителен сигнален път (Фигура 21). Възможно е приемът на минерална вода да е увеличил нивата на сярасъдържащи съединения, които повлияват метаболизма така, че е постигнат хипотензивен ефект.

Отчетено бе статистически значимо понижение в нивата на креатинина (Фигура 17А) и статистически значимо завишение на ИГФ след интервенцията (Фигура 18Б). Анализът на индивидуалните резултати показва, че ИГФ е завишен при 62% от участниците. Креатининът и ИГФ са показатели, отчитащи състоянието на бъбреците. Получените резултати показват, че приемът на минерална вода от Варненски басейн подобрява бъбречната функция. Подобряването на бъбречната функция може да бъде обяснено с повишеното количество на изпитата вода по време на интервенцията, което води до по-обилна диуреза.

За да се изключи факторът диуреза, бяха оценени нивата на креатинин и ИГФ в подгрупа от 28 участници, чиито средни нива на диуреза са занижени след интервенцията (Фигура 19А). Промените в средните нива на плазмения креатинин (намален) и ИГФ (повишен) потвърдиха очакванията за подобрена бъбречна функция, независимо от фактора диуреза (виж Фигури 19 Б и В). Можем да предположим, че подобряването на бъбречната дейност след интервенцията е по-скоро повлияно от наличието на специфични съединения във Варненската минерална вода.



Фигура 21. Вероятни механизми по които сероводородът може би понижава кръвното налягане (Модифицирана от Meng et al., 2015).

Легенда: CSE, цистатионин-γ-лиаза; цистатионин-β-синтаза (CBS), MPST, 3-меркаптопируват сулфотрансфераза; PKG - протеин киназа G; XO1 – хем оксигеназа 1; eNOS ендотелна азотен оксид синтаза; PI3K/Акт- вътреклетъчен сигнален път, който в отговор на определени извънклетъчни сигнали, насърчава метаболизма, пролиферацията, клетъчното оцеляване, растежа и ангиогенезата. Медиира се чрез сериново и/или треониново фосфорилиране на редица субстрати надолу по веригата. Ключови протеини са фосфатидилинозитол 3-киназа (PI3K) и Akt /протеин киназа В.

В модел на бъбречна недостатъчност е установено, че третиране със H₂S значително понижава нивата на креатинин и урея в серум (Feliers, et al., 2016; Wu et al., 2017). В друго проучване (Xia, et al., 2009) се докладва, че интравеналната артериална инфузия със H₂S увеличава скоростта на гломерулната филтрация при плъхове, съпроводено с увеличаване на фракционната филтрация. Като се има предвид, че минералната вода на гр. Варна е със сравнително високо съдържание на H₂S и други съединения на сярата и че нашите резултати са в съответствие на резултатите, получени в други изследвания, може да се предположи, че именно сяра-съдържащите съединения в минералната вода имат благоприятна роля за подобряване на бъбречната функция.

При разделянето на участниците в подгрупи в зависимост от предпочитания източник на минерална вода се установи по-значимо понижаване в нивата на креатинина, както и по-значимо повишение в нивата на ИГФ в подгрупа ДМ спрямо подгрупата на А. Във водата на

ДМ бяха установени по-високи концентрации на сярасъдържащи съединения (ССС) и това би могло да е вероятна причина за отчетените резултати.

Функционирането на бъбреците зависи от възпалителните процеси в организма и високите нива на hs-CRP се свързват с високи нива на креатинин и с нарушена бъбречна функция (Nirwan et al., 2017; Stuveling et al., 2003). Нашите резултати показват, че плазмената концентрация на hs-CRP значително намалява след интервенцията с прием на минерална вода (виж Фигура 17Б). Известно е, че CRP има важна роля във възпалителния отговор чрез няколко механизма, включващи стимулиране на транскрипционен фактор NF-kB (Chang, et al., 2005; Sproston and Ashworth, 2018). По литературни данни във Варненската минерална вода се съдържа метасилициева киселина, а има данни, че минералните води, съдържащи метасилициева киселина оказват противовъзпалително действие (Владева и Бошев, 2011; Стоянова, 2012). От друга страна, счита се, че органичните съединения на сярата, постъпили в организма чрез храненето, са причина за много биологични ефекти, включително противовъзпалителни (Guo, et al., 2013a). В *in vitro* изследване с клетъчни култури, Lee и съавтори (Lee, et al., 2012) установяват, че сярасъдържащите съединения от чесън инхибират производството на азотен оксид, простагландин E₂ и експресията на про-възпалителни цитокини, намалявайки възпалителния процес. Нутриенти, съдържащи серни съединения, могат да са донори на субстрати за синтез на ендогенен H₂S, за който се съобщава, че има противовъзпалителен ефект в организма чрез инхибиране на NF-kB (Benavides et al., 2007; Jin et al., 2015). Вероятно има значение концентрацията на СССР в минералната вода, тъй като анализът на резултатите по отношение на hs-CRP в подгрупите показва по-изразено понижение на про-възпалителния маркер в групата на ДМ спрямо тази на А. Може да се предположи, че сярата, приета с минералната вода, консумирана като ежедневна питейна вода, ще бъде утилизирана по подобен начин. Това е първото проучване, при което се установява, че прием на сярасъдържаща минерална вода води до значимо намаляване на hs-CRP.

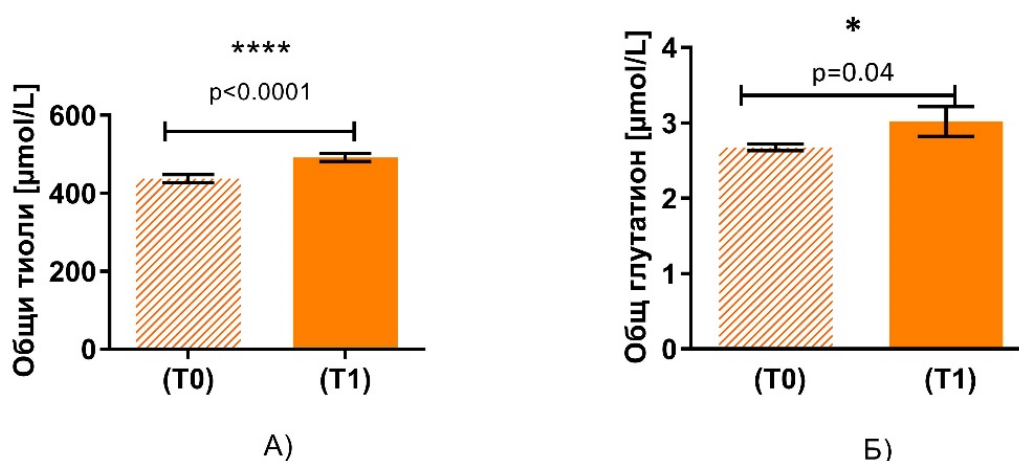
3.10. Заключение

На база на получените резултати достигаме до извод, че Варненската минерална вода подобрява ефективността на бъбречната функция. Лечебните ефекти на водата се проявяват най-вече в противовъзпалителния потенциал, а именно да понижава нивата на високочувствителния С-реактивен протеин в кръвта. Настоящите резултати са първите научни доказателства в подкрепа на традиционните знания относно благоприятните ефекти на минералната вода от Варненски басейн върху човешкия метаболизъм. Тези данни биха били интересни за всички специалисти в сферата на медицината и общественото здравеопазване.

4. Ефект на минералната вода върху специфични биохимични и молекулярно генетични маркери от оксидативен статус и възпаление в кръвен серум

4.1. Ефект на минералната вода върху маркери на оксидативен статус в кръвен серум

Като маркери на оксидативен статус в кръвен серум бяха анализирани нивата на общи тиоли, общ глутатион, редуциран и окислен глутатион, съотношението GSH/GSSG, малонов диалдехид и реактивни кислородни метаболити. След интервенцията бе установено статистически значимо увеличение на общите тиоли. Техните стойности преди и след интервенцията, съответно, са $437,5 \mu\text{mol/L} \pm 10.40$ (T0) и $492 \mu\text{mol/L} \pm 10.11$ (T1), $p < 0.0001$, (Фигура 22А). Общият глутатион също бе значително повишен: $2.67 \pm 0.04 \mu\text{mol/L}$ (T0) срещу $3.01 \pm 0.19 \mu\text{mol/L}$ (T1), $p < 0.05$, (Фигура 22Б). Не са установени значими разлики в нивата на останалите анализирани маркери в двете времеви точки на изследване (Таблица 19).



Фигура 22. А) Нива на общите тиоли преди (T0) и след (T1) интервенцията (n=50); Б) Нива на общия глутатион преди (T0) и след (T1) интервенцията (n=45). Стойностите са представени като средна стойност ± SEM. За сравнение на маркерите в двете времеви точки на изследване е използван чифтен t-test на Стюдънт. Статистическа значимост е отчитана при $p < 0.05$.

След интервенцията бе наблюдавана тенденция към леко увеличение (с 15.2%) в съотношението на редуцирания към окисления глутатион, както и тенденция към увеличаване на редуцирания глутатион (с 27.43%). При 83% от участниците приемът на минерална вода води до покачване на редуцирания глутатион, докато при останалите 17% той намалява.

Таблица 19. Нива на биохимични параметри на оксидативен статус в плазма в двете времеви точки на изследване: преди (T0) и след (T1) интервенцията.

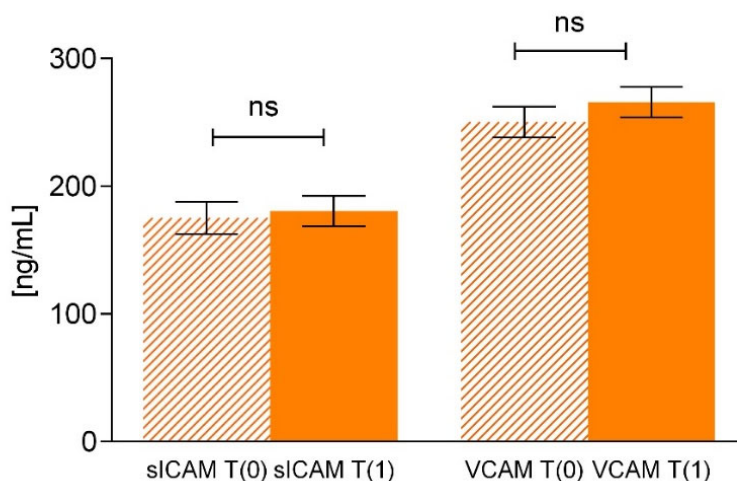
Параметри	Средна \pm SEM T0	Средна \pm SEM T1	P стойност
МДА [$\mu\text{mol/L}$] (n=50)	3.34 \pm 0.25	3.36 \pm 0.25	ns
PKM [$\text{mg H}_2\text{O}_2/\text{L}$] (n=50)	305.5 \pm 6.28	306.2 \pm 6.00	ns
GSH [$\mu\text{mol/L}$] (n=24)	1.64 \pm 0.10	2.09 \pm 0.35	ns
GSSG [$\mu\text{mol/L}$](n=24)	1.10 \pm 0.12	1.17 \pm 0.06	ns
GSH/GSSG (n=23)	1.71 \pm 0.20	1.97 \pm 0.31	ns

Данните са представени като средна стойност \pm SEM. За сравнение на маркерите в двете времеви точки на изследване е използван чифтен *t*-test на Стюдънт. Статистическа значимост е отчитана при $p < 0.05$. ; ns – липса на статистическа значимост; n – брой доброволци.

Легенда: МДА, малонов диалдехид; PKM, реактивни кислородни метаболити; GSH (редуциран глутатион); GSSG (окисен глутатион); GSH/GSSG (редуциран глутатион/окисен глутатион); ns – липса на статистическа значимост; n – брой доброволци;

4.2. Ефект на минералната вода върху маркери на възпалението

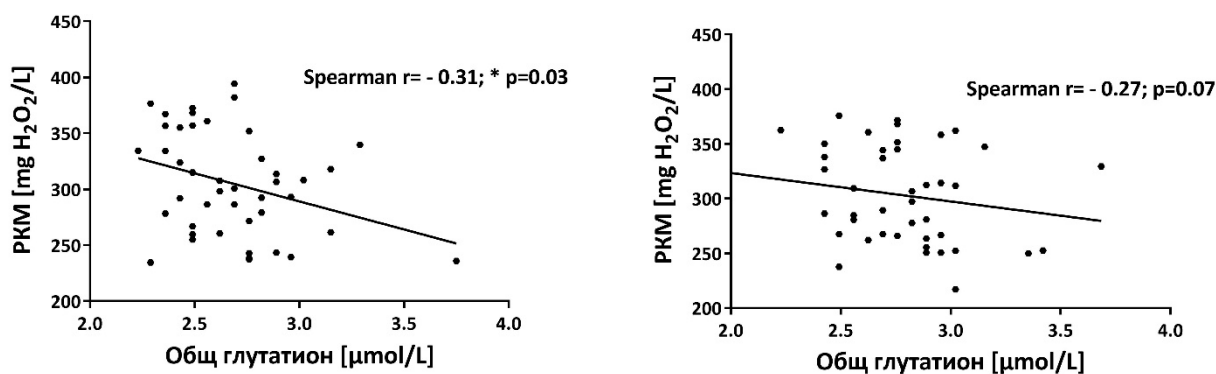
Като маркери на възпалението, наред с hs-CRP (виж Фигура 17Б), бяха анализирани и нивата на разтворима междуклетъчна адхезионна молекула sICAM-1 и съдова клетъчна адхезионна молекула VCAM-1 в плазма. Концентрациите на sICAM-1 и VCAM-1 не се променят статистически значимо след интервенцията (Фигура 23).



Фигура 23. Нива на разтворима междуклетъчна адхезионна молекула sICAM-1 и съдова клетъчна адхезионна молекула VCAM-1 в плазма преди (T0) и след (T1) интервенцията, (n=44). Всички стойности са представени като средна стойност \pm SEM. За сравнение на маркерите в двете времеви точки на изследване е използван чифтен *t*-test на Стюдънт. Статистическа значимост е отчитана при $p < 0.05$.

4.3. Корелация между маркери на антиоксидантен статус и маркери за оксидативен стрес в плазма

Статистически значима отрицателна корелация бе открита между нивата на РКМ и общия глутатион в T0 (Spearman $r = -0.31$; $p < 0.05$), представена на Фигура 24А. Тази взаимовръзка в T1 бе по-слаба, на границата на статистическата значимост (Spearman $r = -0.27$; $p = 0.07$), представена е на Фигура 24Б.

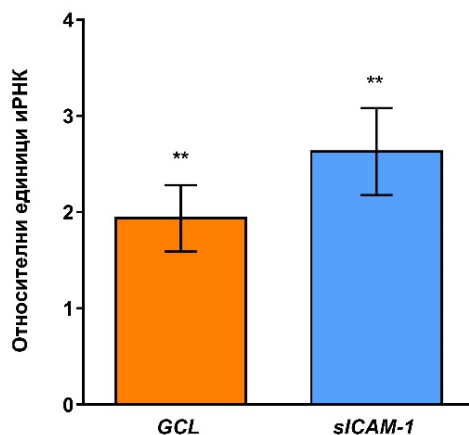


Фигура 24. Отрицателна корелация между общия глутатион и РКМ преди и след 8-седмичен прием на минерална вода; А) преди интервенция (T0); Б) след интервенция (T1); Използван е непараметричен Spearman t-test. Статистическа значимост е отчитана при $p < 0.05$. Легенда: РКМ - реактивни кислородни метаболити.

4.4. Ефект на минералната вода върху експресията на гени, свързани с възпалението и редокс баланса в изолирани РВМС клетки

Познавайки ролята на сярата за поддържане редокс-статуса на клетъчно и извънклетъчно ниво, участието и в синтеза на глутатион, в състава на аминокиселини с ключова роля за активността на ензими с SH-групи в активния център, и имайки предвид данните в литературата за редукционните свойства на сероводорода, антиоксидантния му потенциал (Lowicka and Beltowski, 2007; Whiteman et al., 2006), способност да активира синтеза на глутатион, чрез стимулиране транспорта на цистеин (Kimura and Kimura, 2004); както и влияето му върху редица сигнални пътища, бяха планирани анализи на степента на експресия на гени, свързани с антиоксидантната защита, възпалителния отговор (*GCL*, *iNOS*, *VCAM-1*, *ICAM-1*), на ензими от метаболизма на сярасъдържащи аминокиселини (*CBS*, *CSE*), както и някои микроРНКи. Поради получени неспецифични амплификации не беше установена степента на експресия в по-голяма част от планираните анализи.

Нивата на генна експресия на *GCL* и *ICAM-1*, анализирани в двете времеви точки на изследване показаха нарастване след 8-седмичната интервенция с прием на минерална вода. Средните нива на генна експресия нарастват до 1.935 ± 0.34 относителни единици иРНК за *GCL* ($p=0.009$) и до 2.63 ± 0.45 единици иРНК за *ICAM-1* ($p=0.001$). Резултатите са представени на Фигура 25.



Фигура 25. Нива на генна експресия на *GCL* и *ICAM-1* в изолирани РВМС след интервенцията. Нивата на иРНК са представени като средна стойност на относителните единици иРНК \pm SEM за групата, сравнени с нивата преди интервенция, където експресията на всеки един ген при всеки доброволец е приета за равна на 1.

Неспецифична или липса на амплификация бе установена в експресията на: цистатионин бета-синтаза (CBS), цистатионин гама-лиаза (CGL), глутатион пероксидаза (GPx), индуцируема азотен окис синтаза (iNOS), *VCAM-1* с различни ендогенни контроли RPL0, RPL37a и АСТВ1.

4.5. Сравнение на резултатите от анализирани специфични маркери в зависимост от предпочитания източник на минерална вода

Статистическо повишаване на нивата на общите тиоли бе установено и в двете групи – в група „Дом Младост“ и в група „Аквариум“. Въпреки че не е статистически значимо, леко увеличение бе открито в нивата на общия глутатион, но само в група „Дом Младост“. Нивата на глутатионовите фракции (GSH, GSSG) и съотношението GSH/GSSG, в двете групи, бяха с подобни нива като тези на общата група, като тенденцията към увеличение на GSH и съотношението GSH/GSSG в T1 се наблюдаваше и в подгрупите. При останалите анализирани маркери не бяха установени статистически значими разлики в двете времеви точки на изследване. Единствено отчетена бе тенденция към увеличение на нивата на протеина VCAM-1 в двете групи (Таблица 20).

Таблица 20. Промени в серумните нива на биохимичните маркери, свързани с редокс статуса, за групите “Дом Младост” и “Аквариум” преди (T0) и след (T1) интервенцията.

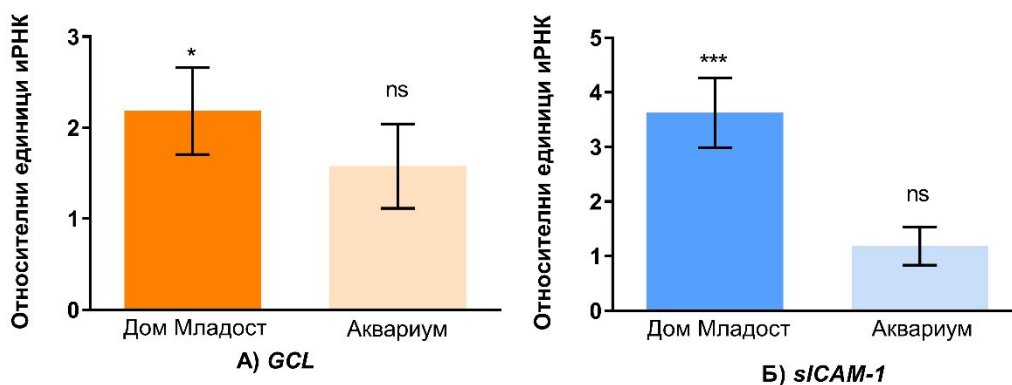
Параметри	Дом Младост Средна ±SEM T0 (n=33)	Дом Младост Средна±SEM T0 (n=33)	P стойност	Δ (T1-T0)
МДА [$\mu\text{mol/L}$]	3.32±0.32	3.38±0.33	ns	0.06
РКМ [$\text{mg H}_2\text{O}_2/\text{dL}$]	31.56±0.72	31.21±0.78	ns	-0.35
ICAM-1 [ng/mL]	162.7±15.31	177.9±14.67	ns	15.20
VCAM-1 [ng/mL]	253.9±15.50	269.4±17.63	ns	15.50
Общи тиоли [$\mu\text{mol/L}$]	441.1±14.23	497.6±13.97	***	56.50
Общ глутатион [$\mu\text{mol/L}$]	2.66± 0.049	3.10± 0.292	0.07	0.44
Маркери	Аквариум Средна±SEM T0 (n=13)	Аквариум Средна±SEM T1 (n=13)	P стойност	Δ (T1-T0)
МДА [$\mu\text{mol/L}$]	3.51±0.470	3.31± 0355	ns	-0.20
РКМ [$\text{mg H}_2\text{O}_2/\text{dL}$]	28.94±1.33	29.42±1.02	ns	0.48
ICAM-1 [ng/mL]	178.2±15.76	179.5±18.17	ns	1.3
VCAM-1 [ng/mL]	239.0±19.43	267.5±11.95	ns	28.5
Общи тиоли [$\mu\text{mol/L}$]	422.8±12.46	471.7±11.07	*	48.9
Общ глутатион [$\mu\text{mol/L}$]	2.76± 0.118	2.81±0.104	ns	0.05

Данните са представени като средна стойност ± SEM. За сравнение на маркерите в двете времеви точки на изследване е използван чифтен t-test на Стюдънт. Статистическа значимост * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ спрямо базовите стойности измерени преди началото на интервенцията.;

Легенда: МДА, малонов диалдехид; РКМ, реактивни кислородни метаболити; ICAM-1, intracellular adhesion molecules, от английски междуклетъчна адхезионна молекула; VCAM-1, vascular cell adhesion molecules, от английски съдова клетъчна адхезионна молекула; ns – липса на статистическа значимост; n – брой доброволци.; Δ (T1 - T0), делта - показва разликата между двете времеви точки на изследване.

Отчетени бяха увеличени нива на общия глутатион и леко понижени нива на РКМ в плазма при група „Дом Младост“ след интервенцията. Тези резултати не бяха отчетени при група „Аквариум“.

Експресията на *GCL* и *sICAM-1* бяха статистически значимо по-високи за група „Дом Младост“ в T1 (2.183±0.47 относителни единици иРНК за *GCL*; $p=0.02$, Фигура 26А и 3.627±0.64 относителни единици иРНК за *sICAM-1*; $p=0.0007$, Фигура 26Б). След интервенцията не бяха установени значими разлики в нивата на иРНК на изследваните гени в група „Аквариум“.



Фигура 26. Сравнение между нивата на генна експресия на *GCL* и *sICAM-1* в РВМС след интервенцията между групи „Дом Младост“ и „Аквариум“; А) нива на генна експресия на *GCL*; Б) нива на генна експресия на *sICAM-1*. Нивата на иРНК са представени като средна стойност на относителните единици иРНК \pm SEM за групата, сравнени с нивата преди интервенцията, където експресията на всеки ген при всеки доброволец е приета за равна на 1.

4.6. Дискусия на резултатите от изследваните специфични биохимични и молекулярно-генетични маркери

Сярсъдържащата минерална вода, която е разпространена в изобилие в България, се използва основно при спа-процедури, базирани на познанията от традиционната медицина за лечебните свойства на водата. Счита се, че активната молекула в ССМВ е , сероводородът, който може лесно да преминава през кожата. В зависимост от концентрацията сероводородът оказва различно влияние в редица физиологични процеси. В ниски концентрации (<5 μ M) е докладван като субстрат за дихателната верига, който може да стимулира преноса на електрони в митохондриите (Yong and Searcy, 2001), а в по-високи концентрации (>20 μ M) той е инхибитор на цитохром оксидазната система. Има данни, че сероводородът регулира L и T калциевите канали и отваря АТФ-зависимите калиеви канали, което води до релаксация на ГМК и СЕК и вазодилация (Zoccali et al., 2009; Matsunami et al., 2012; Modis et al., 2013; Munaron et al., 2013;). Като повишава активността на супероксид дисмутаза (СОД) и редуцирания глутатион, сероводородът понижава продукцията на АКФ и проявява антиоксидантни свойства. Чрез способността да инхибира NF-kB-сигнален път, митоген-активирана протеин киназа p38 (MARK p38), C-Jun N-терминална киназа (JNK), Bcl-2-асоциираните X протеини (BAX) и каспаза-3 и да активира Bcl може да прояви анти-апоптотични свойства (Shen et al., 2013; Guo, et al. 2013b). Анти-апоптотичните, противовъзпалителни и антиоксидантни ефекти на сероводорода се проучват в детайли като се използват синтетични донори на сероводород; като се потискат ензими от ендогения му

синтез най-често в *in vitro* условия с човешки и животински клетъчни култури, а също и в експериментални модели с животни при индуцирани патологични състояния. Нарастналият интерес към сероводорода генерира интензивни проучвания относно механизмите му на въздействие и освобождаване с цел откриване на способ за лечение на сериозни заболявания, като Паркинсон, Алцхаймер, склероза, псориазис, диабет и др. Тези нови знания неминуемо насочват вниманието на изследователите и към минералните води, като природен ресурс на сероводород.

Нашите резултати показват, че двумесечен прием на ССМВ води до статистически значимо повишение на нивата на общите тиоли – маркер за антиоксидантния капацитет в плазма. Глутатионът е трипептид, който участва в регулацията на редокс-статуса, метаболизма на лекарства и е субстрат на ензими, като глутатион пероксидаза, глутатион-S-трансфераза, тиолови трансферази и др. Глутатионът обичайно е в редуцирана форма (GSH), но се окислява (GSSG) при условия на оксидативен стрес и съотношението GSH/GSSG се използва като индекс за редокс баланса. Независимо от факта, че не бе установена статистически значима разлика в съотношенията GSH/GSSG преди и след интервенцията, тенденция към повишаване бе отчетена при 83% от участниците в изследването в T1. Тези резултати са основание да предположим, че регулярният прием на минерална вода от Варненски басейн повлиява метаболизма и утилизацията на сяра в човешкото тяло. Подобни резултати са получени в други интервенционални изследвания с хора и животни, свързани с прием на ССМВ. Докладвани са значими повишения в нивата на общите тиоли в серия от проучвания на италиански колектив изследователи с прием на ССМВ от клинично здрави или страдащи от остеоартрит доброволци (Benedetti et al. 2007, 2009, 2010). През 2007 год. при 15 доброволци с остеоартрит (М=5, Ж=10, възраст 65-80 год.), учените установяват, че дванадесет дневни балнеопроцедури и прием на 300 mL/ден ССМВ (Термален център Pitium, Macerata Feltria, Italy) със съдържание на сулфиди (53.4 mg/L), подобряват антиоксидантната защита на организма, чрез значимо повишаване на общите тиоли и биологичната антиоксидантна сила (ВАР) и намаляване на нивата на окислителните маркери – МДА и продукти от окислението на протеините. В проучване със здрави доброволци (възраст 41–55 год.), двуседмичният прием на ССМВ (n=20), в количество 500 mL/ден и съдържание на сяра 14.5 mg/L (Термален център Saturnia, Grosseto, Italy), изпивана до час след отваряне на бутилката, води до значимо повишаване на нивата на общите тиоли в сравнение с контролната група (n=20), приемащи същото количество бутилирана минерална вода, без сероводород (Benedetti et al. 2009). В същото изследване е установено и значимо понижение в маркерите за липидно и протеиново окисление в плазма (МДА, карбонили и продукти от окислението на протеините), но само в групата, приемащи ССМВ и

не е отчетена промяна в нивата на токофероли, каротеноиди и ретинол. В последващо проучване на Benedetti и съавтори (2010) се установява повишаване на общите тиоли; намаляване на окислението (МДА и карбонили); възпалението (TNF- α) и разграждането на хрущяла, отчетено чрез хрущялен олигомерен матричен протеин (COMP) след 12-дневен прием на 400 mL/ден от Saturnia, Grosseto, Italy, в комбинация с калолечение и спа-процедури, приложени при пациенти с остеоартрит (n=15). Един месец след тази терапия, резултатите се запазват в групата, консумираща ССМВ, в сравнение с групата, чиято интервенция не включва консумация на ССМВ вода. Soria и съавтори, 2014 докладват противоположни резултати - повишаване в нивата на маркерите за окисление. В настоящото изследване, след интервенцията бе отчетена повишена експресия на *GCL*, скорост-определящият ензим за синтеза на глутатион (Фигура 25). Може да се предположи, че приемът на ССМВ повлиява нивата на глутатиона чрез ускоряване на гама-глутамиловия цикъл. Резултатите в настоящото изследване са в унисон с резултатите в други проучвания (Kimura 2004, 2010), и вероятно установеният ефект се дължи на разтворения в минералната вода на гр. Варна и вероятно установеният ефект се дължи на разтворените в минералната вода на гр. Варна сярсъдържащи съединения. Те повишават активността на γ -глутамил-цистеин синтетаза и на глутамат цистеин лигаза (скорост-определящ за производството на GSH), като повишава активността на цистеин/глутаматния антипортер и на транспортера на цистеин, който е субстрат в синтеза глутатион (Kimura, 2010).

Малоновият диалдехид е един от крайните продукти от липидното окисление и е маркер за компрометиран редокс статус (de Zwart et. al. 1999). По отношение на МДА и РКМ (предимно хидропероксиди и органични радикали в плазма, преизчислени в mg H₂O₂/dL), не бяха установени статистически значими разлики в двете времеви точки на изследване и може да се предположи, че приемът на минерална вода от Варненски басейн не води до повишаване на нивата на окисление при здрави доброволци. Вероятно оксидантите се неутрализират своевременно от подобрената антиоксидантна защита на организма.

Пероксидите са постоянно образуващи се в тялото. Главна роля за противодействие на този процес има глутатионът и свързаните с неговия синтез и редукция ензими. Глутатион редуктазата използва за донори на електрони йодид, витамин С, витамин Е, и съединения със сулхидрилни групи. В нашето изследване бе открита статистически значима отрицателна корелация в T0 между нивата на глутатиона и нивата на РКМ в плазма. Този резултат би могъл да се обясни с повишената експресия на *GCL*, което води до увеличаване на нивата на глутатиона, отговорен за редукцията на пероксиди. От биохимична гледна точка увеличената

експресия на *GCL* може да се асоциира с изчерпването на глутатиона по време на интервенцията. Освен това, корелацията между РКМ и глутатиона в T1 остава отрицателна, макар и без статистическа значимост.

Варненската минерална вода е слабоминерализирана със сходен физико-химичен състав и значително съдържание на сяра-съдържащи субстанции, чийто концентрации се различават - във водата от чешмата под „Аквариума“ те са 1.7 mg/L, а във водата до „Дом Младост“ - 2.8 mg/L. Сравнението между участниците, в зависимост от предпочитания обществен водоизточник, показва повишение в нивата на общите тиоли в двете групи в T1, като ефектът е по-голям в групата, консумирала вода от „Дом Младост“. Това може да се дължи на по-високите концентрации на серодоводород и разтворени сулфиди в тази вода (Таблица 10). Подобрене в антиоксидантния капацитет чрез повишаване на общия глутатион и леко понижаване на РКМ бе установено в група „Дом Младост“ в сравнение с група „Аквариум“. Тези резултати бяха последвани от статистически значимо повишаване в експресията на *GCL* само в група „Дом Младост“. Може да се предположи, че по-високите нива на сяра-съдържащи съединения в слабоминерализирани води водят до подобряване на антиоксидантната защита на организма и може да има по-благоприятни ефекти върху антиоксидантния статус на здрави доброволци. Увеличените нива на общия глутатион и лекото понижение в нивата на РКМ при група „Дом Младост“ в T1 са индикация за подобрене на антиоксидантния капацитет в кръвен серум при групата. Същото не бе отчетено при групата „Аквариум“.

В настоящото изследване проучихме възможните ефекти на минералната вода на гр. Варна върху процесите на възпаление. Освен изследвания *hs-CRP* фокусирахме интереса си върху две адхезионни молекули *ICAM-1* и *VCAM-1*. Причината да се спрем на тях е, че и двете молекули, като специфични про-възпалителни маркери, се формират по време на процесите на възпаление като биологични таргети на нуклеарен фактор κB (NF- κB) сигналния път, провокиран от тумор некрозиращ фактор-алфа (TNF- α).

ICAM-1 е гликопротеин и про-възпалителен маркер, основно експресиран по повърхността на ендотелни клетки или клетки от имунната система в ниски концентрации при нормални физиологични условия. При човек адхезионната молекула е кодирана от ген *ICAM-1*, чийто промотор/усилвател има свързващо място за редица транскрипционни фактори, в това число нуклеарен фактор κB (NF- κB). Стимулацията от страна на цитокини води до бурно увеличение в концентрацията на *ICAM-1*.

ICAM-1, както и VCAM-1, позволява прикрепването на левкоцити към ендотелиума и способства тяхната трансмиграция в периферни тъкани, провокирайки възпалителен процес (Frank and Lisanti, 2008). Нашата хипотеза бе, че увеличение в нивата на двете адхезионни молекули най-вероятно би било вследствие от предшествано активиране на TNF- α .

Липсват данни за влиянието на ССМВ върху адхезионни молекули. В настоящото проучване двумесечният прием на Варненска минерална вода значително стимулира експресията на *ICAM-1*, въпреки че не бяха отчетени промени в концентрациите на протеина както в общата група, така и в подгрупите („Дом Младост“ и „Аквариум“). Повишената експресия на *ICAM-1* може да се обясни с отговора на тялото към предизвикателството регулярен двумесечен прием на микронутриенти чрез Варненската минерална вода. Както беше отбелязано, минералната вода съдържа малки количества сероводород, амоняк, амониеви йони, флуорид др., което може да възпроизведе първоначален отговор чрез стимулиране на имунната система. Стимулирането на имунната система е вследствие на активирането на TNF- α и експресията на *ICAM-1*, феномен, наречен хормезис (Galvez et al. 2018). Това се възприема като адаптационен механизъм, чрез който, след първоначалното смущение в хомеостазата, организмът се подготвя да преодолее по-тежък стрес (Galvez et al. 2018).

Нашите резултати са в съответствие с резултатите на Bhatia и съавтори (2012), които обясняват индуцирането на експресията на *ICAM-1* с ролята на сероводорода или на негови донори, да мобилизират имунната система при различни патологични състояния. Така например, сероводородът индуцира експресия на *ICAM-1* и неутрофилна адхезия при третирани с церулеин ацинарни клетки на панкреаса посредством активиране на NF- κ B и Src-киназни сигнални пътища (Tamizhselvi et al. 2010). Повишена експресия на про-възпалителни гени са наблюдавани и при фибробласто-подобни синовиоцити, получени от пациенти с ревматоиден и остеоартрит, третирани с натриев хидросулфид - донор на сероводород (Kloesch et al. 2012).

4.7. Заключение

Получените резултати ни довеждат до извода, че консумацията на ССМВ би могла да подобри редокс статуса на организма. Това се потвърждава от подобрените антиоксидантни маркери в кръвта и увеличената експресия на гени, участващи в антиоксидантната защита и възпалителния отговор. Предполагаме, че тези благоприятни ефекти се дължат на съдържанието на сяра-съдържащи съединения във Варненската минерална вода.

5. Ефекти на минералната вода в зависимост от начина на живот

Въз основа на данните от първата „Анкетна карта“ (Приложение 1), участниците бяха разделени на групи в зависимост от навиците, определящи техния начин на живот, такива като: индекс на телесната маса (ИТМ), физическа активност, тютюнопушене и прием на високоалкохолни напитки. Нивата на някои биохимични маркери, измерени в двете времеви точки на изследване, които се влияят от навиците, като липиден профил и окисление на липиди, редокс статус и възпаление, бяха сравнени между групите.

5.1. Влияние на ИТМ върху ефектите от приема на минерална вода

Разпределението на участниците в зависимост от ИТМ е както следва: 26 доброволци са в група ИТМ<25 и 24 доброволци са в група ИТМ≥25 (виж. Фигура 15, стр. 114). Не бяха установени статистически значими промени в ИТМ след интервенцията.

Както е представено в Таблица 13, базовите нива на общия холестерол, ТАГ, LDL-холестерола, МДА, hs-CRP преди интервенцията (Т0) бяха значимо по-високи в групата с ИТМ≥25, в сравнение с групата с нормално телесно тегло и ИТМ<25. След интервенцията (Т1), средните нива на LDL-холестерола в плазма намаляват статистически значимо в група с ИТМ≥25 – 2.70 ± 0.09 mmol/L (Т1) спрямо 2.87 ± 0.12 mmol/L (Т0), $p=0.04$. При това, значимите разлики в стойностите на LDL-холестерола между групите отчетени в Т0 не бяха запазени в Т1. След интервенцията бе открита тенденция към намаляване на нивата на общия холестерол в групата с ИТМ≥25 – общ холестерол: 5.88 ± 0.18 mmol/L (Т0) спрямо 5.60 ± 0.15 mmol/L (Т1), $p=0.055$. Не бяха установени статистически значими разлики в нивата на HDL-холестерола между доброволците с нормално и наднормено тегло и този маркер остана непроменен до края на проучването.

Интервенцията с прием на минерална вода понижи статистически значимо нивата на hs-CRP и в двете групи, доброволци с нормално и доброволци с наднормено тегло ($p=0.032$ и $p=0.001$, респективно). Въпреки че не бяха открити съществени разлики в базовите нива на общите тиоли между групите в Т0, след интервенцията те бяха значимо повишени и в двете групи: ИТМ<25, $p<0.0001$; ИТМ≥25, $p=0.006$. Нивата на МДА бяха със значими разлики между участниците в групите с нормално и наднормено тегло в Т0, $p=0.008$ и в Т1, $p=0.001$. Не бяха отчетени статистически значими разлики в този маркер след интервенцията в нито една от групите (Таблица 21).

Таблица 21. Ефекти на минералната вода от гр. Варна върху биохимични маркери в зависимост от фактори, свързани с начина на живот.

Индекс на телесната маса								
Параметри	<25 (T0), n=26	<25 (T1), n=26	≥25 (T0), n=24	≥25 (T1), n=24	p ^a (T0)	p ^b (T1)	p ^c <25	p ^c ≥25
Хол общ [mmol/L]	5.29±0.01	5.33±0.19	5.88±0.18	5.60±0.15	0.027	ns	ns	0.055
ТАГ [mmol/L]	0.88±0.06	0.85±0.04	1.32±0.12	1.45±0.14	0.002	<0.0001	ns	ns
LDL-хол [mmol/L]	2.40±0.09	2.49±0.10	2.87±0.12	2.70±0.09	0.004	ns	ns	0.04
HDL-хол [mmol/L]	1.72±0.06	1.67±0.07	1.56±0.08	1.48±0.09	ns	ns	ns	ns
МДА [μmol/L]	2.70±0.17	2.59±0.15	4.02±0.45	4.19±0.44	0.008	0.001	ns	ns
hs-CRP [mg/L]	2.24±0.33	1.48±0.10	3.33±0.52	2.31±0.33	0.008	0.017	0.032	0.001
Тиоли [μmol/L]	431±15.56	491±11.86	444±13.83	492±16.96	ns	ns	<0.0001	0.006
Физическа активност								
	ВФА (T0), n=24	ВФА (T1), n=24	НФА (T0), n=26	НФА (T1), n=26	p ^a (T0)	p ^b (T1)	p ^c ВФА	p ^c НФА
Хол общ [mmol/L]	5.55±0.18	5.48±0.19	5.60±0.2	5.44±0.17	ns	ns	ns	ns
ТАГ [mmol/L]	1.08±0.11	1.09±0.13	1.09±0.09	1.19±0.10	ns	ns	ns	ns
LDL-хол [mmol/L]	2.58±0.10	2.63±0.11	2.67±0.13	2.55±0.09	ns	ns	ns	ns
HDL-хол [mmol/L]	1.63±0.08	1.54±0.09	1.66±0.07	1.62±0.07	ns	ns	ns	ns
МДА [μmol/L]	3.28±0.28	3.18±0.28	3.38±0.40	3.52±0.41	ns	ns	ns	ns
hs-CRP [mg/L]	2.02±0.17	1.58±0.12	3.44±0.55	2.16±0.31	0.022	ns	0.022	0.002
Тиоли [μmol/L]	453±13.00	515±12.70	423±15.74	471±14.5	ns	0.028	0.001	0.001
Тютюнопушене								
	НП (T0), n=33	НП (T1), n=33	П (T0), n=17	П (T1), n=17	p ^a (T0)	p ^b (T1)	p ^c НП	p ^c П
Хол общ [mmol/L]	5.39±0.14	5.27±0.12	5.93±0.26	5.82±0.27	0.056	0.039	ns	ns
ТАГ [mmol/L]	0.99±0.07	0.95±0.05	1.28±0.15	1.50±0.20	0.063	0.002	ns	0.096
LDL-хол [mmol/L]	1.69±0.06	1.61±0.06	1.56±0.11	1.52±0.11	0.018	0.043	ns	ns
HDL-хол [mmol/L]	2.49±0.08	2.48±0.07	2.90±0.15	2.81±0.13	ns	ns	ns	ns
МДА [μmol/L]	3.03±0.24	2.84±0.18	3.91±0.55	4.35±0.58	0.097	0.004	ns	ns
hs-CRP [mg/L]	2.28±0.20	1.86±0.14	3.69±0.79	1.91±0.44	0.033	ns	0.021	0.003
Тиоли [μmol/L]	435±12.42	497±9.48	440±19.35	481±23.68	ns	ns	<0.0001	0.076
Прием на високоалкохолни напитки								
	НА (T0), n=37	НА (T1), n=37	А (T0), n=13	А (T1), n=13	p ^a (T0)	p ^b (T1)	p ^c НА	p ^c А
Хол общ [mmol/L]	5.52±0.15	5.32±0.78	5.72±0.25	5.87±0.30	ns	0.054	0.059	ns
ТАГ [mmol/L]	1.09±0.09	1.10±0.08	1.09±0.13	1.26±0.23	ns	ns	ns	ns
LDL-хол [mmol/L]	2.62±0.10	2.52±0.07	2.66±0.11	2.78±0.14	ns	ns	ns	ns
HDL-хол [mmol/L]	1.63±0.05	1.55±0.65	1.69±0.13	1.68±0.13	ns	ns	ns	ns
МДА [μmol/L]	3.39±0.32	3.26±0.30	3.18±0.30	3.63±0.45	ns	ns	ns	ns
hs-CRP [mg/L]	2.94±0.41	2.02±0.22	2.25±0.28	1.46±0.14	ns	ns	0.003	0.019
Тиоли [μmol/L]	419±11.28	480±11.26	487±18.11	525±19.87	0.003	0.048	<0.0001	ns

Данните са представени като средна стойност ± SEM. Статистическа значимост *p<0.05; ** p<0.01; ***p<0.001 спрямо базовите стойности измерени преди началото на интервенцията. a – p стойност при сравнение на две независими групи преди интервенцията (T0), Student's t test; b – p стойност при сравнение на две независими групи след интервенцията (T1), Student's t test; c – p стойност при сравняване на променливите преди (T0) и след (T1) интервенцията между субгрупите, Paired-samples t-test.

Легенда: Хол общ (Холестерол общ); ТАГ (триацилглицероли); LDL-хол (LDL холестерол); HDL-хол (HDL холестерол); МДА (малонов диалдехид); hs-CRP (високочувствителен С-реактивен протеин); ns – липса на статистическа значимост; n – брой доброволци; ВФА (висока физическа активност); НФА (ниска физическа активност); НП (непушачи); П (пушачи); НА (неконсумиращи и рядко консумиращи високоалкохолни напитки); А (консумиращи високоалкохолни напитки); ns – липса на статистическа значимост; n – брой доброволци

5.2. Влияние на физическата активност върху ефектите от приема на минерална вода

Разпределението на участниците в зависимост от тяхната физическа активност беше както следва: 26 бяха с ниска физическа активност (НФА) и 24 с висока физическа активност (ВФА). Това разпределение беше направено въз основа на няколко въпроса за самооценка, представени на Фигура 27.



Фигура 27. Разпределение на участниците в зависимост от тяхната физическа активност. В оранжево – групата с висока физическа активност (ВФА, n=24); в синьо – групата с ниска физическа активност (НФА, n=26). В скоби – брой участници според посочената активност по анкета.

Както е видно от Таблица 21, физическата активност като фактор, определящ начина на живот, не доведе до значими разлики в нивата на липидите и МДА между групите в двете времеви точки на изследване, T0 и T1. Освен това, интервенцията с прием на минерална вода не промени значимо изследваните параметри между групите с ниска и висока физическа активност.

От друга страна, статистически значимо понижаване в нивата на hs-CRP бе отчетено след интервенцията и в двете групи. Този ефект бе по-значим в групата с НФА. След интервенцията стойностите на hs-CRP в тази група бяха близки до тези на групата с ВФА (Таблица 21). Въпреки че не бяха открити разлики между групите в нивата на общите тиоли в T0, след интервенцията този маркер бе повишен значимо и в двете групи ($p=0.001$, ВФА и НФА), а също между групите в T1. По-високи нива бяха измерени в групата с ВФА в сравнение с групата с НФА след интервенцията ($p=0.028$).

5.3. Влияние на тютюнопушенето върху ефектите от приема на минерална вода

На база данните от анкетата, половината от участниците (n=25) не са пушили никога цигари. Заедно със 7 непушачи от повече от 5 год. и 1 непушач от по-малко от 5 год. те сформираха групата на непушачите (НП), n=33. Останалите участници (n=17) бяха разпределени в групата на пушачите (П). Дневното количество на изпушваните цигари при пушачи е показано на Фигура 28.



Фигура 28. Разпределение на участниците в зависимост от пристрастеността им към тютюнопушене. В оранжево – група непушачи (НП), n=37; в синьо - група пушачи (П), n=13. Посочен е брой изпушени цигари/ден; В скоби – брой участници според анкета.

Средните нива на общия холестерол и ТАГ бяха статистически значимо по-високи в групата на пушачите в двете времеви точки на изследване (Таблица 21). Интересно е, че средните стойности на LDL-холестерола бяха значимо по-ниски в същата група, в сравнение с група НП: $p=0.018$ (T0) и $p=0.043$ (T1). HDL-холестеролът остана без промени, както между групите, така и в групите след интервенцията.

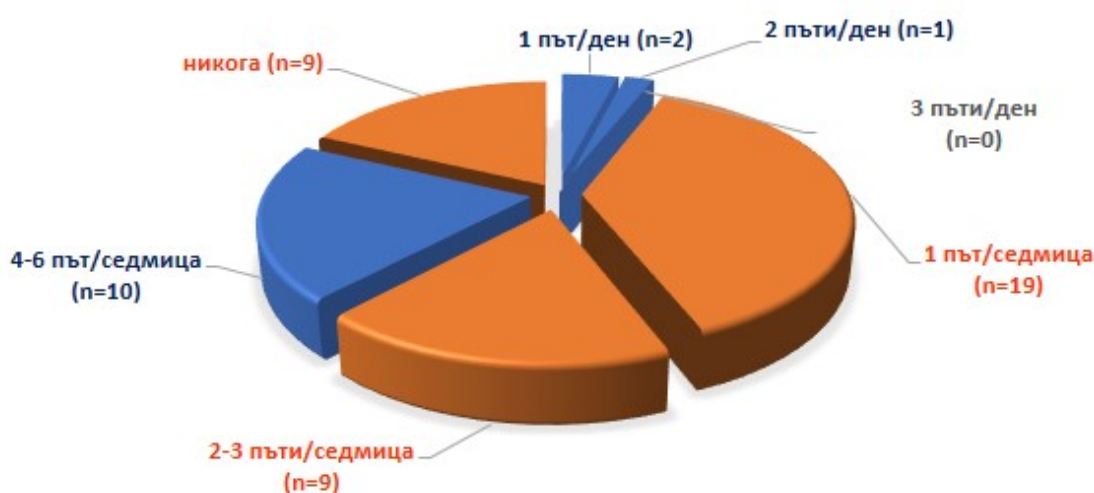
Както се очакваше, средните нива на МДА бяха по-високи при пушачи, отколкото при непушачи, както в T0, така и в T1. След интервенцията нивата на МДА се понижиха при непушачи и се повишиха при пушачи, но тези промени не бяха статистически значими (Таблица 21).

Много интересен резултат е получен по отношение на hs-CRP. Преди интервенцията средните нива на маркера при пушачи бе значимо по-висок, в сравнение с група НП ($p=0.033$). След интервенцията бе установено значимо понижение в двете групи, но ефектът е по-значим при пушачи. Така, в T1 нивата на hs-CRP бяха почти равни между групите.

Не отчетохме разлики в нивата на общите тиоли между групите в Т1 и Т0. След интервенцията техните концентрации в плазма се повишиха значимо единствено в група НП ($p < 0.0001$).

5.4. Влияние на алкохолната консумация върху ефектите от приема на минерална вода

Групата на неконсумиращи и рядко консумиращи алкохол (НА) включва 37 участници, а останалите 13 формират групата на често консумиращи алкохол (А). Групите бяха формирани въз основа на честотата на прием на високоалкохолни напитки, Фигура 29.



Фигура 29. Разпределение на участниците в зависимост от консумацията на високоалкохолни напитки. В оранжево – група неконсумиращи алкохол (НА), $n=37$; в синьо - група консумиращи алкохол (А), $n=13$. Посочен е броят на консумациите; В скоби – брой участници според анкета.

Според резултатите в Таблица 21, консумацията на високоалкохолни напитки (ВАН) не повлиява липидния профил с изключение на леко, статистически незначимо повишение на нивата на общия холестерол след интервенцията в двете групи.

Не бяха установени значими разлики в нивата на hs-CRP между двете групи, нито в Т0, нито в Т1 (Таблица 21). След интервенцията с прием на минерална вода, обаче, този маркер бе понижен в Т1 за двете групи: $p=0.003$ за групата на НА; $p=0.019$ за група А.

Базовите нива на общите тиоли бяха значимо по-високи в група А, в сравнение с група НА ($p=0.003$). След интервенцията само в група НА бяха идентифицирани значими повишения в плазмените нива на общите тиоли. По този начин в Т1 разликата между групите изчезна.

5.5. Дискусия

Целта на проучването бе да се изследва дали някои фактори, свързани с начина на живот, ще повлияят върху отговора на организма спрямо 8-седмичен прием на ССМВ. Нашата хипотеза, че навиците биха повлияли оздравителните ефекти на минералната вода, бе базирана на факта, че успешният контрол на много болести зависи от начина на живот и това е важно не само в превенцията, но и за успешната терапия (de Lemos et al., 2012; Dean and Söderlund, 2015).

В настоящото проучване базовите нива на маркери от липидния профил, някои про-възпалителни маркери, както и маркери за оксидативен статус, бяха статистически значимо по-ниски в групите, чиито навици определят начина им на живот като здравословен (подгрупи с нормално телесно тегло, регулярна физическа активност, непушачи, неконсумиращи, или рядко консумиращи алкохол).

Разликите в маркерите от липидния профил бяха по-ясно изразени между групите, разделени в зависимост от ИТМ. Значимо по-високи бяха базовите средни нива на общия холестерол, LDL-хол и ТАГ в групата с наднормено тегло $ИТМ \geq 25$ преди интервенция (T0), в сравнение с групата с $ИТМ < 25$ (Таблица 21). Подобни бяха резултатите за маркера за липидно окисление – МДА, както и за про-възпалителния маркер hs-CRP. Тези резултати не бяха изнедаващи. Храненето е един от най-важните фактори от начина на живот, директно повлияващ човешкото здраве (Gorski and Roberto, 2015). Вредните хранителни навици се асоциират със затлъстяването, което в наши дни е един от най-сериозните здравословни проблеми в световен мащаб (Mozaffarian et al., 2011). Излишъкът от мастна тъкан корелира с дислипидемия, повишени нива на про-възпалителни цитокини, а също и с драстично променен редокс статус (Fernández-Sánchez et al. 2011; Marseglia et al., 2014). В настоящото проучване 6 участници бяха със затлъстяване според критериите на СЗО ($ИТМ \geq 30$), а за 24 изчисления ИТМ бе в границите 25 - 29,9 $кг/м^2$, което се определя като пред-обезидно състояние (с наднормено тегло) (WHO). Въпреки че не е толкова сериозно като затлъстяването, пред-обезидно състояние се възприема за прогностичен фактор за бъдещо развитие на хронични патологични състояния (Hou et al., 2008).

Анализирайки промените, настъпили в нивата на изследваните маркери след интервенцията, установихме, че липидният профил е частично подобрен в групата с наднормено тегло. Това се проявява чрез значително намаляване в нивата на LDL-хол ($p = 0,04$) и леко, макар и не значително намаляване в нивата на общия холестерол ($p = 0,055$).

След интервенцията значимо намаление в нивата на про-възпалителния маркер hs-CRP и повишение в концентрацията на общите тиоли бяха открити при всички участници, независимо от ИТМ. Предполагаме, че активните вещества, разтворени в ССМВ може би са причина за подобрения противовъзпалителен и редокс статус. На този етап можем да предположим, че подобреният редокс статус след приема на минерална вода вероятно е причина за подобрения липиден профил. Поради техния специфичен метаболизъм и продължителността на живот, LDL липопротеиновите частици са много чувствителни към окислителите в кръвта и са с ключова роля в развитието на атерогенеза и сърдечно-съдовата патология.

Използваната в проучването минерална вода от Варненски басейн е със слаба минерализация и сложен химичен състав – хидрогенкарбонатна, магнезиево, калциево, силициева със съдържание на сероводород и разтворени сулфиди (Караколев, 1990; Владева и Костадинов, 1996, 2007; Sokrateva, 2018). Минерални води с подобен състав проявяват антиоксидантни, противовъзпалителни, кардиопротективни, свойства (Carbajo and Maraver, 2017).

Физическата активност бе друг жизнен фактор във фокуса на нашето изследване. Редовната физическа активност се счита за полезен навик, свързан с намален риск от метаболитни и сърдечносъдови заболявания (Pérez-Martínez et al., 2017). Както се вижда от Таблица 21, не бяха установени значими разлики в базовите нива на маркерите от липиден профил и МДА между групите с ВФА и с НФА. Също така, интервенцията не доведе до съществени промени в техните нива. От друга страна, базовите нива на hs-CRP в плазма бяха значимо по-високи в група с НФА, в сравнение с участниците с ВФА ($p=0.022$). Тези резултати са в унисон с други проучвания, в които се докладва, че концентрацията на плазмения hs-CRP и физическата активност, като жизнен фактор, са в обратна взаимовръзка (Kasapis and Thompson, 2005; Hamer and Stamatakis, 2009). Интригуващо, след интервенцията с прием на ССМВ нивата на hs-CRP бяха подчертано понижени, нещо повече, статистическата разлика между групите, установена в T0 се загуби.

Не бяха установени разлики в базовите нива на общите тиоли между групите с НФА и ВФА. Въпреки че след интервенцията плазмените концентрации бяха значимо повишени при всички участници, в групата с ВФА стойностите бяха статистически значимо по-високи ($p=0.028$). Тези различия в ефектите на ССМВ биха могли да се обяснят с предположението, че участниците, които са физически активни имат по-добър редокс статус. Дълготрайните ефекти от физическата активност са асоциирани с подобрена антиоксидантна защита и

логично по-ниски нива на про-възпалителните цитокини (Kasapis and Thompson , 2005; Simioni, et al., 2018).

Тютюнопушенето се счита за рисков навик, който влияе негативно върху цялостното здравословно състояние (Hamer et al., 2019; Fiorito et al., 2019). Сравнявайки липидно-профилните маркери между групите на пушачи и непушачи, в настоящото проучване не бяха открити разлики в базовите стойности на общия холестерол, ТАГ и HDL-хол между двете групи. След интервенцията с прием на ССМВ, намаление в нивата на общия холестерол бе отчетено и в двете групи, но този ефект беше по-ясно изразен в групата на пушачите. Същевременно, повишени нива на ТАГ бяха установени в същата група в Т1. Друг интересен резултат бе по-ниските нива на LDL-хол, както преди, така и след интервенцията ($p=0.018$ и $p=0.043$, респективно) в групата на пушачите, сравнени с нивата на LDL-хол в групата на непушачите. Нивата на LDL-хол, измерени при пушачите в двете времеви точки на изследване могат да бъдат обяснени с факта, че всички участници в това проучване бяха с добър здравен статус, без оплаквания по време на проучването, или с история на някакво предшестващо сърдечносъдово заболяване. От друга страна, повишените нива на ТАГ в Т1 в същата група е резултат най-вероятно породен от обратния ефект на съединенията, съдържащи се в цигарения дим. Има данни, че дори умерено тютюнопушене за кратък период от време води до промени в липидния профил. Например в проучвания, анализиращи влиянието на рисковия начин на живот върху здравето, се съобщава, че нивата на ТАГ, LDL-хол и HDL-хол са неблагоприятно повлияни при пушачи, в сравнение с непушачи (Pérez-Martínez, et al., 2017; Mammas et al., 2003; Jain and Ducatman, 2018).

Отчитайки нивата на МДА, не са наблюдавани разлики между П и НП в началото на проучването. Интервенцията със ССМВ доведе до понижени нива на МДА само в групата на НП и в Т1 разликите в стойностите между двете групи бяха статистически значими ($p=0.004$). Ниската чувствителност на пушачите към антиоксидантния ефект на ССМВ може да се обясни с по-голямата предекспозиция на пушачите на окислителни, съдържащи се в цигарения дим.

Логично, плазмените нива на hs-CRP, като маркер за нискостепенно възпаление преди интервенцията, бяха статистически значимо по-високи при пушачите, в сравнение с непушачите. Въпреки това след интервенцията бе установено значимо понижение в нивата на hs-CRP и в двете групи, но съществени разлики между групите не бяха открити. Най-вероятно, посредством разтворените биологично активни съставки, ССМВ оказва противовъзпалителен ефект (понижава hs-CRP), и този ефект не зависи от променливата тютюнопушене, като жизнен навик.

Интервенцията с прием на ССМВ повишава нивата на общите тиоли и в двете групи, но този ефект е значителен само за група НП. Възможна причина за тази разлика във въздействието на минералната вода може да бъде промененият редокс статус на пушачите. Протеините, богати на сулфхидрилни групи, известни като тиоли, играят централна роля в антиоксидантната защита на организма. От резултатите можем да съдим, че ССМВ е с потенциал да подобрява редокс статуса, благодарение на разтворените в тях активни съединения. Повишените нива на общите тиоли могат да повишат устойчивостта на организма спрямо оксидативни предизвикателства и така да подпомогнат превенцията срещу социално значими заболявания, като метаболитен синдром, атеросклероза и много други. От друга страна, антиоксидантната сила на водата може да не е достатъчна, за да отговори на повишената нужда на пушачите от антиоксиданти (Ayaori, et al., 2000).

Подобно на физическата активност, консумацията на алкохол не променя липидните маркери и липидното окисление. Не бяха открити разлики в нивата hs-CRP между групите консумиращи редовно (А) и неконсумиращи и/или рядко консумиращи високоалкохолни напитки (НА) преди и след интервенцията. В рамките на двете групи, обаче, бяха установени значително намалени нива на маркера след интервенцията. Подобно на предишните анализи, можем да приемем, че и този ефект се дължи на потенциала на ССМВ, въпреки че евентуалният принос на алкохола за получените резултати в група А не трябва да се изключва. Има научни доклади, в които се съобщава, че умерената консумация на алкохол допринася за подобряване на системните маркери на възпалението, включително hs-CRP (Imhof et al., 2001; Wang et al., 2008).

Както може да се види в Таблица 21, базовите нива на общите тиоли за група А са значително по-високи в сравнение с група НА ($p=0.03$). Това е интригуващ резултат, тъй като не е установен за никоя от другите променливи. Може да се предположи, че хората от тази група имат стимулирана антиоксидантната защита. Консумацията на алкохол обикновено се свързва с токсичните му ефекти върху организма поради увеличените РКФ и изчерпването на ендогенните антиоксиданти. Въпреки това в проучване от 2009 г. Chan et al. съобщават, че редовната умерена консумация на алкохол може да допринесе за подобряване на биохимичните маркери и на качеството на живот, според самооценката на участниците в проучването (Chan et al., 2009). След интервенцията общите тиоли се увеличават и в двете групи, но този резултат е значителен само за група А.

5.6. Заключение

Ежедневната консумация на ССМВ от Варненски басейн може да допринесе за по-доброто здравословно състояние на хора с различни навици. Потенциалът на тази вода да подобрява липидния профил бе по-ясно изразен при лица с наднормено тегло. Според нашите резултати тютюнопушенето може да има отрицателно въздействие върху благоприятното въздействие на водата, особено по отношение на липидите и тяхното окисление. Наблюдаваното значимо понижение в нивата на hs-CRP, както и значимото повишаване на общите тиоли след интервенцията във всички анализирани групи разкрива потенциалните противовъзпалителни и антиоксидантни свойства на минералната вода от Варненски басейн, които, изглежда, са независими от навиците, свързани с начина на живот. И, за да свържем тези резултати със здравето, от гледна точка на потребителите, когато говорим за прецизна медицина и персонализирано хранене, трябва да се предвиди не само подходящата за индивида терапия и храна, но и водата в кръстосана връзка с начина на живот, който от своя страна влияе на всички метаболитни процеси.

VII. ИЗВОДИ И ПРИНОСИ

1. Изводи

Физико-химичен анализ на минерална вода

1. Съгласно изследваните физико-химични показатели Варненската минерална вода се категоризира като слабоминерализирана, средно твърда, без отклонения от допустимите норми.
2. Сравнителният анализ на водата от три водоизточника в гр. Варна показва различия по отношение на съдържанието на разтворени сулфиди и свободен H_2S , NH_3 , Na^+ и общ органичен въглерод в по-високи концентрации във водата от обществена чешма „Дом Младост“, и SO_4^{2-} и Fe^{3+} в по-високи концентрации във водоизточник „Аквариум“.
3. Проследено в динамика, бе установено слабо повишаване на рН, понижаване на концентрацията на NH_3 , както и на разтворените сулфиди и H_2S в минералната вода от водоизточник „Аквариум“.

Анкетни проучвания

1. Анкетното проучване сред населението на гр. Варна относно причините и режима на употреба на минералната вода установи:
 - липса на информираност за промените във физикохимичния състав и свойства на водата при съхранението ѝ
 - употреба основно за превенция на заболявания на отделителната, храносмилателната и опорно-двигателната системи.
2. Проучване на ефекта от 8-седмичен прием на минералната вода установи липса на субективни промени в общото физиологично състояние на участниците в интервенцията.

Влияние на приема на минерална вода върху човешкия метаболизъм

Осем-седмичният прием на минерална вода от обществено достъпните чешми на гр. Варна при клинично здрави доброволци установи:

1. Промени в кръвното налягане: значимо понижение в диастолата и тенденция към понижаване в систолата при общата група доброволци, като в подгрупата, пили вода от Аквариума, промяната е по-силно изразена.
2. Подобрене на бъбречната функция, изразено в значимо намалени нива на креатинина в кръвта, увеличени нива на диурезата и на ИГФ в общата група, при значимост на промените само в подгрупа Дом Младост.

3. Повишеният ИГФ и пониженият креатинин, като маркери за подобрена бъбречната функция, не са резултат от повишената диуреза и могат да бъдат отдадени на съставките в минералната вода.
4. Подобрен оксидативен статус, изразен в значимо увеличени серумни нива на тотални тиоли в общата група доброволци, по-ясно изразени в подгрупа Дом Младост, увеличени нива на общия глутатион и на експресията на *GCL* в РВМС в общата група и само в подгрупа Дом Младост.
5. Значимо понижените нива на hs-CRP в кръв в общата група доброволци след интервенцията и само в подгрупа Дом Младост показват противовъзпалително действие на Варненската минералната вода, дължащо се вероятно на съдържанието на сярсъдържащи се съединения. Установената значимо повишена експресия на *sICAM-1* в РВМС при всички участници и само в подгрупа Дом Младост не корелира с повишение на нивата на белтъка в серума, като маркер за про-възпалителен статус.
6. Двумесечният прием на минерална вода от Варненски басейн може да допринесе за доброто здравословно състояние на хора с различни навици, изразено в:
 - подобряване на липидния профил на хора с наднормено тегло чрез намаляване в нивата на LDL-хол и незначимо намаляване на нивата на общия холестерол;
 - повишен противовъзпалителен потенциал изразено в значимо понижение на нивата на hs-CRP в подгрупите с наднормено тегло, ниска физическа активност, пушачи, и по-слабо изразено в групата, приемаща алкохол;
 - подобрен редокс баланс изразен в повишаване нивата на общите тиоли, по-силно изразено в подгрупите със здравословен начин на живот: нормално тегло, непушачи и неприемащи алкохол.

2. Приноси

Приноси с оригинален характер

1. Получени са нови данни, оценяващи съдържанието на биологично активни вещества във Варненската минерална вода. Направено е сравнително проучване на физикохимичния състав на минерални води от обществено достъпни чешми и е извършен мониторинг на промените в състава на минералната вода при лагеруване.
2. Проведено е първо анкетно проучване и е обобщена информация, касаеща употребата на Варненската минерална вода.
3. Получени са първите научни доказателства, че минералната вода от обществените чешми на гр. Варна подобрява бъбречната функция.
4. Получени са научни доказателства, че минералната вода от обществените чешми на гр. Варна има противовъзпалително действие.
5. Доказан е потенциалът на Варненската минерална вода да повишава антиоксидантната защита на организма.
6. Получени са данни за благоприятно влияние на Варненската минерална вода върху кръвното налягане.
7. Благоприятното въздействие на Варненската минерална вода се влияе от начина на живот (тютюнопушене, прием на алкохол и др.)

Приноси с потвърдителен характер

1. Потвърдени са данните в литературата относно физикохимичния състав на сярасъдържащата минерална вода от Варненски басейн.
2. Потвърдено е лечебното влияние на слабоминерализираните сярасъдържащи минерални води върху функциите на бъбреците.
3. Потвърдени са данните от литературата, че сярасъдържащите минерални води имат антиоксидантен и противовъзпалителен потенциал.
4. Получени са потвърдителни данни, че начинът на живот оказва влияние върху метаболитния профил (липиден профил, провъзпалителни маркери и оксидативен статус).

Приноси с приложен характер

1. Генерираните нови научни данни за състава и свойствата на минералните води на гр. Варна като достъпен ресурс за профилактика и лечение на възпалителни и бъбречни заболявания ще допринесат за по-рационално използване на водите и подобряване на здравния статус на населението на региона.

VIII. ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Публикации във връзка с дисертационния труд

1. **Sokrateva T, Ivanova D, Galunska B, Todorova M, Ivanov D, (2018).** Physicochemical analysis of Varna basin mineral water. 18 International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2018, Conference proceedings Vol. 18, Book number 3.1. Water resources. Forest, marine and ocean ecosystems., page 555-564. 10.5593/sgem2018/3.1/S12.072. (Реферирана в Web of Knowledge)
2. Roussev B, **Sokrateva T**, Nashar M, Radanova M, Komosinska-Vassev K, Olczyk P, Potoroko I, Olczyk K and Ivanova D, **(2019)**. Effect of sulfur-containing mineral water on renal function. C R Acad Bulg Sci, 72 (11), 1577-84. DOI:10.7546/CRABS.2019.11.16. (IF 0.321, Q2)
3. **Sokrateva T**, Roussev B, Nashar M, Kiselova-Kaneva Y, Mihaylova G, Todorova M, Pasheva M, Tasinov O, Nazifova-Tasinova N, Vankova D, Ivanova P, Radanova M, Galunska B, Vlaykova T, and Ivanova, D, **(2019)**. Effects of sulfur-containing mineral water intake on oxidative status and markers for inflammation in healthy subjects. Archives of Physiology and Biochemistry <https://doi.org/10.1080/13813455.2019.1638416>. (IF 2.110, Q2)
4. **Sokrateva T**, Nashar M, Salim A, Tatyana V, Ivanova D, **(2019)**. Health effects of sulfurous mineral water may vary depending on lifestyle. J of IMAB. 2019 Oct-Dec;25(4), p 2828-37. <https://doi.org/10.5272/jimab.2019254.2828>, (IF 0.230, Q4)

Участия в научни форуми във връзка с дисертационния труд

1. **Sokrateva T**, Roussev B, Nashar M, Vlaykova T, Ivanova D, **(2019)**. The impact of Varna basin mineral water intake on blood pressure in healthy volunteers. 16th NuGOweek 9-12 September, Agroscope, Bern, Switzerland; From Foodomics to Nutrigenomics: Translating food composition data into healthy diets, Book of abstracts, page 72.
2. **Sokrateva T**, Nashar M, Kiselova-Kaneva Y, Ivanova D, **(2019)**. Sulfurous mineral water as a potential donor of H₂S with implications to human health. 21 st ISANH Redox Congress & 4th ISANH Middle East world congress Redox, Waste, Microbiota. Sultan Qaboos Iniversity 4-5 March, 2019-Muscat, Oman. Abstracts book, page 51.
3. Русев Б, **Сократева Т**, Нашар М, Раданова М, Иванова Д, **(2019)**. Влияние на сяра-съдържащите минерални води от Варненски басейн върху функцията на бъбреците и възпалението. VI Национална научна среща по биохимия на Асоциация на биохимичните катедри в България, 1 – 3 ноември 2019 г., Спа Хотел Терма, с. Ягода, Стара Загора.
4. **Sokrateva T**, Radanova M, Nashar M, Todorova M, Roussev B, Galunska, B, Ivanova D, **(2018)**. Effect of sulfur-containing mineral water intake on blood oxidative status in healthy subjects. 15th NuGOweek Mitochondria, Nutrition and Health, 3-6 September 2018 International Centre for Life, Newcastle upon Tyne, UK; Book of Abstract, page 72.
5. **Sokrateva T**, Nachar M, Radanova M, Hadjiev B, Ivanova D, **(2018)**. Effects of sulphur-containing mineral water on classical biochemical markers in human interventional study. Selected abstract from the 3rd European Summer School on Nutrigenomics “Modeluation of the epigenome

by nutrition and xenobiotics during early life and across the life span: the key role of life style”, 25-26 June, Jesi, Italy, page 14.

6. **Sokrateva T**, Nashar M, Ivanova D, (2017). Research on the molecular mechanisms of sulfur-containing mineral waters from the varna basin on human metabolism in regards to their usage as a drinking remedy. NuGO Week, Molecular nutrition – Understanding how food influences health, Varna 28-31 august, 2017, Book of Abstracts, Scripta Scientifica Pharmaceutica, Vol. 4, 2017, suppl. 1, p.47.

IX. ИЗПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА

1. Беленький, С.М., Г.П. Лаврешкина, Т.Н. Дульнева, (1982). Минеральные воды, Под общ. ред. Беленького С.М. — издание: 1982, Москва: *Лег и пищ*, 144 с.
2. Владева, Л., и Д. Костадинов. Български питейни минерални води 1 част, С.: ИК М-8-М, (1996). с.175 (Bg).
3. Владева, Л., и Д. Костадинов. Български питейни минерални води 2 част, С.: М-8-М, (2007). с.93 (Bg).
4. Владева, Л., М. Бошев, (2011). Минералните води на България. Наука Диететика, 4:12-15 (Bg).
5. Директива 2009/54/ЕО на Европейския парламент и на Съвета от 18 юни 2009 година относно експлоатацията и предлагането на пазара на натурални минерални води.
6. Едрева, В., (2005). Минерални води и балнеотуризм в България, КРАС 2-ро изд. с.159 (Bg).
7. Закон за водите 2015 г., Приложение № 2 към чл.14, т.2.
8. Караколев, Д. Лечебен справочник за българските минерални води. С.: Медицина и физкултура, (1990). 119 с.
9. Кънева, М., И. Игнатов, С. Козлуджова и Г. Костов, (2011). Характеристика на бутилираните води в България, Част 1. Храни и наука, Хранително-вкусова промишленост, 11-12 (12): 46-9 (Bg).
10. Кънева, М., Игнатов, И., Козлуджова, С., Костов, Г., (2011). Характеристика на бутилираните води в България. Част 2. Съдържание на катиони и аниони. Храни и наука, Хранително-вкусова промишленост, 1/13, стр.43-48.
11. „Как да опазим бъбреците от камъни“, интервю с проф. Петър Панчев (2015). [Internet], [видяно 25 ноември 2019], Свободен достъп: <https://trud.bg/article-4767560>.
12. „Камъни в бъбреците, пясък в бъбреците“ (уролитиаза, нефролитиаза), [Internet], [видяно 25 ноември 2019], Свободен достъп: <https://urologist.bg>.
13. „Нулев Отпадък София“ (2019). [Internet], [видяно 21 ноември 2019], Свободен достъп: <http://zerowastesofia.com/>.
14. Наредба № 1 на МЗ от 22 януари 2018 г. за физиологичните норми за хранене на населението.
15. Наредба № 14 за курортните ресурси, курортните местности и курортите, обнародвана на 10 август, 2004 г. Издадена от министъра на народното здраве и социалните грижи.
16. Наредба №9 от 16.03.2001 г. за качеството на водата, предназначена за питейно-битови цели. Издадена от министъра на здравеопазването, министъра на регионалното развитие и благоустройството и министъра на околната среда и водите.
17. Наредба за изискванията към бутилираните натурални минерални, изворни и трапезни води, предназначени за питейни цели, в сила от 03.08.2004 г. Приета с ПМС № 178 от 23.07.2004.
18. Национална стратегия за управление и развитие на водния сектор, (2012). [Internet], достъп: https://mi.government.bg/files/useruploads/files/vop/vodnastrqtegia_29_3_2012.pdf.
19. Паскалева, С., (2003). Минерални води, SPA и балнеотуризм в България, С.:Крас Плюс ООД, с. 120.

20. Петрова, С., и Д. Костадинов, (2008). „Слабо минерализираните води могат да се консумират непрекъснато, твърдят експерти“. [Internet], [видяно 10 ноември 2019], Електронен достъп: <https://www.regal.bg>.
21. План за управление на водите в Черноморския басейнов район, Раздел 1 - Общо описание на характеристиките на района за басейново управление. Басейнова дирекция за черноморски район с център Варна. [Internet], [видяно 14 август 2019] Електронен достъп: www.bsbd.org/UserFiles/File/RAZDEL_1.pdf.
22. Програма за опазване на околната среда на Община Варна 2019–2023 г., март 2019 г. [Internet], [видяно 10 септември 2019]. Електронен достъп: <https://varnacouncil.bg/wp-content/uploads/2017/01/Proekt-Program-OOS-Varna.pdf>.
23. Регистър на издадените от МЗ балнеологични оценки за минерални води актуален към 26.07.2019 г. [Internet], [видяно 20 август 2019] Електронен достъп: <http://www.mh.government.bg/bg/administrativni-uslugi/registri/registr-na-izdadenite-ot-mz-balneologichni-ocenki-za-mineralni-v/>.
24. Регистър на издадените от МЗ сертификати за минерални води. [Internet], [видяно 19 август 2019] Електронен достъп: <http://www.mh.government.bg/bg/administrativni-uslugi/registri/registr-na-izdadenite-sertifikati-za-mineralna-voda/>.
25. Регистър на съоръженията за минерални води – публична държавна собственост в БДЧР-Варна. [Internet], [видяно 19 август 2019, 10.45] Електронен достъп: <https://www.bsbd.org/bg/register.html>.
26. Стоянова, Л. Лечебните минерални води в България, С.: Здраве и щастие, (2012). 88 с. (Bg).
27. „Best Practices: Zero Waste Sofia“, (2019) [Internet]. [viewed 21 November 2019], Available from: <http://refillambassadors.com/best-practices-zero-waste-sofia/>.
28. „Blue Planet II“, (2018) [Internet]. [viewed 22 November 2019], Available from: <https://www.bbcearth.com/modal/newsletter/>.
29. „Refill your water bottle. Anywhere, anytime“. [Internet]. [viewed 21 November 2019], Available from: <http://refillambassadors.com/public-drinking-fountains/>
30. Abe, K. & H. Kimura, (1996). The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J Neurosci*, 16 (3): 1066-71.
31. Albertini, M., L. Teodori, A. Accorsi, A. Soukri, L. Campanella, F. Baldoni, M. Dachà, (2008). Sulphurous mineral water oral therapy: effects on erythrocyte metabolism. *Food Chem Toxicol*, 46(10):3343-50.
32. Albertini, M., M. Dachà, L. Teodori and M. Conti, (2007). Drinking mineral waters: biochemical effects and health implications – the state-of-the-art. *Int J Environmental Health*, 1 (1): 153-69.
33. Altaany, Z., Y. Ju, G. Yang, R. Wang, (2014). The coordination of S-sulfhydration, S-nitrosylation, and phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase by hydrogen sulfide. *Sci Signal*, 7 (342):ra87. doi: 10.1126/scisignal.2005478.
34. Altman, N., (2000). Healing springs: the ultimate guide to taking the waters - from hidden springs to the world's greatest spas. Rochester:Vt. *Healing Arts Press*, p.320.
35. Ang, S.F., S.M. Moochhala, P.A. MacAry, M. Bhatia, (2011). Hydrogen sulfide and neurogenic inflammation in polymicrobial sepsis: involvement of substance P and ERK-NF-kappaB signaling. *PLoS One*, 6 (9): e24535.

36. Annegret, F., and F. Thomas, **(2013)**. Long-term benefits of radon spa therapy in rheumatic diseases: Results of the randomised, multi-centre IMuRa trial. *Rheumatol Int*, 33 (11): 2839-50.
37. Anti, M., M.E. Lippi, L. Santarelli, M. Gabrielli, A. Gasbarrini, G. Gasbarrini, **(2004)**. Effects of mineral-water supplementation on gastric emptying of solids in patients with functional dyspepsia assessed with the ¹³C-octanoic-acid breath test. *Hepatogastroenterology*, 51(60):1856-9.
38. Aslami, H., W.P. Pulskens, M.T. Kuipers, et al., **(2013)**. Hydrogen sulfide donor NaHS reduces organ injury in a rat model of pneumococcal pneumosepsis, associated with improved bioenergetic status. *PLoS One* 201; 8: e63497;
39. Aslanabadi, N., Asl. B. Habibi, B. Bakhshalizadeh, F. Ghaderi, M. Nemati, **(2014)**. Hypolipidemic activity of a natural mineral water rich in calcium, magnesium, and bicarbonate in hyperlipidemic adults. *Adv Pharm Bull*, 4 (3):303-7.
40. Atanassova, S.S. & P.K. Panchev, **(2013)**. Kidney stones in a southeast European population from Bulgaria. *Clin Chem Lab Med*, 51 (10):e227-9.
41. Ayaori, M., T. Hisada, M. Suzukawa, H. Yoshida, H. Yoshida, M. Nishiwaki, et al., **(2000)**. Plasma levels and redox status of ascorbic acid and levels of lipid peroxidation products in active and passive smokers. *Environ Health Perspect*, 108 (2):105–8.
42. Bastos, P., J.R. Araújo, I. Azevedo, M.J. Martins, L. Ribeiro, **(2014)**. Effect of a natural mineral-rich water on catechol-O-methyltransferase function. *Magnes Res*, 27 (3): 131-41.
43. Bazhanov, N., M. Ansar, T. Ivanciuc, R. Garofalo, A. Casola, **(2017)**. Hydrogen sulfide: a novel player in airway development, pathophysiology of respiratory diseases, and antiviral defenses. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 57 (4): 403-10.
44. Beltowski J., **(2015)**. Hydrogen sulfide in pharmacology and medicine-An update. *Pharmacol Rep*, 67 (3): 647-58.
45. Benavides, G., G. Squadrito, R. Mills, H.D. Patel, T.S. Isbell, R.P. Patel, V.M. Darley-Usmar, J.E. Doeller, D.W. Kraus, **(2007)**. Hydrogen sulfide mediates the vasoactivity of garlic. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104 (46): 17977-82.
46. Benderev, A., V. Hristov, K. Bojadjieva, and B. Mihailova, **(2016)**. Thermal waters in Bulgaria. P. Papić (ed.), Mineral and Thermal Waters of Southeastern Europe. *Environmental Earth Sciences*, doi: 10.1007/978-3-319-25379-4_3: 47-64.
47. Benedetti, F., S. Curreli, S. Krishnan, S. Davinelli, F. Cocchi, G. Scapagnini, R. Gallo, D. Zella, **(2017)**. Anti-inflammatory effects of H₂S during acute bacterial infection: a review. *J Transl Med*, 15:100. doi: 10.1186/s12967-017-1206-8.
48. Benedetti, S., C. Canino, G. Tonti et al., **(2010)**. Biomarkers of oxidation, inflammation and cartilage degradation in osteoarthritis patients undergoing sulfur-based spa therapies. *Clin Biochem*, 43 (12): 973-8.
49. Benedetti, S., F. Benvenuti, G. Nappi, N.A. Fortunati et al., **(2009)**. Antioxidative effects of sulfurous mineral water: protection against lipid and protein oxidation. *Eur J Clin Nutr*, 63(1): 106-12.
50. Benedetti, S., S. Pagliari, F. Benvenuti, et al., **(2007)**. Antioxidative effects of sulphurous water from Macerata Feltria Thermal resort in patients with osteoarthritis. *Progress in Nutrition*, 9(1):46-52.

51. Bertoni, M., F. Oliveri, M. Manghetti, E. Boccolini, M.G. Bellomini, C. Blandizzi, F. Bonino, M. Del Tacca, **(2002)**. Effects of a bicarbonatealkaline mineral water on gastric functions and functional dyspepsia: a preclinical and clinical study. *Pharmacol. Res*, 46 (6): 525-31.
52. Bhatia, M., J. Sidhapuriwala, S.M. Mochhala, P.K. Moore, **(2005)**. Hydrogen sulphide is a mediator of carrageenan-induced hindpaw oedema in the rat. *Br J Pharmacol*, 145 (2): 141- 4.
53. Bohmer, H., H. Müller, K.L. Resch, **(2000)**. Calcium supplementation with calcium-rich mineral waters: a systematic review and meta-analysis of its bioavailability. *Osteoporos Int*, 11 (11): 938-43.
54. Bortolotti, M., E. Turba, C. Mari, C. Lopilato, G. Porrazzo, A. Scalabrino, M. Miglioli, **(1999)**. Changes caused by mineral water on gastrointestinal motility in patients with chronic idiopathic dyspepsia. *Minerva Med*, 90(5-6):187-94.
55. Bos, E.M., H. van Goor, J.A. Joles, M. Whiteman, H.G. Leuvenink, **(2014)**. Hydrogen sulfide – physiological properties and therapeutic potential in ischaemia. *Br J Pharmacol*, 172 (6): 1479-93.
56. Bothe, G., A. Coh, A. Auinger, **(2017)**. Efficacy and safety of a natural mineral water rich in magnesium and sulphate for bowel function: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Eur J Nutr*, 56 (2): 491-9.
57. Braga P.C., M. Dal Sasso, M. Culici, A. Spallino, L. Marabini, T. Bianchi, G. Nappi, **(2010)**. Effects of sulphurous water on human neutrophil elastase release. *Ther Adv Respir Dis*, 4 (6):333-40.
58. Braga, P.C., G. Sambataro, M. Dal Sasso, M. Culici, M. Alfieri, G. Nappi, **(2008)**. Antioxidant effect of sulphurous thermal water on human neutrophil bursts: chemiluminescence evaluation. *Respiration*, 75 (2):193-201.
59. Braga, P.C., M.D. Sasso, M. Culici, M. Falchi, A. Spallino, G. Nappi, **(2012)**. Free radical–scavenging activity of sulfurous water investigated by electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy. *Exp Lung Res*, 38 (2): 67-74.
60. Bucci, M., A. Papapetropoulos, V. Vellecco, Z. Zhou, A. Pyriochou, C. Roussos, F. Roviezzo, V. Brancaleone, G. Cirino, **(2010)**. Hydrogen sulfide is an endogenous inhibitor of phosphodiesterase activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 30 (10) :1998-2004.
61. Buckler, K.J., **(2012)**. Effects of exogenous hydrogen sulphide on calcium signalling, background (TASK) K channel activity and mitochondrial function in chemoreceptor cells. *Pflugers Arch*, 463 (5): 743-54.
62. Burckhardt, P., **(2015)**. Calcium revisited, part III: effect of dietary calcium on BMD and fracture risk. *Bonekey Rep*, 4:708.
63. Calabrese, E.J., K.A. Bachmann, A.J. Bailer, P.M. Bolger, J. Borak, L.Cai, et al., **(2007)**. Biological stress response terminology: Integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hormetic dose-response framework. *Toxicol Appl Pharmacol*, 222 (1):122–8.
64. Calomino, F., N. Di Paolo, G. Nicolai, A. Miglio, **(2010)**. Mineral water administration may increase kidney elimination of urea, creatinine and folic acid in a concentration-dependent fashion. *Int J Artif Organs*, 33(5):317-20.
65. Calvert, J., W. Coetzee, D. Lefer, **(2010)**. Novel insights into hydrogen sulfide–mediated cytoprotection. *Antioxid Redox Signal*, 12 (10): 1203-17.
66. Cantalamessa, F., and C. Nasuti, **(2003)**. Hypocholesterolemic activity of calcic and magnesian-sulphate-sulphurous spring mineral water in the rat. *Nutrition Research*, 23 (6): 775-89.

67. Carbajo, J., & F. Maraver, (2017). Sulphurous mineral waters: new applications for health. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2017:8034084. doi: 10.1155/2017/8034084.
68. Carbajo, J.M., J. Ubogui, L.Vela, F. Maraver, (2018). Sulphurous minerals waters and psoriasis. *Medicina Naturista*, 12 (1):60-2.
69. Carubbi, C., E. Masselli, E. Calabrò et al., (2019). Sulphurous thermal water inhalation impacts respiratory metabolic parameters in heavy smokers. *Int J Biometeorol*, 63 (9): 1209-16.
70. Casado, Á., P. Ramos, J. Rodríguez, N. Moreno, P. Gil, (2015). Types and characteristics of drinking water for hydration in the elderly. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 55 (12): 1633-41.
71. Casetta, I., V. Govoni, E. Granieri, (2005). Oxidative stress, antioxidants and neurodegenerative diseases. *Curr Pharm Des*, 11 (16): 2033-52.
72. Castro-Piedras, I. & J. Perez-Zoghbi, (2013). Hydrogen sulphide inhibits Ca²⁺ release through InsP3 receptors and relaxes airway smooth muscle. *J Physiol*, 591(23):5999-6015.
73. Chan, A.M., D. von Mühlen, D. Kritz-Silverstein, E. Barrett-Connor, (2009). Regular alcohol consumption is associated with increasing quality of life and mood in older men and women: the Rancho Bernardo Study. *Maturitas*, 62 (3): 294–300.
74. Chang, J. W., C. S. Kim, S. B. Kim, S.K. Park, J.S. Park, S.K. Lee, (2005). C-reactive protein induces NF-kappaB activation through intracellular calcium and ROS in human mesangial cells. *Nephron Exp Nephrol*, 101(4):e165-72.
75. Chen, D., H. Pan, C. Li, X. Lan, B. Liu, G. Yang, (2011). Effects of hydrogen sulfide on a rat model of sepsis-associated encephalopathy. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 31 (5): 632-636.
76. Cockcroft, D.W. & M.H. Gault, (1976). Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron*, 16 (1): 31-41.
77. Contoli, M., G. Gnesini, G. Forini et al., (2013). Reducing agents decrease the oxidative burst and improve clinical outcomes in COPD patients: a randomized controlled trial on the effects of sulphurous thermal water inhalation. *Sci World J*, 927835. doi: 10.1155/2013/927835.
78. Coruzzi, G., M. Adami, C. Pozzoli, E. Solenghi, D. Grandi, (2010). Functional and histologic assessment of rat gastric mucosa after chronic treatment with sulphurous thermal water. *Pharmacology*, 85 (3): 146-52.
79. Costantino, M., E. Lampa, G. Nappi, (2006). Effectiveness of sulphur spa therapy with politzer in the treatment of rhinogenic deafness. *Acta Otorhinolaryngol Ital*, 26 (1): 7-13.
80. Costantino, M., G. Nappi, E. Contaldi, E. Lampa, (2005). Effectiveness of sulphur spa therapy in psoriasis: Clinical-experimental study. *Medicina Clinica e Termale*, 18 (58): 127-37.
81. Costantino, M., M.G. Marongiu, S. Iannotti, A. Filippelli, (2015). Sulphurous mud-balneotherapy: an possible strategy for the plaque psoriasis. *PARIPEX - Indian Journal Of Research* 4(3):69-74.
82. Costantino, M., V. Izzo, V. Conti, V. Manzo, et al., (2019). Sulphate mineral waters: A medical resource in several disorders. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. Available online, doi: 10.1016/j.jtcme.2019.04.00.
83. Costa-Vieira, D., R. Monteiro, M.J. Martins, (2019). Metabolic Syndrome Features: Is There a Modulation Role by Mineral Water Consumption? *Nutrients*, 11 (5). pii: E1141. doi: 10.3390/nu11051141.
84. Dawson, P.A., A. Elliott, F.G. Bowling, (2015). Sulphate in pregnancy. *Nutrients*, 7 (3): 1594-606.

85. de Lemos, E.T., J. Oliveira, J.P. Pinheiro, F. Reis, **(2012)**. Regular physical exercise as a strategy to improve antioxidant and anti-inflammatory status: benefits in type 2 diabetes mellitus. *Oxid Med Cell Longev*, 10.1155/2012/741545.
86. de Zwart, L.L., J.H. Meerman, J.N. Commandeur, N.P. Vermeulen, **(1999)**. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free radical biol med*, 26 (1–2): 202–26.
87. Dean, E., & A. Söderlund, **(2015)**. What is the role of lifestyle behaviour change associated with non-communicable disease risk in managing musculoskeletal health conditions with special reference to chronic pain? *BMC Musculoskelet Disord*, 16: 87.
88. Dijk, J. E. **(2019)**. [Internet. Lowering the threshold to ask for a refill, [viewed 22 November 2019], Available from: <http://refillambassadors.com/publiek-water/>.
89. Directive 2009/54/EC of the European Parliament and of the council of 18 June 2009 on the exploitation and marketing of natural mineral waters.
90. Dupont, C., A. Campagne, F. Constant, **(2014)**. Efficacy and safety of a magnesium sulfate-rich natural mineral water for patients with functional constipation. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 12 (8) :1280-7.
91. Ecorys SEE, **(2015)**. [Internet]. Analysis of the public consultation on the quality of drinking water. [viewed 22 November 2019], from https://ec.europa.eu/environment/consultations/pdf/analysis_drinking_water.pdf.
92. EFSA (Question N° EFSA-Q-2003-21). Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request of the Commission related to concentration limits for boron and fluoride in natural mineral waters. *The EFSA Journal* **(2005)** 237, 1-8.
93. EFSA (Request N° EFSA-Q-2007-066). Scientific and technical guidance for the preparation and presentation of the application for authorisation of a health claim. Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). *The EFSA Journal* **(2007)** 530, 1-44.
94. EFSA Overview on Tolerable Upper Intake Levels as derived by the Scientific Committee on Food (SCF) and the EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Summary of Tolerable Upper Intake Levels – version 4 (September **2018**).
95. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Calcium and contribution to the normal development of bones: evaluation of a health claim pursuant to Article 14 of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal*. **2016**;14(10):4587.
96. Ekmekcioglu, C., G. Strauss-Blasche, F. Holzer, W. Marktl et al., **(2002)**. Effect of sulfur baths on antioxidative defense systems, peroxide concentrations and lipid levels in patients with degenerative osteoarthritis. *Forsch Komplementarmed Klass Naturheilkd*, 9 (4): 216-20.
97. El-Seweidy, M., N. Sadik, O. Shaker, **(2011)**. Role of sulfurous mineral water and sodium hydrosulfide as potent inhibitors of fibrosis in the heart of diabetic rats. *Arch Biochem Biophys* 506 (1): 48–57.
98. Erickson, B.E., **(2007)**. The therapeutic use of radon: A biomedical treatment in Europe; an “alternative” remedy in the United States. *Dose Response*, 5 (1): 48-62.
99. Eske, J., (2019) [Internet]. What are the health benefits of mineral water? Medically reviewed by K. Marengo LDN, R.D. [viewed 22 November 2019,16:06], Available from: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/324910.php>.

100. Etani, R., T. Kataoka, N. Kanzaki, A. Sakoda, H. Tanaka, Y. Ishimori, et al., **(2016)**. Difference in the action mechanism of radon inhalation and radon hot spring water drinking in suppression of hyperuricemia in mice. *J Radiat Res*, 57 (3): 250–7.
101. Evandri, M.G. & P. Bolle, **(2001)**. Pharmaco-toxicological screening of commercially available Italian natural mineral waters. *Farmaco*, 56 (5-7): 475–82.
102. Feinendegen, L.E., **(2005)**. Evidence for beneficial low level radiation effects and radiation hormesis. *Br J Radiol*, 78 (925): 3-7.
103. Feliars, D., J. H. Lee, B. S. Kasinath, **(2016)**. Hydrogen Sulfide in Renal Physiology and Disease, *Antioxid Redox Signal*, 25(13):720-731.
104. Fernández-Sánchez, A., E. Madrigal-Santillán, M. Bautista, J. Esquivel-Soto, Á. Morales-González, et al., **(2011)**. Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int J Mol Sci*, 12 (5): 3117–32.
105. Fiorito, G., C. McCrory, O. Robinson, C. Carmeli, C.O. Rosales, et al., **(2019)**. Socioeconomic position, lifestyle habits and biomarkers of epigenetic aging: a multi-cohort analysis. *Aging (Albany NY)*, 11 (7): 2045-70.
106. Fraioli, A., G. Menunni, L. Petracchia, M. Fontana, S. Nocchi, M. Grassi, **(2010)**. Sulphate-bicarbonate mineral waters in the treatment of biliary and digestive tract diseases. *Clin Ter*, 161 (2): 163-8.
107. Frank, F. & M. Lisanti, **(2008)**. ICAM-1: role in inflammation and in the regulation of vascular permeability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 295 (3): 926–27.
108. Franke, A., L. Reiner, K. L. Resch, **(2007)**. Long term benefit of radon spa therapy in the rehabilitation of rheumatoid arthritis: A randomised, double-blinded trial. *Rheumatol Int*, 27 (8): 703-13.
109. Fricke, M., **(1993)**. Natural mineral waters, curative-medical waters and their protection. *Env Geol*, 22 (2):153–61.
110. Fu, M., W. Zhang, L. Wu, G. Yang, H. Li, R. Wang, **(2012)**. Hydrogen sulfide (H₂S) metabolism in mitochondria and its regulatory role in energy production. *Proc Natl Acad*, 109 (8): 2943-8.
111. Gálvez Galve, J.J., P.S. Peiró, M.O. Lucas, A.H. Torres, E.S. Gil, M.B. Pérez, **(2012)**. Quality of life and assessment after local application of sulphurous water in the home environment in patients with psoriasis vulgaris: a randomized placebo-controlled pilot study. *Eur J Integr Med*, 4:e213–e218.
112. Gálvez, I., S. Torres-Piles, E. Ortega-Rincón, **(2018)**. Balneotherapy, immune system, and stress response: a hormetic strategy? *Int J Mol Sci*, 19 (6). pii: E1687. doi: 10.3390/ijms19061687.
113. Giuliani, D., A. Ottani, D. Zaffe, M. Galantucci, F. Strinati, et al., **(2013)**. Hydrogen sulfide slows down progression of experimental Alzheimer's disease by targeting multiple pathophysiological mechanisms. *Neurobiol Learn Mem*, 104: 82-91.
114. Gorski, M.T. & C.A. Roberto, **(2015)**. Public health policies to encourage healthy eating habits: recent perspectives. *J Healthc Leadersh* (7): 81–90.
115. Guo, R., J. Lin, W. Xu, N. Shen, L. Mo, C. Zhang, J. Feng, **(2013b)**. Hydrogen sulfide attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity by inhibition of the p38 MAPK pathway in H9c2 cells. *Int J Mol Med*, 31 (3): 644-50.
116. Guo, W., Z.-Y. Cheng, Y.-Z. Zhu, **(2013a)**. Hydrogen sulfide and translational medicine. *Acta Pharmacol Sin*, 34 (10): 1284–91.

117. Gutenbrunner, C., T. Bender, P. Cantista, Z. Karagülle, **(2010)**. A proposal for a worldwide definition of health resort medicine, balneology, medical hydrology and climatology. *Int J Biometeorol*, 54 (5): 495-507.
118. Halksworth, G., L. Moseley, K. Carter, M. Worwood, **(2003)**. Iron absorption from Spatone (a natural mineral water) for prevention of iron deficiency in pregnancy. *Clin Lab Haematol*, 25 (4): 227-31.
119. Hamer, M. & E. Stamatakis, **(2009)**. Physical activity and risk of cardiovascular disease events: inflammatory and metabolic mechanisms. *Med Sci Sports Exerc*, 41 (6): 1206-11.
120. Hamer, M., G. O'Donovan, E. Stamatakis, **(2019)**. Lifestyle risk factors, obesity and infectious disease mortality in the general population: Linkage study of 97,844 adults from England and Scotland. *Prev Med*, 123:65-70.
121. Haouzi, P., **(2016)**. Is exogenous hydrogen sulfide a relevant tool to address physiological questions on hydrogen sulfide? *Respir Physiol Neurobiol*, 229: 5-10.
122. Heil, D.P., **(2010)**. Acid-base balance and hydration status following consumption of mineral-based alkaline bottled water. *J Int Soc Sports Nutr*, 7:29. doi: 10.1186/1550-2783-7-29.
123. Honorio-França, A.C., F.C. De Oliveira, E.L. C.K. França Ferrari, **(2015)**. Antioxidant and hypoglycemic effects of Sulphurous water on alloxan-induced diabetic rats: a preliminary study. *Nutr Clín Diet Hosp*, 35 (1): 50-5.
124. Hou, X., .W Jia, Y. Bao, H. Lu, S. Jiang, et al., **(2008)**. Risk factors for overweight and obesity, and changes in body mass index of Chinese adults in Shanghai. *BMC Public Health*, 8:389. doi: 10.1186/1471-2458-8-389.
125. Hougee, S., A. Sanders, J. Faber, Y.M. Graus, W.B. van den Berg et al. **(2005)**. Decreased pro-inflammatory cytokine production by LPS-stimulated PBMC upon in vitro incubation with the flavonoids apigenin, luteolin or chrysin, due to selective elimination of monocytes/macrophages. *Biochemical Pharmacol*, 69 (2): 241–8.
126. Huang, A., S. Seité, T. Adar, **(2018)**. The use of balneotherapy in dermatology. *Clin Dermatol*, 36 (3): 363-8.
127. Ibuki, Y., A. Hayashi, A. Suzuki, R. Goto, **(1998)**. Low-dose irradiation induces expression of heat shock protein 70 mRNA and thermo- and radio-resistance in myeloid leukemia cell line. *Biol Pharm Bull*, 21 (5): 434-9.
128. Ikarashi, N., T. Mochiduki, A. Takasaki, T. Ushiki, K. Baba, M. Ishii, T. Kudo, K. Ito, T. Toda, W. Ochiai, K., **(2011)**. Sugiyama. A mechanism by which the osmotic laxative magnesium sulphate increases the intestinal aquaporin 3 expression in HT-29 cells. *Life Sci*, 88(3-4):194-200.
129. Imhof, A., M. Froehlich, H. Brenner, H. Boeing, M.B. Pepys, et al., **(2001)**. Effect of alcohol consumption on systemic markers of inflammation. *Lancet*, 357(9258):763-7.
130. Jain, R.B. & A. Ducatman, **(2018)**. Associations between smoking and lipid/lipoprotein concentrations among US adults aged ≥ 20 years. *J Circ Biomark*, 7:1849454418779310.
131. Janský, L., P. Reymanová, J. Kopeckýk, **(2003)**. Dynamics of cytokine production in human peripheral blood mononuclearcells stimulated by LPS or infected by Borrelia. *Physiol Res*, 52 (6): 593-8.
132. Jeong, S.O., H.O. Pae, G.S. Oh, G.S. Jeong, B.S. Lee, S. Lee, Y. Kim du, H.Y. Rhew, K.M. Lee, H.T. Chung, **(2006)**. Hydrogen sulfide potentiates interleukin-1 b -induced nitric oxide production via enhancement of extracellular signal-regulated kinase activation in rat vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 345 (3): 938-44.

133. Jiang, L., P. He, J. Chen, L.Yong, L. Dehui, G. Qin, N. Tan, **(2016)**. Magnesium levels in drinking water and coronary heart disease mortality risk. *Meta-Anal Nutrients*, 8 (1):5.
134. Jin, Z., H. Chan, J. Ning, K. Lu, D. Ma, **(2015)**. The role of hydrogen sulfide in pathologies of the vital organs and its clinical application, *J Physiol Pharmacol*, 66 (2): 169-79.
135. Jokić, A., N. Sremcević, Z. Karagülle, T. Pekmezović, V. Davidović, **(2010)**. Oxidative stress, hemoglobin content, superoxide dismutase and catalase activity influenced by sulphur baths and mud packs in patients with osteoarthritis. *Vojnosanit Pregl*, 67(7):573-8.
136. Karagülle, M.Z., Z.N. Tütüncü, O. Aslan, E. Basak, A. Mutlu, **(1996)**. Effects of thermal sulphur bath cure on adjuvant arthritic rats. *Phys Rehab Kur Med*, 6 (2):53-7.
137. Kasapis, C., & P.D. Thompson, **(2005)**.The effects of physical activity on serum C-reactive protein and inflammatory markers: a systematic review. *J Am Coll Cardiol*, 45 (10): 1563-9.
138. Kida, K., M. Yamada, K. Tokuda, E. Marutani, M. Kakinohana, et al., **(2011)**. Inhaled hydrogen sulfide prevents neurodegeneration and movement disorder in a mouse model of Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal*, 15 (2): 343-52.
139. Kimura, H **(2012)**. Metabolic turnover of hydrogen sulfide. *Front Physiol*. 3:101. doi: 10.3389/fphys.2012.00101.
140. Kimura, Y., & H. Kimura, **(2004)**. Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress. *FASEB J*, 18 (10): 1165-7.
141. Kimura, Y., R. Dargusch, D. Schubert, H. Kimura, **(2006)**. Hydrogen sulfide protects HT22 neuronal cells from oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*, 8 (3-4):661-70.
142. Kimura, Y., Y. Goto, H. Kimura, **(2010)**. Hydrogen sulfide increases glutathione production and suppresses oxidative stress in mitochondria. *Antioxid Redox Signal*, 12 (1): 1–13.
143. King, A.L., D.J. Polhemus, S. Bhushan, H. Otsuka, K. Kondo, C.K. Nicholson et al., **(2014)**. Hydrogen sulfide cytoprotective signaling is endothelial nitric oxide synthase-nitric oxide dependent. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111 (8): 3182-7.
144. Kloesch, B., M. Liszt, D. Krehan, J. Broell, H. Kiener, G. Steiner, **(2012)**. High concentrations of hydrogen sulphide elevate the expression of a series of pro-inflammatory genes in fibroblast-like synoviocytes derived from rheumatoid and osteoarthritis patients. *Immunol Lett*, 141 (2): 197-203.
145. Kolluru, G.K., X. Shen, S.C. Bir, C.G. Kevil, **(2013)**. Hydrogen sulfide chemical biology: pathophysiological roles and detection. *Nitric Oxide*, 35: 5-20.
146. Kovács, C., M. Pecze, Á. Tihanyi, L. Kovács, S. Balogh, T. Bender, **(2012)**. The effect of sulphurous water in patients with osteoarthritis of hand. Double-blind, randomized, controlled follow-up study. *Clin Rheumatol*, 31 (10): 1437-42.
147. Krause, N., H. Kutsche, F. Santangelo, E. DeLeon, N. Dittrich, K. Olson, M. Althaus, **(2016)**. Hydrogen sulfide contributes to hypoxic inhibition of airway transepithelial sodium absorption. *Am J Physiol*, 311:R607– 17. doi: 10.1152/ajpregu.00177.2016.
148. Lee, D. Y., H. Li, H. J. Lim, H.J. Lee, R. Jeon, J.H. Ryu. **(2012)**. Anti-inflammatory activity of sulfur-containing compounds from garlic. *J Med Food*, 15 (11): 992-9.
149. Lee, M., E. McGeer, R. Kodela, K. Kashfi, P.L. McGeer., **(2013)**. NOSH-aspirin (NBS-1120), a novel nitric oxide and hydrogen sulfide releasing hybrid, attenuates neuroinflammation induced by microglial and astrocytic activation: a new candidate for treatment of neurodegenerative disorders. *Glia*, 61 (10): 1724-34.

150. Leibetseder, V., G. Strauss-Blasche, F. Holzer, W. Marktl, C. Ekmekcioglu, **(2004)**. Improving homocysteine levels through balneotherapy: effect of sulphur baths. *Clin Chim Acta*, 343 (1-2):105-11.
151. Lewis, R.J. & G.B. Copley, **(2015)**. Chronic low-level hydrogen sulfide exposure and potential effects on human health: a review of the epidemiological evidence. *Crit Rev Toxicol*, 45 (2) :93-123.
152. Li, L., P. Rose, P. Moore, **(2011)**. Hydrogen sulfide and cell signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 51:169-87.
153. Li, L., P. Rose, P. Moore, **(2011)**. Hydrogen sulfide and cell signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 51: 169-87.
154. Liu, F., D.D. Chen, X. Sun, H.H. Xie, H. Yuan, et al., **(2014)**. Hydrogen sulfide improves wound healing via restoration of endothelial progenitor cell functions and activation of angiopoietin-1 in type 2 diabetes. *Diabetes*, 63 (5) : 1763-1778.
155. Liu, Y.H., C.D. Yan, J.S. Bian, **(2011)**. Hydrogen sulfide: a novel signaling molecule in the vascular system. *J Cardiovasc Pharmacol*, 58 (6): 560-9.
156. Lu, M., F.F. Zhao, J.J. Tang, et al., **(2012)**. The neuroprotection of hydrogen sulfide against MPTP-induced dopaminergic neuron degeneration involves uncoupling protein 2 rather than ATP sensitive potassium channels. *Antioxid RedoxSignal*, 17 (6): 849-59.
157. Mammias, I.N., G.K. Bertias, M. Linardakis, N.E. Tzanakis, D.N. Labadarios, et al., **(2003)**. Cigarette smoking, alcohol consumption, and serum lipid profile among medical students in Greece. *Eur J Public Health*, 13 (3), 278–82.
158. Mani, S., A. Untereiner, L. Wu, R. Wang, **(2014)**. Hydrogen sulfide and the pathogenesis of atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal*, 20 (5): 805-17.
159. Marotta, D., & C. Sica, **(1933)**. Composizione e classificazione delle acque minerali italiane. *Ann Chim Apl*, 23: 245–7.
160. Marseglia, L., S. Manti, G. D'Angelo, A. Nicotera, E. Parisi et al., **(2014)**. Oxidative stress in obesity: a critical component in human diseases. *Int J Mol Sci*, 16 (1): 378-400.
161. Marullo, A.T. & A. Abramo, **(1999)**. Effects of sulphur-arsenic-ferrous water treatment on specific chronic phloglosis of the upper respiratory tract. *Acta Otorhinolaryngol Ital*, 19(4; 61): 5-14.
162. Matsunami, M., S. Kirishi, T. Okui, A. Kawabata, **(2012)**. Hydrogen sulfide-induced colonic mucosal cytoprotection involves T-type calcium channel-dependent neuronal excitation in rats. *J Physiol Pharmacol*, 63 (1): 61-8.
163. Matz, H., E. Orion, R. Wolf, **(2003)**. Balneotherapy in dermatology. *Dermatologic Therapy*, 16 (2):132-40.
164. Maurer, J., M. Cheng, B. Boysen, R. Anderson, **(1990)**. Anderson Two-year carcinogenicity study of sodium fluoride in rats. *J Natl Cancer Inst*, 82 (13): 1118-26.
165. Maurer, J., M. Cheng, B. Boysen, R. Squire, J. Strandberg, S. Weisbrode, J. Seymour, R. Anderson, **(1993)**. Confounded carcinogenicity study of sodium fluoride in CD-1 mice. *Regul Toxicol Pharmacol*, 18 (2): 154-68.
166. Meng, G., Y. Ma, L. Xie, A. Ferro, Y. Ji, **(2015)**. Emerging role of hydrogen sulfide in hypertension and related cardiovascular diseases. *Br J Pharmacol*, 172 (23): 5501–11.
167. Mennuni, G., L. Petraccia, M. Fontana, S. Nocchi, E. Stortini, M. Romoli, E. Esposito, F. Priori, M. Grassi, A. Geraci, A. Serio, A. Fraioli, **(2014)**. The therapeutic activity of sulphate-

- bicarbonate-calcium- magnesium mineral water in the functional disorders of the biliary tract. *Clin Ter*, 165 (5):e346-52. doi: 10.7417/CT.2014.1761.
168. Meunier, P.J., C. Jenvrin, F. Munoz, V. de la Gueronnière, P. Garnero, M. Menz, **(2005)**. Consumption of a high calcium mineral water lowers biochemical indices of bone remodeling in postmenopausal women with low calcium intake. *Osteoporos Int*, 16 (10): 1203-9.
 169. Mishanina, T., M. Libiad, R. Banerjee, **(2015)**. Biogenesis of reactive sulfur species for signaling by hydrogen sulfide oxidation pathways. *Nature Chem Biol*, 11: 457–64.
 170. Modis, K., P. Panopoulos, C. Coletta, A. Papapetropoulos, C. Szabo, **(2013)**. Hydrogen sulfide-mediated stimulation of mitochondrial electron transport involves inhibition of the mitochondrial phosphodiesterase 2A, elevation of cAMP and activation of protein kinase A. *Biochem Pharmacol*, 86 (9):1311-9.
 171. Módis, K., Y. Ju, A. Ahmad, A. Untereiner, Z. Altaany, L.Wu, C. Szabo, R.Wang, **(2016)**. S-Sulfhydration of ATP synthase by hydrogen sulfide stimulates mitochondrial bioenergetics. *Pharmacol Res*. 113:116–24.
 172. Mozaffarian, D., T. Hao, E.B. Rimm, W. Willett, F. B. Hu, **(2011)**. Changes in diet and lifestyle and long-term weight gain in women and men. *N Engl J Med*, 364 (25): 2392–404.
 173. Munaron, L., D. Avanzato, F. Moccia, D. Mancardi, **(2013)**. Hydrogen sulfide as a regulator of calcium channels. *Cell Calcium*, 53 (2): 77-84.
 174. Nagy, K., I. Berhés, T. Kovács, N. Kávási, J. Somlai, T. Bender, **(2009)**. Does balneotherapy with low radon concentration in water influence the endocrine system? A controlled non-randomized pilot study. *Radiat Environ Biophys*, 48 (3): 311-15.
 175. Nasuti, C., R. Gabbianelli, F. Cantalamessa, G. Falcioni, **(2005)**. Erythrocyte plasma membrane perturbations in rats fed a cholesterol-rich diet: effect of drinking sulphurous mineral water. *Ann Nutr Metab*, 49 (1): 9-15.
 176. Neri, M., L. Sansone, L. Pietrasanta, A. Kisialiou, E. Cabano, M. Martini, et al. **(2018)**. Gene and protein expression of CXCR4 in adult and elderly patients with chronic rhinitis, pharyngitis or sinusitis undergoing thermal water nasal inhalations. *Immun Ageing*, 15: 10. doi: 10.1186/s12979-0180114-y.
 177. Ngkelo, A., K. Meja, M. Yeadon, I. Adcock, P.A. Kirkham, **(2012)**. LPS induced inflammatory responses in human peripheral blood mononuclear cells is mediated through NOX4 and Giadependent PI-3kinase signalling. *J Inflamm (Lond)*, 9(1):1. doi: 10.1186/1476-9255-9-1.
 178. Nimni, M., B. Han, F. Cordoba, (2007). Are we getting enough sulfur in our diet? *Nutr Metab (Lond)*, 4 (24) doi:10.1186/1743-7075-4-2.
 179. Nirwan, D. S., R. K. Vyas, S. Jain, **(2017)**. Comparative study of serum urea, creatinine and C-reactive protein level in chronic kidney disease patients with healthy subjects. *IJRMS* 5 (4): 1480-3.
 180. Nunes, S., & B.M. Tamura, **(2012)**. A historical review of mineral water. *Surg Cosmet Dermatol*, 4 (3) :252-8.
 181. Oh, G., H. Pae, B. Lee. B.N. Kim, J.M. Kim, H.R. Kim, S.B. Jeon, W.K. Jeon, H.J. Chae, H.T. Chung, **(2006)**. Hydrogen sulfide inhibits nitric oxide production and nuclear factor-kappa b via heme oxygenase-1 expression in RAW264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *Free Radic Biol Med*, 41 (1): 106-19.
 182. Olas, B., **(2017)**. Hydrogen sulfide as a “double-faced” compound: one with pro- and antioxidant effect. *Adv Clin Chem*, 78:187-196.

183. Olson, K., (2015). Hydrogen sulfide as an oxygen sensor. *Antioxid Redox Signal*, 22 (5): 377–97.
184. Olson, K., E. DeLeon, F. Liu, (2014). Controversies and conundrums in hydrogen sulfide biology. *Nitric Oxide*. *Nitric Oxide*, 41: 11-26.
185. Olson, K., R. Dombkowski, M. Russell, M. Doellman, S. Head, N. Whitfield, J.A. Madden, (2006). Hydrogen sulfide as an oxygen sensor/transducer in vertebrate hypoxic vasoconstriction and hypoxic vasodilation. *J Exp Biol*. 209:4011– 23.
186. Ottaviano, G., G. Marioni, C. Staffieri, L. Giacomelli, R. Marchese-Ragona, A. Bertolin, A. Staffieri, (2011). Effects of sulfurous, salty, bromic, iodine thermal water nasal irrigations in nonallergic chronic rhinosinusitis: a prospective, randomized, double-blind, clinical, and cytological study. *Am J Otolaryngol*, 32 (3): 235-9.
187. Pan, L.L., X.H. Liu, Q.H. Gong, D. Wu, Y.Z. Zhu, (2011). Hydrogen sulfide attenuated tumor necrosis factor- α -induced inflammatory signaling and dysfunction in vascular endothelial cells. *PLoS One*, 6 (5):e19766. doi: 10.1371/journal.pone.0019766.
188. Parcell, S., (2002). Sulfur in human nutrition and applications in medicine. *Altern Med Rev*, 7 (1): 22-44.
189. Paul, B.D., & S.H. Snyder, (2012). H₂S signalling through protein sulfhydration and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13 (8): 499-507.
190. Peale, A. C., 1887. The classification of American mineral waters. *Trans Am Climatol Assoc Meet*, 4: 156–66.
191. Perez-Granados, A.M., S.Navas-Carretero, S. Schoppen, M.P. Vaquero, (2010). Reduction in cardiovascular risk by sodium-bicarbonated mineral water in moderately hypercholesterolemic young adults. *J Nutr Biochem*, 21 (10): 948-53.
192. Pérez-Martínez, P., D.P. Mikhailidis, V.G. Athyros, M. Bullo, P. Couture et al., (2017). Lifestyle recommendations for the prevention and management of metabolic syndrome: an international panel recommendation. *Nutr Rev*, 75 (5): 307-26.
193. Perry, M.M., C.K. Hui, M. Whiteman, M.E. Wood, I. Adcock, P. Kirkham, C. Michaeloudes, K.F. Chung, (2011). Hydrogen sulfide inhibits proliferation and release of IL-8 from human airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 45 (4):746-52.
194. Petracchia, L., G. Liberati, S.G. Masciullo, M. Grassi, A. Fraioli, (2006). Water, mineral waters and health. *Clin Nutr*, 25 (3): 377-85.
195. Polhemus, D., & D. Lefer, (2014). Emergence of hydrogen sulfide as an endogenous gaseous signaling molecule in cardiovascular disease. *Circ Res*, 114 (4):730-7.
196. Pouokam, E., & M. Althaus, (2016). Epithelial electrolyte transport physiology and the gas transmitter hydrogen sulfide. *Oxid Med Cell Longev*; *Oxid Med Cell Longev*: 4723416. doi: 10.1155/2016/4723416.
197. Powell, C.R., K.M. Dillon, J.B. Matson, (2018). A review of hydrogen sulfide (H₂S) donors: chemistry and potential therapeutic applications. *Biochem Pharmacol*, 149: 110-123.
198. Pozsgai, G., R. Benkó, L. Barthó, K. Horváth, E. Pintér, (2015). Thermal spring water drinking attenuates dextran-sulfate-sodium-induced colitis in mice. *Inflammopharmacology*, 23(1):57-64.
199. Prandelli, C., C. Parola, L. Buizza, A. Delbarba, M. Marziano, V. Salvi, V. Zacchi, M. Memo, et al., (2013). Sulphurous thermal water increases the release of the anti-inflammatory cytokine IL-10 and modulates antioxidant enzyme activity. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 26 (3): 633-46.

200. Predmore, B., D. Lefer, G. Gojon, (2012). Hydrogen sulfide in biochemistry and medicine. *Antioxid Redox Signal*, 17 (1): 119–40.
201. Quattrini, S., B. Pampaloni and M. Brandi, (2016). Natural mineral waters: chemical characteristics and health effects. *Clin Cases Miner Bone Metab*, 13 (3):173-80.
202. Rattan, S.I., & D. Demirovic, (2010). Hormesis can and does work in humans. *Dose Response*, 8 (1): 58–63.
203. Roberts, M., Water UK's chief executive [Internet]. (2018). Plastic bottles: Free water refill points rolled out to cut waste, [viewed 20 November 2019], Available from: <https://www.bbc.com/news/uk-england-42808302>.
204. Rodrigues, L., E. Ekundi-Valentim, J. Florenzano, A.R. Cerqueira, A.G. Soares, T.P. Schmidt et al., (2017). Protective effects of exogenous and endogenous hydrogen sulfide in mast cell-mediated pruritus and cutaneous acute inflammation in mice. *Pharmacol Res*, 115: 255-66.
205. Ryu, A., M. Thompson, S. Venkatachalem, C. Pabelick, Y. Prakash, (2009). Effect of Hydrogen Sulfide on [Ca²⁺]_i Regulation in Airway Smooth Muscle. *FASEB J*. 23:622–5.
206. Sadik, N., M. El-Seweidy, O. Shaker, (2011). The Antiapoptotic Effects of Sulphurous Mineral Water and Sodium Hydrosulphide on Diabetic Rat Testes. *Cell Physiol Biochem*, 28 (5): 887-98.
207. Safar, M., & R. Abdelsalam, (2015). H₂S donors attenuate diabetic nephropathy in rats: Modulation of oxidant status and polyol pathway. *Pharmacol Rep*, 67 (1): 17-23.
208. Salami, A., M. Dellepiane, F. Strinati, L. Guastini, R. Mora, (2010). Sulphurous thermal water inhalations in the treatment of chronic rhinosinusitis. *Rhinology*, 48:71–6.
209. Scalabrino, A., G. Buzzelli, and V.C. Raggi, (1998). Clinical-epidemiological study of the efficacy of thermal therapy in gastroenterologic diseases. *Clin Ter*, 149 (2):127-30.
210. Scheidleder, B., F. Holzer, W. Marktl, (2000). Effect of sulfur administration on lipid levels, antioxidant status and peroxide concentration in health resort patient. *Forsch Komplementarmed Klass Naturheilkd*, 7 (2): 75-8.
211. Schoppen, S., A.M. Pérez-Granados, A. Carbajal, B. Sarriá, S. Navas-Carretero, M. Pilar Vaquero, (2008). Sodium-bicarbonated mineral water decreases aldosterone levels without affecting urinary excretion of bone minerals. *Int J Food Sci Nutr*, 59 (4): 347-55.
212. Schoppen, S., A.M. Pérez-Granados, A. Carbajal, P. Oubiña, F.J. Sánchez-Muniz, J.A. Gómez-Gerique, M.P. Vaquero, (2004). A sodium-rich carbonated mineral water reduces cardiovascular risk in postmenopausal women. *J Nutr*, 134 (5): 1058-63.
213. Schoppen, S., A.M. Pérez-Granados, A. Carbajal, Sarriá B, F.J. Sánchez-Muniz, J.A. Gómez-Gerique, M. Pilar Vaquero, (2005). Sodium bicarbonated mineral water decreases postprandial lipaemia in postmenopausal women compared to a low mineral water. *Br J Nutr*, 94 (4): 582-7.
214. Schoppen, S., F.J. Sánchez-Muniz, M. Pérez-Granados, J.A. Gómez-Gerique, B. Sarriá, S. Navas-Carretero, M. Pilar Vaquero (2007). Does bicarbonated mineral water rich in sodium change insulin sensitivity of postmenopausal women? *Nutr Hosp*, 22 (5): 538-44.
215. Sen, N., B. Paul, M. Gadalla, A. Mustafa, T. Sen, R. Xu, S. Kim, S.H. Snyder, (2012). Hydrogen sulfidelinked sulfhydration of NF-κB mediates its antiapoptotic actions, *Mol Cell*. 45(1):13-24.
216. Shen, Y., W. Guo, Z. Wang, Y. Zhang, L. Zhong, Y. Zhu, (2013). Protective effects of hydrogen sulfide in hypoxic human umbilical vein endothelial cells: a possible mitochondriaindependent pathway. *Int J Mol Sci*, 14(7):13093-108;

217. Sheng, J., W. Shim, H. Wei, S.Y. Lim, R. Liew, T.S. Lim et al., **(2013)**. Hydrogen sulphides suppresses human atrial fibroblast proliferation and transformation to myofibroblasts. *J Cell Mol Med*, 17 (10): 1345-54.
218. Shrotriya, S., J.K. Kundu, H.K. Na, Y.J. Surh, **(2010)**. Diallyl trisulfide inhibits phorbol ester-induced tumor promotion, activation of AP-1, and expression of COX-2 in mouse skin by blocking JNK and Akt signalling. *Cancer res*, 70 (5): 1932–40.
219. Shterev, K., & I. Zagorchev, **(1996)**. Mineral waters and hydrogeothermal resources in Bulgaria, *GeoJournal*, 40 (4): 397-403.
220. Simioni, C., G. Zauli, A.M. Martelli, M. Vitale, G. Sacchetti et al., **(2018)**. Oxidative stress: role of physical exercise and antioxidant nutraceuticals in adulthood and aging. *Oncotarget*, 9 (24): 17181-98.
221. Sokrateva, T., D. Ivanova, B. Galunska, M. Todorova, D. Ivanov, **(2018)**. Physicochemical analysis of Varna basin mineral water. *Proc Intern Multidisc Sci.GeoConf. SGEM 18 (3.1)*, 555-64.
222. Soria, M., C. González-Haro, S. Esteva et al., **(2014)**. Effect of sulphurous mineral water in haematological and biochemical markers of muscle damage after an endurance exercise in well-trained athletes. *J Sports Sci*, 32 (10): 954-62.
223. Spassov, S., R. Donus, P. Ihle, H. Engelstaedter, A. Hoetzel, S. Faller, **(2017)**. Hydrogen sulfide prevents formation of reactive oxygen species through PI3K/Akt signaling and limits ventilator-induced lung injury. *Oxid Med Cel Long*. 2017:14. doi: 10.1155/2017/3715037.
224. Sproston, N. R., & J. J. Ashworth, **(2018)**. Role of C-Reactive Protein at Sites of Inflammation and Infection. *Front Immunol*, 9:754. doi: 10.3389/fimmu.2018.00754.
225. Staffieri, A., F. Marino, C. Staffieri, L. Giacomelli, E. D'Alessandro, S. MariaFerraro, et al. **(2008)**. The effects of sulfurous-arsenical-ferruginous thermal water nasal irrigation in wound healing after functional endoscopic sinus surgery for chronic rhinosinusitis: a prospective randomized study. *Am J Otolaryngol*, 29 (4): 223-9.
226. Stein, A., & S. Bailey, **(2013)**. Redox biology of hydrogen sulfide: implications for physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Redox Biol*, 1 (1): 32– 9.
227. Stuveling, E. M., H. L. Hillege, S. J. Bakker, R.O. Gans, P.E. De Jong, D. De Zeeuw, **(2003)**. C-reactive protein is associated with renal function abnormalities in a non-diabetic population. *Kidney Int*, 63 (2): 654-61.
228. Sukenik, S., D. Buskila, L. Neumann, A. Kleiner-Baumgarten, S. Zimlichman, J. Horowitz, **(1990)**. Sulphur bath and mud pack treatment for rheumatoid arthritis at the Dead Sea area. *Ann Rheum Dis*, 49 (2): 99–102.
229. Tamizhselvi, R., Y.H. Koh, J. Sun, H. Zhang, M. Bhatia **(2010)**. Hydrogen sulfide induces ICAM-1 expression and neutrophil adhesion to caerulein-treated pancreatic acinar cells through NF-kb and Scr-family kinase pathway. *Exp Cell Res*, 316 (9): 1625-36.
230. Tang, G., L.Wu, R.Wang, **(2010)**. Interaction of hydrogen sulfide with ion channels. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 37 (7): 753-63.
231. Tometzova, D., 2017. The use of sulfur water of Slovakia for balneotourism. Conference Paper: Mineral waters in the Carpathian basin, 13th international scientific conference, At Sfantu Gheorghe, 25 august, 2017, Romania.
232. Toohey, J., & A. Cooper, **(2014)**. Thiosulfoxide (sulfane) sulfur: new chemistry and new regulatory roles in biology. *Molecules*, 19(8), 12789-813.

233. Toxqui, L. and M.P. Vaquero, 2016. An intervention with mineral water decreases cardiometabolic risk biomarkers. a crossover, randomised, controlled trial with two mineral waters in moderately hypercholesterolaemic adults. *Nutrients*, 8 (7) pii: E400. doi: 10.3390/nu8070400.
234. Toxqui, L., & M.P. Vaquero, (2016). An intervention with mineral water decreases cardiometabolic risk biomarkers. A crossover, randomised, controlled trial with two mineral waters in moderately hypercholesterolaemic adults. *Nutrients*, 8 (7). pii: E400. doi: 10.3390/nu8070400.
235. Toxqui, L., A.M. Pérez-Granados, R. Blanco-Rojo, M.P. Vaquero, (2012). A sodium-bicarbonated mineral water reduces gallbladder emptying and postprandial lipaemia: a randomised four-way crossover study. *Eur J Nutr*, 51 (5): 607-14.
236. Tsuboi, N., Y. Okabayashi, A. Shimizu, T. Yokoo, (2017). The Renal Pathology of Obesity, *Kidney Int Rep*, 2 (2): 251-260.
237. Tucker, K.L., M.T. Hannan, D.P. Kiel, (2001). The acid-base hypothesis: diet and bone in the Framingham Osteoporosis Study. *Eur J Nutr*, 40 (5): 231-7.
238. Tyagi, N., K. S. Moshal, U. Sen, T.P. Vacek, M. Kumar, W.M. Jr Hughes, S. Kundu, S.C. Tyagi, (2009). H₂S protects against methionine-induced oxidative stress in brain endothelial cells. *Antioxid Redox Signal*, 11 (1): 25-33.
239. Uren, J.R., R. Ragin, M. Chaykovsky, (1978). Modulation of cysteine metabolism in mice – effects of propargylglycine and L-cyst(e)ine-degrading enzymes. *Biochem. Pharmacol*, 27 (24): 2807-14.
240. van der Aa, M., (2003). Classification of mineral water types and comparison with drinking water standards. *Env Geol*, 44 (5): 554-63.
241. Varricchio, A., M. Giuliano, M. Capasso, D. Del Gaizo, E. Ascione, A. De Lucia, et al. (2013) Salso-sulphide thermal water in the prevention of recurrent respiratory infections in children. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 26:941–52.
242. Vassileva, S., (1996). Mineral water and spas in Bulgaria. *Clinics in Dermatology*, 14:601-5.
243. Viegas, J., A.F. Esteves, E.M. Cordoso, F.A. Arosa, M. Vitale, L. Taborda-Barata, (2019). Biological effects of thermal water-associated hydrogen sulfide on human airways and associated immune cells: implications for respiratory diseases. *Front Public Health*, 7:128. doi: 10.3389/fpubh.2019.00128.
244. Wallace, J.L., K.L. Flannigan, W. McKnight, L. Wang, J.G. Ferraz, D. Tuitt, (2013). Pro-resolution, protective and anti-nociceptive effects of a cannabis extract in the rat gastrointestinal tract. *J Physiol Pharmacol*, 64 (2): 167-75.
245. Wallace, J.L., & R. Wang (2015). Hydrogen sulfide-based therapeutics: exploiting a unique but ubiquitous gasotransmitter. *Nat Rev Drug Discov*, 14 (5): 329-45.
246. Wallace, J.L., (2007). Hydrogen sulfide-releasing anti-inflammatory drugs. *Trends Pharmacol Sci*, 28 (10): 501-5.
247. Wang, J.J., T.H. Tung, W.H. Yin, C.M. Huang, H.L. Jen et al., (2008). Effects of moderate alcohol consumption on inflammatory biomarkers. *Acta Cardiol*, 63 (1): 65-72.
248. Wang, R., (2002). Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter. *FASEB J*, 16 (13): 1792-8.
249. Wang, T., L. Wang, S.R. Zaidi, S. Sammani, J. Siegler, L. Moreno-Vinasco, B. Mathew, V. Natarajan, J.G. Garcia, (2012). Hydrogen sulfide attenuates particulate matter-induced human

- lung endothelial barrier disruption via combined reactive oxygen species scavenging and Akt activation. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 47 (4): 491-6.
250. Weaver, C.M. (2013). Potassium and Health. *Adv Nutr*, 4 (3): 368-77.
251. Whiteman, M., L. Li, I. Kostetski, S.H. Chu, J.L. Siau, M. Bhatia, P.K. Moore, (2006). Evidence for the formation of a novel nitrosothiol from the gaseous mediators nitric oxide and hydrogen sulphide. *Biochem Biophys Res Commun*, 343(1):303-10.
252. Whiteman, M., N.S. Cheung, Y.Z. Zhu, S.H. Chu, J.L. Siau, B.S. Wong et al., (2005). Hydrogen sulphide: a novel inhibitor of hypochlorous acid-mediated oxidative damage in the brain? *Biochem Biophys Res Commun*; 326 (4): 794-8.
253. WHO. Drinking water guidelines (4th Edition). Chemical fact sheets. Fluoride. WHO, Geneva, 2011.
254. Wu, C., (2013). The role of hydrogen sulphide in lung diseases. *Bioscience Horizons: The International Journal of Student Research*, 6, <https://doi.org/10.1093/biohorizons/hzt009>.
255. Wu, D., N. Luo, L. Wang, Z. Zhao, H. Bu, G. Xu et al., (2017). Hydrogen sulfide ameliorates chronic renal failure in rats by inhibiting apoptosis and inflammation through ROS/MAPK and NF- κ B signaling pathways, *Sci Rep*, 7 (1): 455. doi: 10.1038/s41598-017-00557-2.
256. Wynn, E., E. Raetz, P. Burckhardt, (2009). The composition of mineral waters sourced from Europe and North America in respect to bone health: composition of mineral water optimal for bone. *Br J Nutr*; 101(8):1195-9.
257. Xia, M., L. Chen, R.W. Muh, P.L. Li, N. Li, (2009). Production and actions of hydrogen sulfide, a novel gaseous bioactive substance, in the kidneys. *J Pharmacol Exp Ther*, 329 (3):1056-62.
258. Xie, L., L.F. Hu, X.Q. Teo, C.X. Tiong, V. Tazzari, A. Sparatore et al., (2013). Therapeutic effect of hydrogen sulfide-releasing L-Dopa derivative ACS84 on 6-OHDA-induced Parkinson's disease rat model. *PLoS One*; 8: e60200.
259. Yan, S. K., T. Chang, H. Wang, L. Wu, R. Wang, Q.H. Meng, (2006). Effects of hydrogen sulfide on homocysteine-induced oxidative stress in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 351 (2): 485-91.
260. Yang, G., K. Zhao, Y. Ju, S. Mani, Q. Cao, S. Puukila, N. Khaper, L. Wu, R. Wang, (2013). Hydrogen sulfide protects against cellular senescence via S-sulphydration of Keap1 and activation of Nrf2. *Antioxid Redox Signal*, 18 (15): 1906-19.
261. Yang, G., L. Wu, R. Wang, (2006). Pro-apoptotic effect of endogenous H₂S on human aorta smooth muscle cells. *FASEB J*, 20 (3): 553-5.
262. Yang, G., X. Sun, R. Wang, (2004). Hydrogen sulfide-induced apoptosis of human aorta smooth muscle cells via the activation of mitogen-activated protein kinases and caspase-3. *FASEB J*, 18 (14): 1782-4.
263. Yong, R., & D. G. Searcy, (2001). Sulfide oxidation coupled to ATP synthesis in chicken liver mitochondria. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 129 (1): 129-37.
264. Yuan, S., R.P. Patel, C.G. Kevil, (2015). Working with nitric oxide and hydrogen sulfide in biological systems. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 308 (5): 403-15.
265. Zair, Y., F. Kasbi-Chadli, B. Housez, M. Pichelin, M. Cazaubiel, F. Raoux, K. Ouguerram, (2013). Effect of a high bicarbonate mineral water on fasting and postprandial lipemia in moderately hypercholesterolemic subjects: a pilot study. *Lipids Health Dis*, 12:105. doi: 10.1186/1476-511X-12-105.
266. Zhang, J., S.W. Sio, S. Mochhala, M. Bhatia, (2010). Role of hydrogen sulfide in severe burn injury-induced inflammation in mice. *Mol Med*; 16 (9-10): 417-24.

267. Zhao, W., J. Zhang, Y. Lu, R. Wang, **(2001)**. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. *EMBO J*, 20 (21): 6008–16.
268. Zhao, Y., T.D. Biggs, M.Xian, **(2014)**. Hydrogen sulphide (H₂S) releasing agents: chemistry and biological applications. *Chemical communications*, 50 (80):11788–805.
269. Zoccali, C., C. Catalano, S. Rastelli, **(2009)**. Blood pressure control: hydrogen sulfide, a new gasotransmitter, takes stage. *Nephrol Dial Transplant*, 24 (5): 1394-6.

X. ФИНАНСИРАНЕ

Изследването е извършено благодарение на проект *“Проучване на молекулните механизми на действие на сярсъдържащите минерални води от Варненския басейн върху човешкия метаболизъм с оглед използването им като лечебно-питейно средство”*, Договор №1/12, 16.12.2016 г., финансиран от Фонд научни изследвания – МОН. Конкурс за финансиране на фундаментални научни изследвания, 2016 г., ръководител проф. Диана Иванова, дбн.

Благодарности

Благодаря на всички, които допринесоха за реализирането на този дисертационен труд:

На моя научен ръководител проф. Диана Иванова, дбн, Декан на Факултета по фармация за брилянтната научна идея, за оказаните чест и доверие да бъде мой научен ръководител, за напътствията, съветите и изключително мотивиращото ме научно ръководство.

На гл. ас. Богдан Хаджиев, за това, че сподели с мен опита си при обработката и анализа на резултатите, за спокойствието, което излъчва и за това, че винаги беше до мен.

На доц. Милка Нашар, за всеотдайността и подкрепата при нелеката, но изключително отговорна работа с доброволците, за това, че с отворено сърце споделяше знанията си при подготовката на публикациите.

На проф. Бистра Галунска, за оказаната подкрепа в прецизния подбор на физикохимичните показатели, изследвани в минералната вода.

На доц. Мария Раданова, за помощта при извършване на част от експериментите, за съветите и критичните бележки.

На проф. Влайкова за търпението и идеите при анализа на данните от анкетите, и приятелското отношение.

На доц. Йоана Киселова, ръководител катедра „Биохимия, молекулна медицина и нутригеномика“ и на всички колеги от катедрата за огромната подкрепа при извършването на молекулярно биологичните анализи.

На специалистите – биохимик Стефка Стоева и биолог Марина Даскалова за безрезервната подкрепа и прителско отношение.

На моето семейство, за обичта, разбирането и вярата в мен.

Благодаря!

Приложение 1

АНКЕТНА КАРТА

I. Персонална информация за интервюираното лице

Име, фамилия: _____

Телефон за връзка: _____, e-mail: _____

Дата на раждане: _____

Пол (маркирайте със знака „X“): мъж жена

Възраст (навършени години): _____

Местожителство (град, област): _____

Месторабота: _____

Образование (*оградете или подчертайте*): 1-Висше магистър 2-Висше бакалавър
3-Специалист – полувисше 4-Средно специално 5-Средно професионално-техническо
(СПТУ) 6-Средно гимназиално 7-Професионално техническо 8-Основно 9-Начално

Икономическа заетост (*оградете или подчертайте*): 1-Работещ 2-Безработен
3-Пенсионер 4-Друго (уточнете). _____

Етническа принадлежност (*оградете или подчертайте*): 1-Българска 2-Турска 3-Ромска
4-Друга (уточнете) _____

Юридически семеен статус (*оградете или подчертайте*): 1-Женен/омъжена
2-Неженен/неомъжена 3-Вдовец/вдовица 4-Разведен/а 5-Живеещ/а с партньор без
граждански брак

II. Здравен статус

1. Казано ли Ви е от лекар, че в момента боледувате или в миналото сте боледували от някое от следните хронични заболявания? (оградете или подчертайте)

Диабет /захарна болест/, инсулинозависим	ДА/НЕ
Диабет /захарна болест/, инсулинонезависим	ДА/НЕ
Високо кръвно налягане – хипертония	ДА/НЕ
Мозъчен инсулт/удар/ и други мозъчно-съдови заболявания	ДА/НЕ
Злокачествено заболяване/рак/, включително левкемия	ДА/НЕ
Астма	ДА/НЕ
Хроничен бронхит или емфизем	ДА/НЕ
Артроза/ревматоиден артрит	ДА/НЕ
Продължително състояние на тревожност и депресия	ДА/НЕ
Мигрена и често главоболие	ДА/НЕ
Остеопороза	ДА/НЕ
Бъбречно заболяване	ДА/НЕ
Заболявания на щитовидната жлеза	ДА/НЕ
Заболявания на ГИТ (гастрит, колит, панкреатит)	ДА/НЕ
Автоимунно заболяване	ДА/НЕ
Други хронични заболявания (моля, посочете кои): _____	

2. Имате ли близки родственици (сестра, брат, баща, майка, баба, дядо, брат, сестра на майка и баща) с някое от следните заболявания:

	Заболяване	да	не	родствена връзка	не мога да определя
1	повишено кръвно налягане				
2	диабет				
3	прекарвали мозъчен инсулт				
4	прекарвали сърдечен инфаркт				
5	злокачествено заболяване				

III. Само за жени (оградете или подчертайте)

Вие сте в период на:

1-Бременност 2-Кърмене 3-Менопауза 4-Нито едно от посочените

IV. Навици за прием на вода (оградете или подчертайте)

1. Каква вода обикновено пиете в къщи? (можете да изберете повече от един отговор)

1-От чешмата 2-Филтрирана 3-Минерална (бутилирана), моля уточнете търговската марка: _____ 4-Минералана (директно от водоизточник), моля уточнете от кой: _____

2. Каква вода обикновено пиете, когато сте на работа? (можете да изберете повече от един отговор)

1-От чешмата 2-Филтрирана 3-Минерална (бутилирана), уточнете търговската марка: _____ 4-Минералана (директно от водоизточник), уточнете от кой: _____

3. Пиете ли вода нощем?

1-Никога 2-Не повече от 2 пъти седмично 3-Повече от 3 пъти седмично 4-Поне 1 път всяка нощ 5-Повече от 1 път всяка нощ

4. Какво е количеството на водата, което изпивате на един прием (1 чаша=200 мл)

1-По-малко от 1 чаша 2-Една чаша 3-Една чаша и ½ 4-Две чаши и ½

IV. Прием на напитки – честота и количество

Указания: В таблицата маркирайте със знака „X“ по един отговор в двете колони „Колко често“ и „Какво количество на един прием“:

Вид напитка	КОЛКО ЧЕСТО (маркирайте един отговор)							КАКВО КОЛИЧЕСТВО НА ЕДИН ПРИЕМ (маркирайте един отговор)				
	Никога или по-малко от 1 път седмично	1 път на седмица	2-3 пъти на седмица	4-6 пъти на седмица	1 път на ден	2 и повече пъти на ден	3 и повече пъти на ден	По-малко от 1 чаша	1 чаша	1 и ½ чаши	2 чаши	2 и ½ чаши
Натурален/Прясно изцеден плодов сок												
Натурален/Прясно изцеден зеленчуков сок												
Подсладени сокове от търговската мрежа												
Газирана вода												
Подсладени газирани напитки												
Прясно мляко (пълномаслено)												
Прясно мляко (обезмаслено)												
Билков чай (подсладен)												
Билков чай (без подсладител)												
Черен чай/кафе (подсладен)												
Черен чай/кафе (без подсладител)												
Безалкохолна бира												
Енергийни напитки												
Протеинови шейкове												
Бира												
Вино												
Високо-алкохолни напитки (ракия, водка, уиски и др.)												
Алкохолни коктейли												
Друго (избройте):												

V. Хранителни навици

1. Спазвате ли някой от следните режими на хранене (оградете или подчертайте):

1-Вегетариански 2-Вегански 3-Кетогенен (без захарни и тестени храни, но богат на мазнини и месо) 4-Друг (моля, уточнете) _____

2. Обикновено колко често консумирате следните храни:

Указания: В таблицата маркирайте със знака „X“ по един отговор на всеки ред

Храни и хранителни продукти	Не консумирам	Рядко, не всяка седмица	1 до 3 пъти седмично	Ежедневно или повече от 3 пъти седмично
Пресни (сурови) плодове				
Пресни (сурови) зеленчуци				
Тестени изделия от пълнозърнести брашна – хляб, макарони, бисквити и др.				
Бял хляб и тестени изделия от бяло брашно (баници, кифли, закуски)				
Пълнозърнести храни – овесени ядки, кафяв ориз, елда				
Захарни изделия – сладкиши, вафли, торти, пасти, бонбони				
Сирене, кашкавал				
Кисело мляко				
Сметана				
Риба				
Яйца				
Птичи меса				

Месо (свинско, телешко, агнешко и др.)				
Масло				
Маргарин				
Рафинирано олио				
Зехтин				
Сурови ядки и семена				
Печени ядки и семена				

VI. Прием на лекарства

Приемате ли редовно някои от следните лекарства (*оградете или подчертайте*):

Антидепресанти	ДА/НЕ
Седативи/Барбитурати	ДА/НЕ
Стероидни противовъзпалителни средства (глюко и минералокортикостероиди)	ДА/НЕ
Стероидни хормони (хормон-заместителна терапия)	ДА/НЕ
Тиреоидни хормони	ДА/НЕ
Антикоагуланти	ДА/НЕ
Диуретици	ДА/НЕ
Антихипертензивни средства	ДА/НЕ
Друго (<i>моля, уточнете</i>) _____	

VII. Прием на хранителни добавки (витамини, минерали, микроелементи)

Приемате ли в момента хранителни добавки, съдържащи някои от следните съставки (*оградете или подчертайте*):

Витамини	ДА/НЕ, ако отговаряте с ДА, уточнете какви (мултивитаминен комплекс или отделни витамини, кои): _____
Магнезий (Mg)	ДА/НЕ
Калций (Ca)	ДА/НЕ
Желязо (Fe)	ДА/НЕ
Селен (Se)	ДА/НЕ
Друго (<i>моля, уточнете</i>) _____	

VIII. Навици свързани с начина на живот

1. Физическа активност

1.1 Каква физическа активност се изисква при извършване на служебните ви задължения? (*поставете знака „X“ до избрания отговор*)

Работя предимно в седнало положение и не се налага много движение ____

Физическа работа, но без вдигане или пренасяне на тежки товари, изкачване на стълби, но не често ____

Тежка физическа работа, често изкачване на стълби ____

Много тежка физическа работа, вкл. пренасяне на тежки товари ____

Не мога да преценя ____

1.2. Практикувате ли през свободното си време следните дейности (изключват се периодите на отпуски и ваканции)

Отговаря се на всички въпроси с ДА или НЕ

Активни тренировки, фитнес, аеробика **повече от 4 часа седмично** ____

Бягане, колоездене, плуване или други видове спорт за отмора и забавление **поне 4 часа седмично** ____

Усилена селскостопанска работа или ходене пеша **повече от 4 часа седмично** ____

Ходене пеша или леки физически натоварвания **не повече от 4 часа седмично** ____

Дейности, несвързани с движение – четене на книги, гледане на телевизия ____

2. Други навици (*поставете знака „X“ до избрания отговор*)

2.1. Пушите ли?

Не пуша и не съм пушил/а ____

Не пуша повече от 5 години ____

Не пуша по-малко от 5 години ____

Пуша понякога ____

1-2 цигари дневно ____

Пуша до 10 цигари дневно ____

Пуша от 10 до 20 цигари дневно ____

Пуша над 20 цигари дневно ____

Приложение 2

Конкурс за финансиране на фундаментални научни изследвания – 2016 г.

Проект: Договор ДН01/12, 16.12.2016 г. „Проучване на молекулните механизми на действие на сярасъдържащи минерални води от Варненския басейн върху човешкия метаболизъм с оглед използването им като лечебно-питейно средство“

Бенефициент: Медицински университет „Проф. д-р П. Стоянов“ – Варна

АНКЕТНА КАРТА

за проучване субективните ефекти по време на приема и след приема на минерална вода при доброволци, участници в научното изследване
ID

Целта на анкетата е да проучим мнението Ви дали приемът на минералната вода е довел до промени/ефекти, свързани в общото Ви здравословно състояние и дали е повлияло по някакъв начин на храненето Ви и приема на други напитки. Анкетата ще даде информация и за честотата и количеството на налятата вода, както и за начина на съхранение на минералната вода, което е свързано с динамиката на физикохимичния ѝ състав и съответно ѝ въздействие върху човешкия метаболизъм.

I. Наблюдавани субективни ефекти по време на приема и след приема на минерална вода

1. Може ли да се каже, че приемът на минерална вода Ви е причинил дискомфорт в гастроинтестиналния тракт?

Моля, посочете един отговор.

- Да
- Не
- Не мога да преценя

Ако сте отговорили положително, моля пояснете в какво се състои дискомфортът.

.....
.....

2. Може ли да се каже, че приемът на минерална вода Ви е причинил недобро настроение и/или раздразнителност?

Моля, посочете един отговор.

- Да
 - Не
 - Не мога да преценя
 - Друго
- (моля, посочете)

3. Може ли да се каже, че приемът на минерална вода е причина за смущение в съня Ви?

Моля, посочете един отговор.

- Да
- Не
- Не мога да преценя

4. Свързвате ли приема на минерална вода със зачестило главоболие?

Моля, посочете един отговор.

- Да
- Не
- Не мога да твърдя, че приемът на минерална вода е причина за главоболието ми
- Не мога да преценя

5. Свързвате ли приема на минерална вода с понижаване на кръвното Ви налягане?

Моля, посочете един отговор.

- Да
- Не
- Не мога да твърдя, че приемът на минерална вода е причина за пониженото ми кръвно налягане
- Не мога да преценя

II. Въпроси, свързани с честотата на наливане, начина на съхранение и пиенето на минералната вода

1. Колко често наливахте вода, докато участвахте в интервенцията?

Моля, посочете един отговор.

- Един път на две седмици
 - Един път седмично
 - Един път на три, четири дни
 - Всеки ден
 - Не мога да отговоря с точност
 - Друго
- (моля, посочете)

2. Какво е приблизителното количество минерална вода, което наливахте наведнъж?

Можете да посочите повече от един отговор.

- 1,5 л
 - 3 л
 - 5 л
 - 10 л
 - Друго
- (моля, посочете)

3. В какви съдове наливахте минералната вода?

Можете да посочите повече от един отговор.

- В пластмасови бутилки
 - В стъклени бутилки
 - В бидони
 - Друго
- (моля, посочете)

4. При какви условия съхранявахте налятата минерална вода?

Можете да посочите повече от един отговор.

- В хладилник
 - На студено на терасата
 - При стайна температура
 - Друго
- (моля, посочете)

5. При какви условия и кога започвате да пиете от налятата вода?

Можете да посочите повече от един отговор.

- След като е престояла в бутилките с отворени капачки на терасата едно денонощие
- След като е престояла в бутилките с отворени капачки в стаята за едно денонощие
- След като е изстинала в бутилките, чийто капачки са затворени
- Веднага след наливането
- Друго
(моля, посочете)

6. Знаете ли, че минералната водата се причислява към сярсъдържащите минерални води?

- Да
- Не

7. Известни ли са Ви препоръки и/или заболявания, при които се пие такъв вид вода?

- Да
(моля, посочете)
- Не

8. Считате ли, че изпитата минерална вода е подобрила общото Ви здравословно състояние?

Моля, посочете един отговор.

- Да, определено
- Не
- Не мога да преценя
- Друго.....
(моля, посочете)

Приложение 3

Конкурс за финансиране на фундаментални научни изследвания – 2016 г.

Проект: Договор ДН01/12, 16.12.2016 г. „Проучване на молекулните механизми на действие на сярасъдържащи минерални води от Варненския басейн върху човешкия метаболизъм с оглед използването им като лечебно-питейно средство“

Бенефициент: Медицински университет „Проф. д-р П. Стоянов“ – Варна

АНКЕТНА КАРТА

за проучване мнението на потребителите на минерална вода от обществени чешми на територията на гр. Варна

Целта на анкетното проучване е да установим причините (здравословни, икономически и/или др.), поради които гражданите на гр. Варна наливат минерална вода от обществени водоизточници от една страна, а от друга да проследим честотата на наливане, количеството на еднократното наливане, начинът на съхранение и наблюдаваните ефекти от приема на минерална вода, ако са установени такива.

Попълването на анкетната карта е анонимно.

1. Колко често наливате вода от тази чешма?

Моля, посочете един отговор.

- Един път на две седмици
- Един път седмично
- Един път на три, четири дни
- Всеки ден
- Не мога да отговоря с точност

2. С каква цел наливате водата?

Можете да посочите повече от един отговор.

- За пиене
 - За готвене
 - За къпане
 - Друго
- (моля, посочете)
-

3. Какво е приблизителното количество минерална вода, което наливате наведнъж?

Можете да посочите повече от един отговор.

- 1,5 л
 - 3 л
 - 5 л
 - 10 л
 - Друго
- (моля, посочете)

4. В какви съдове наливате минералната вода?

Можете да посочите повече от един отговор.

- В пластмасови бутилки
 - В стъклени бутилки
 - В бидони
 - Друго
- (моля, посочете)

5. Пиете ли водата?

- Да
- Не

Въпроси в случай, че сте отговорили положително на Въпрос 5.

6. Какво количество от налятата минерална вода изпивате дневно?

Моля, посочете един отговор.

- Една чаша
 - Две чаши
 - Три чаши
 - Четири чаши
 - Пет чаши
 - Друго
- (моля, посочете)

7. При какви условия съхранявате налятата минерална вода?

Можете да посочите повече от един отговор.

- В хладилник
 - На студено на терасата
 - При стайна температура
 - Друго
- (моля, посочете)

8. При какви условия и кога започвате да пиете от налятата вода?

Можете да посочите повече от един отговор.

- След като е престояла в бутилките с отворени капачки на терасата едно денонощие
 - След като е престояла в бутилките с отворени капачки в стаята за едно денонощие
 - След като е изстинала в бутилките, чийто капачки са затворени
 - Веднага след наливането
 - Друго
- (моля, посочете)

9. Знаете ли, че водата, която наливате за пиене се причислява към сярасъдържащите минерални води?

- Да
- Не

10. Известни ли са Ви препоръки и/или заболявания, при които се пие такъв вид вода?

- Да
- (моля, посочете)
- Не

11. Пиете ли водата поради здравословни причини?

- Да
- (моля, посочете)

- Не

12. Считате ли, че изпитата минерална вода от водоизточника подобрява здравословното Ви състояние?

Моля, посочете един отговор.

- Да, определено
- Не
- Не мога да преценя
- Друго.....
(моля, посочете)

13. Назначаван ли Ви е прием на минерална вода от водоизточника от лекар-специалист?

Можете да посочите повече от един отговор.

- Да, в момента изпълнявам такова назначение
- Да, преди години
- Не
- Не знам за такова лечение
- Друго.....
(моля, посочете)

14. Анкетираният налива минерална вода от обществена чешма при

- Аквариума
- Дом Младост