

## 1. Физиология почек и водно-солевого обмена

### The natriuretic response to dopamine DA<sub>1</sub> agonist requires endogenous activation of dopamine DA<sub>2</sub> receptors

Ann-Christine Eklöf

Dept of Woman and Child Health. Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

The kidneys act as an endocrine and paracrine organ. Dopamine produced in the kidney acts as a natriuretic hormone by inhibiting tubular Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase activity. Previous *in vitro* studies have shown that Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase activity in the proximal tubule is inhibited by a synergistic action of dopamine 1 (DA<sub>1</sub>) and dopamine 2 (DA<sub>2</sub>) receptors. This *in vivo* study performed in adult rats, investigates whether the natriuretic response to DA requires a synergistic action of DA<sub>1</sub> and DA<sub>2</sub> receptors. Fenoldopam, a DA<sub>1</sub> agonist significantly increases the sodium excretion but there is no increase in urinary sodium excretion when the DA<sub>1</sub> agonist

is given together with a DA<sub>2</sub> antagonist. Neither DA<sub>1</sub> nor DA<sub>2</sub> antagonist had any influence on the sodium excretion. The natriuretic response to fenoldopam was also significant attenuated after the administration of benserazide, which inhibits aromatic acid decarboxylase and thereby suppresses the endogenous production of dopamine.

The dose used of dopamine and fenoldopam 1.5 µg/kg b.w./Min for both drugs did not affect the mean arterial pressure or the glomerular filtration rate.

In conclusion, the natriuretic effect appears to be constitutively activated by endogenous dopamine.

### Возрастные особенности регуляции функций почек и водно-солевого обмена у детей

Р.И. Айзман

Новосибирский государственный педагогический университет, г. Новосибирск

Обследования детей разного возраста и взрослых (от 2 до 25 лет) в условиях физиологического покоя и с использованием водно-солевых нагрузочных проб (1–2% водные, натриевые (100 мг/кг) и калиевые (50 мг/кг)) позволили выявить некоторые закономерности развития гомеостатических функций почек:

В условиях естественного сбалансированного питания и водопотребления система регуляции водно-электролитного обмена достаточно эффективно обеспечивает поддержание основных гомеостатических констант плазмы крови уже с 2–3 лет, в связи с чем среднестатистические показатели концентрации натрия, калия, осмоляльности не имеют возрастных различий. Наиболее точно во всех возрастных группах регулируется осмоляльность плазмы (коэффициент вариации составляет 1,4–1,7%). Однако диапазон индивидуальных колебаний параметров крови в раннем постнатальном онтогенезе значительно больше (до 16% от средней величины), чем у взрослых (всего 2%). После водно-солевых нагрузок в детском возрасте до 10–11 лет возникают гомеостатические сдвиги в плазме крови, что свидетельствует об ограниченности адаптивных функциональных возможностей почек, тканевых депо и регуляторных механизмов, обеспечивающих стабильность показателей водно-электролитного баланса.

В раннем онтогенезе экскреция жидкости и катионов почками значительно ниже, чем у взрослых, в связи с более низкой клубочковой фильтрацией и канальцевой реабсорбцией. Уровень реабсорбции органических

и неорганических веществ в канальцах лимитируется величиной СКФ, в результате чего отношение реабсорбции на 1 мл фильтрата не имеет возрастных различий. Осмотическое концентрирование в почках достигает дефинитивного уровня к 7–8 годам, а способность к осмотическому разведению – к 2–3 годам. В процессе онтогенеза к 10–11 годам формируется способность почек к селективной экскреции катионов после ионных нагрузок. В подростковом периоде (13–15 лет) снижается калийэкскреторная функция почек, повышается реактивность на натриевые нагрузки и уменьшается селективность почечного ответа на ионные стимулы.

Концентрация альдостерона в крови изменялась с возрастом и в зависимости от вида нагрузки. В условиях покоя титр гормона снижался у обследованных со 147 (в 2 года) до 67 пг/мл (к 25 годам), однако после водных и калиевых нагрузок концентрация гормона возрастала, а после приема натрия – снижалась. Степень концентрационных изменений гормона была выражена в большей степени у подростков и взрослых, чем у детей до 10–11-летнего возраста, что обеспечивало более существенную экскрецию катионов почками юношей по сравнению с детьми.

В целом уровень развития почек соответствует степени созревания других функциональных систем, нейроэндокринных механизмов, чувствительности почек к различным регуляторным факторам, характеру метаболизма, что позволяет поддерживать относительное постоянство гомеостатических констант в условиях

физиологического покоя и избыточного поступления воды и солей в организм.

Совокупность указанных особенностей регуляции гомеостаза калия в процессе индивидуального развития свидетельствует о биологической целесообразности

механизмов поддержания баланса катиона на каждом этапе онтогенеза в нормальных физиологических условиях и низких функциональных резервных возможностях данной системы в детском возрасте.

## Новые представления о механизмах регуляции гомеостаза калия

**Р.И. Айзман**

**Новосибирский государственный педагогический университет, г. Новосибирск**

Гомеостаз калия включает в себя механизмы сохранения содержания катиона в организме, состоящие из поступления калия в организм, всасывания его из пищеварительного тракта и экскреции с мочой и калом (внешний контур); и распределение катиона между внутри- и внеклеточным секторами в отношении 98:2 (внутренний контур). Поскольку в обычных условиях потребление калия с пищей практически не регулируется (нет также сведений о наличии специфического калиевого аппетита), мы исследовали роль пищеварительного тракта, тканевых депо и почек в регуляции баланса калия.

Острые и хронические эксперименты на крысах у онтогенезе позволили установить следующее.

В детском возрасте всасывание калия в пищеварительном тракте существенно выше, чем у взрослых. Это обусловлено более высокой активностью апикально расположенных  $K^+$ -АТФаз ( $H^+$ ,  $K^+$ -АТФазой и оубаин-чувствительной  $Na^+$ -независимой), обеспечивающих абсорбцию катиона. В то же время  $K^+$ -секретирующие транспортные механизмы, представленные базальной  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТФазой и  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $2Cl^-$ -котранспортером, а также  $Ca^{2+}$ -чувствительными апикальными  $K^+$ -каналами, более активны у взрослых животных. Следовательно, результирующий вектор транспорта калия направлен на всасывание у молодых животных и на секрецию – у взрослых. Катехоламины, особенно  $\beta$ -адренергические агонисты, соматостатин, нейропептиды, гипокалиемия повышают абсорбцию катиона, а глюко- и минералокортикоиды, простагландины, высокая калиевая диета

стимулируют секрецию калия. Существенную роль в активации  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТФазы в дистальных отделах толстого кишечника и собирательных трубках нефронов играет выделенный недавно новый трансмембранный белок SHIF, один из представителей семейства FXYD-протеинов. Его синтез индуцируется альдостероном и гиперкалиемией, в меньшей степени дефицитом натрия, и выявляется только у взрослых животных.

В раннем онтогенезе экскреция калия почками значительно ниже, чем у взрослых, в связи с пониженной клубочковой фильтрацией и низкой секрецией катиона в дистальном сегменте нефрона. Механизмы транспорта и регуляции экскреции катиона в дистальном сегменте нефрона почек соответствуют процессам, имеющим место в дистальном отделе толстого кишечника.

Содержание калия во всех тканях животных раннего возраста достоверно выше, чем у взрослых, однако они не обладают способностью депонировать избытки катиона при повышении его концентрации в крови или отдавать калий при понижении концентрации катиона в плазме. Депонированию калия способствуют инсулин, альдостерон, СТГ,  $\beta$ -адренергические агонисты, алкалоз, гиперкалиемия, тогда как допамин, глюкагон,  $\alpha$ -адренергические агонисты, ацидоз, гипокалиемия, повышение внутриклеточного магния стимулируют выход катиона из депо. Распределение калия между вне- и внутриклеточным пространством в онтогенезе зависит от соотношения калиевых транспортеров и каналов, экспрессии гормональных рецепторов и внутриклеточных мессенджеров.

## Novel role for renal Na, K-ATPase as gene-regulator

**Oleg Aizman**

**M.D., Ph.D. Dept. of Woman and Child Health Astrid Lindgren Children's Hospital Karolinska Institute, S-17176**

Recent studies have indicated that Na, K-ATPase may, in addition to being the key regulator of intracellular  $Na^+$  and  $K^+$ -concentration, act as a signal transducer. The biological role for ouabain, the natural ligand of Na, K-ATPase, has, despite extensive research, not been well understood. We have reported that exposure of rat proximal tubular cells (RPTC), to doses of ouabain that inhibit the Na, K-ATPase activity less than 50% (10 nM – 500  $\mu$ M), will induce intracellular  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations and that this calcium signal leads

to activation of the transcription factors NF- $\kappa$ B. The ouabain induced calcium oscillations were blocked by an inhibitor of the IP<sub>3</sub> receptors but not by phospholipase C inhibitors nor by cellular depletion of IP<sub>3</sub>, suggesting that the calcium signal is not due to phospholipase C mediated IP<sub>3</sub> release. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) studies suggested a close proximity between the Na, K-ATPase and IP<sub>3</sub> receptor. Our findings demonstrate a novel principle for calcium signaling via Na, K-ATPase.

## Идентификация новой формы мРНК аквапорина 4, которая экспрессируется преимущественно в почке и печени мыши

**Т.Ю. Аликина\*, С.М. Зеленин\*, \*\*, О.А. Бабенко, А.А. Бондарь\***

\* Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН, г. Новосибирск, РФ;

\*\* Каролинский институт, г. Стокгольм, Швеция;

НИКТИ БАВ ГНЦ ВБ «Вектор», г. Бердск Новосибирской обл., РФ

AQP4 – водный канал, экспрессируется в основном в почках, мозге, легких и скелетных мышцах, где вместе с другими аквапоринами играет важную роль в поддержании водного гомеостаза. Ранее нами и другими авторами были описаны три формы мРНК AQP4, которые кодируют две изоформы белка – M1 (кодируется M1 мРНК) и M23 (кодируется M23 и M23X мРНК). Эти три мРНК кодируются шестью экзонами гена AQP4 – 0, X, 1, 2, 3 и 4. В настоящей работе с помощью RT-PCR, секвенирования и сравнения полученных нами нуклеотидных последовательностей кДНК и гена AQP4 мыши мы идентифицировали новую четвертую форму мРНК (M23A) AQP4. Новая мРНК экспрессируется преимущественно в почках и печени, а также незначительно в мозге взрослой мыши. 5'-концевая последовательность M23A мРНК кодируется тремя ранее неизвестными экзонами A, B и C, расположенными на расстоянии 7100, 5600 и 600 п.н. соответственно в 5'-области от экзона 0 гена AQP4 мыши. Мы обнаружили, по крайней мере, три разных варианта альтернативного сплайсинга M23A мРНК в области экзонов A, B и C. В почке и печени взрослой мыши экспрессируется преимущественно первый вариант M23A мРНК (экзоны A/1, 2, 3, 4). Но присутствует также мРНК-транскрипт, содержащий последовательность экзона B. В мозге мы обнаружили три варианта M23A мРНК: 1-й (экзоны A/1, 2, 3, 4), 2-й (экзоны A, C/1, 2, 3, 4) и 3-й (экзоны A, B, C/1, 2, 3, 4). Точка сплайсинга в M23A мРНК между экзонами A/1, B/1 или C/1 точно совпадает с известной для M1 мРНК между экзонами 0/1 и M23X мРНК между экзонами X/1. Если факт экспрессии AQP4 в почках и мозге не подлежит

сомнению и исследованию роли AQP4 в данных органах посвящено много работ, то AQP4 в клетках печени был обнаружен недавно. Он экспрессируется в базолатеральной мембране холангиоцитов печени крысы, которые формируют, как полагают, важный транспортирующий эпителий желчных протоков, активно вовлеченный в абсорбцию и секрецию воды, ионов и растворимых веществ. Поскольку исследователи рассматривали общую для всех форм мРНК часть, не было установлено, какая именно форма мРНК AQP4 экспрессируется в холангиоцитах. Наши данные говорят о том, что это новая форма мРНК AQP4 – M23A. Мы полагаем, что набор и количественное соотношение разных вариантов альтернативного сплайсинга M23A мРНК варьирует в зависимости от типа ткани, где экспрессируется AQP4. Анализ нуклеотидной последовательности новой M23A мРНК показал, что все варианты ее альтернативного сплайсинга кодируют известную M23-изоформу AQP4. Считается, что экспрессия AQP4 неравномерна по отделам собирательной трубки почки. Но неизвестно, какие именно формы мРНК AQP4 экспрессируются в разных отделах собирательных трубок почки в норме и при различных патологиях. По нашим данным, при интоксикации свинцом в почке увеличивается синтез мРНК AQP4, однако неясно, каких форм. Механизмы регуляции экспрессии гена AQP4 на уровне разных форм мРНК пока мало изучены. По-видимому, экспрессия разных форм мРНК контролируется разными, возможно, независимо функционирующими промоторами гена AQP4 тканеспецифичным образом. Работа поддержана грантом РФФИ № 01-04-49390.

## Возрастной аспект морфофункциональных и пролиферативных изменений почек интактных и спинальных животных

**М.С. Алиметова**

**Дагестанская государственная медицинская академия, г. Махачкала**

Проблема восстановления внутренних органов при повреждениях спинного мозга является актуальной. В рассматриваемом контексте представляло интерес изучение характера морфофункциональных изменений в почках спинальных животных на различных стадиях постнатального онтогенеза. У крыс в возрасте 3, 7, 30, 60 дней, 6 месяцев и 1,5 года производили полную поперечную перерезку спинного мозга (ПППСМ) на уровне T<sub>7</sub>-T<sub>8</sub>. Почки фиксировали в жидкости Карнуа, парафиновые срезы толщиной 5–6 мкм окрашивали гематоксилином и эозином и пикрофуксином по Ван-Гизону. Основными критериями служили: вес тела и

почек, степень восстановления опорно-локомоторных и вегетативных функций, диаметры проксимальных и дистальных сегментов нефрона (ПСН и ДСН), площадь почечных телец (ПТ), общее количество их на срединном срезе, количество ядер в клубочках, степень кровенаполнения капилляров клубочков, митотический индекс (МИ) в промилле – ‰ клеток клубочков, ПСН, ДСН, петли Генле.

Спинальная травма (СТ) сопровождалась угнетением спинно-мозговых рефлексов, потерей чувствительной и двигательной функции каузальной частью тела, снижением веса тела, нарушением функции тазовых

органов, мочевыведения и дефекации. Продолжительность спинального шока с характерной арефлексией – 3–5 минут. У половозрелых животных в месте дефекта после ПППСМ образовывался более плотный рубец. На фоне выраженной отека задних лап наблюдались трофические язвы. Значительное увеличение веса почек в первые 3, 7 дней после СТ, видимо, связано с застойными явлениями в почках.

Формообразовательные процессы в почках выражены чрезвычайно слабо. В процессе морфогенеза в почке 14-дневных крысят уже нет нефрогенной зоны, нефроны сформированы, и дальнейший их рост происходит за счет гипертрофии. Отмечено нарушение почечной гемодинамики после СТ, которое проявлялось в полнокровии, мелких диапедезных кровоизлияниях в интерстиций, периваскулярной отека, наличии жидкости и единичных эритроцитов в полости капсулы Шумлянско-го, ПТ и отдельных канальцев, что обусловлено нарушением проницаемости сосудистой системы. У половозрелых животных диапедез эритроцитов был значительным, наблюдались очаговые тромбозы капиллярных петель клубочков, некроз со скоплением нейтрофилов, поредение отдельных сосудистых петель. Отмечались «опустошенные» нефроциты, в

отдельных ядрах – кариолизис. В интермедиарной зоне выявлялись очаговые кровоизлияния и лейкоцитарная инфильтрация. Диаметры проксимальных и дистальных канальцев нефрона, площадь ПТ и степень их кровенаполнения увеличивались. Значительное функциональное напряжение сосудистой сети клубочков в раннем постнатальном онтогенезе в первые недели после СТ, видимо, является компенсаторно-приспособительной реакцией, направленной на увеличение масштабов фильтрационного процесса. МИ в различных отделах нефрона интактных животных не одинаков: в ПСН он выше, чем в ДСН и петле Генле. С возрастом МИ снижался. Снижение МИ после СТ, очевидно, является приспособительной реакцией, позволяющей поддерживать большее количество клеток в рабочем состоянии. В генезе морфофункциональных изменений почечки имеют место как поражение спинальных путей и центров, осуществляющих иннервацию почек, так и состояние напряжения, а также включение адаптационно-компенсаторных механизмов в динамике после СТ. У животных раннего возраста последствия СТ слабее выражены и менее длительны, нормализация функциональных расстройств происходила быстрее по сравнению с половозрелыми животными.

## Влияние тиреоидэктомии на содержание ионов натрия и калия в тканях белых крыс

**А.Ф. Баженова, Ю.И. Баженов, Е.А. Смирнова, О.А. Чувагина**  
Государственный университет, г. Иваново

Щитовидная железа играет важную роль в жизнедеятельности организма. Особенно велико значение гормонов щитовидной железы в период внутриутробной и ранней постнатальной жизни. Тиреоидные гормоны контролируют не только линейный рост, но и регулируют процессы дифференцировки тканей. Единного мнения о влиянии тиреоидных гормонов матери на развитие потомства нет. Одни авторы считают, что тиреоидные гормоны матери, преодолевая фетоплацентарный барьер, оказывают влияние на плод в ранние сроки беременности (Бурмукулова, Герасимов, 1998), другие утверждают, что тиреоидные гормоны матери оказывают существенное влияние на созревание мозга не только в период внутриутробной жизни, но и в первые месяцы постнатального периода при молочном вскармливании (Касаткина, 1997). По мнению Шехтмана М.М. и соавторов (2001), тиреоидная система плода не зависит от материнской системы. Учитывая разноречивость взглядов на данную проблему, целью наших исследований было изучение влияния частичного (50%) и субтотального (полное удаление щитовидной железы за исключением участков, где расположены парашитовидные железы; Шкуматов и другие, 2001) удаления щитовидной железы у самок белых крыс на водно-солевой обмен в тканях их потомства. Через 10 дней после операции самок помещали вместе с сам-

цами, где они находились на стандартном рационе питания. Беременных крыс отсаживали в отдельные клетки. Крысят в возрасте 10, 20 и 30 дней декапитировали и определяли содержание натрия и калия в тканях селезенки, печени, сердца, почек и мышц. Сравнение проводили с крысятами такого же возраста, родившихся у контрольных самок.

Результаты исследования показали, что частичное удаление щитовидной железы у самок крыс вызывало достоверное повышение натрия и калия у 10-дневных крысят в тканях печени и селезенки. В остальных тканях изменений не обнаружено. Незначительные изменения минерального состава в тканях при частичном удалении железы указывают на компенсаторное восстановление выработки гормонов оставшейся частью щитовидной железы. Субтотальное удаление щитовидной железы вызывало значительные изменения содержания ионов: у крысят в возрасте 10 дней обнаружено понижение содержания натрия в печени, а у 20- и 30-дневных крысят это снижение ионов (особенно натрия) было значительным ( $p < 0,05$ ) во всех изученных тканях.

Следовательно, функциональная активность щитовидной железы матери, в частности гипотиреоз, может оказывать существенное влияние на водно-солевой гомеостаз у развивающегося потомства.

## Вазопрессин-зависимая водная проницаемость базолатеральной мембраны собирательной трубки почки крысы в постнатальном онтогенезе

Г.С. Батурина, Г.Р. Ходус, В.В. Нестеров\*, Е.И. Соленов, Л.Н. Иванова

Институт цитологии и генетики СО РАН,

\* Новосибирская государственная медицинская академия, г. Новосибирск

Антидиуретический гормон аргинин-вазопрессин (AVP) регулирует реабсорбцию воды главными клетками собирательных трубок почки крысы. Хорошо известно, что незрелая почка в период молочного вскармливания нечувствительна к вазопрессину. Функциональный ответ на этот гормон впервые появляется в период вивинга, возможно, благодаря созреванию внутриклеточных механизмов трансдукции гормонального сигнала. Цель настоящей работы состояла в исследовании эффекта агониста V2-рецептора dDAVP на водную проницаемость базолатеральной мембраны клеток наружного слоя мозгового вещества (OMCD) в постнатальном онтогенезе.

Проницаемость базолатеральной мембраны клеток измерялась на микродиссектированных канальцах, апикальная мембрана которых была заблокирована маслом, введенным в просвет. Осмотическая водная проницаемость ( $P_f$ ) оценивалась при помощи измерения скорости набухания клеток после быстрой смены гипертонической омывающей жидкости на изотоническую (с 600 мосм до 300 мосм) в контрольных условиях и после инкубации с dDAVP ( $10^{-8}$  М).

Водная проницаемость OMCD 10- и 22-дневных крысят в контрольных условиях была достоверно выше, чем у взрослых животных. dDAVP стимулировал достоверное повышение этого параметра у 22-дневных крысят ( $P_f = 125 \pm 4,85$ ;  $P_f = 174 \pm 8,2$  мкмоль/с,  $p < 0,001$ ) и взрослых крыс ( $P_f = 100,5 \pm 7,38$ ;  $P_f = 178,8 \pm 9,54$  мкмоль/с,  $p < 0,001$ ). Осмотическая водная про-

ницаемость базолатеральной мембраны клеток OMCD у 10-дневных крысят не зависела от dDAVP ( $P_f = 172,5 \pm 23,8$ ;  $P_f = 164,8 \pm 34$  мкмоль/с). Ртуть (1 ммоль  $HgCl_2$ ) резко снижала  $P_f$  базолатеральной мембраны OMCD. Отмывка ртути восстанавливала водную проницаемость до контрольного уровня.

Для исследования механизма, лежащего в основе наблюдаемых изменений, мы оценивали методом полуклонового элемента RT-PCR содержание мРНК – ключевого элемента системы трансдукции сигнала AVP – V2-рецептора и аквапоринов 2, 3 и 4. Хорошо известно, что связывание AVP с V2-рецепторами в главных клетках собирательных трубок вызывает перемещение водных каналов AQP2 из депо во внутриклеточных везикулах в апикальную плазматическую мембрану. Мы наблюдали постепенное увеличение генной экспрессии AQP2 и рецептора V2 во время постнатального онтогенеза. Генная экспрессия водных каналов базолатеральной мембраны AQP3 и AQP4 оставалась неизменной в течение этого периода.

Таким образом, водная проницаемость базолатеральной мембраны клеток OMCD у крыс может стимулироваться после 22-го дня постнатальной жизни. Нестимулированная водная проницаемость базолатеральной мембраны OMCD постепенно уменьшалась во время постнатального развития, в то время как генная экспрессия AQP3 и AQP4 оставалась неизменной. Механизм этого снижения предстоит выяснить в дальнейших исследованиях.

## К вопросу об участии окситоцина в осморегулирующем рефлексе

Р.Р. Билалова, Т.С. Сулаквелидзе

Дагестанская государственная медицинская академия, г. Махачкала

Исследование является продолжением экспериментальных работ в частности и сотрудников кафедры, в которых подчеркнуто, что окситоцин имеет прямое отношение не только к регуляции детородной функции, но и к поддержанию водно-солевого гомеостаза (Мусалов Г.Г., Сулаквелидзе Т.С. (1970) и др.). В настоящее время описаны влияния окситоцина на многочисленные функции, гормон назван фактором полифункциональным. В то же время исследование его эффектов на обмен воды и солей остается особенно актуальным, скажем, в связи с описанием последствий при введении больших доз гормона для стимуляции родовой деятельности (Хрустальков (1990) и др.). Общее направление работ в названном плане должно учитывать и дозировку гормона, и фон водно-солевого гомеостаза, на котором вводится экзогенный окситоцин. В настоящем

исследовании изучено действие окситоцина (О.) и его антагониста вазопрессина (В.) на характер выведения водной нагрузки в эксперименте на животных. Ранее в 19 опытах на 8 собаках-самках мы показали, что увеличение мочеотделения после введения воды в желудок (30 мл/кг) через желудочную фистулу сопровождается не только снижением концентрации В. в крови, но и постепенным ростом уровня О. Его максимум в плазме совпадал ( $p < 0,05$ ) с пиком водного диуреза (через час после введения воды в желудок), когда параллельно падению В. в системной циркуляции антидиуретическая активность плазмы крови сменялась ее диуретическим действием (в тесте на крысах). Через 2 часа после введения воды в желудок, на спаде водного диуреза, количество О. в крови снижалось, а уровень В. в плазме возвращался к фоновому. Четко определилось, что характер

водного диуреза в значительной степени зависел от соотношения в системной циркуляции уровней В. и О.

В пользу того, что О. вместе с В. имеет прямое отношение к поддержанию водно-солевого гомеостаза говорят опыты с изучением влияния их экзогенных аналогов на развитие водного диуреза, его размеры. У 3 беспородных бодрствующих собак-самок с фистулами мочевого пузыря и желудка особо строго учитывался фоновый уровень гидратации организма, от которого, как отмечено выше, зависит концентрация в жидких средах эндогенных В. и О. Их экзогенные аналоги вводили в вену в физиологических дозах, соответствующих данному уровню гидратации: В. в дозе 10 мкед./мл, питуитрин – 30 мкед./мл, О. – 100 мкед./мл, одновременно с водной нагрузкой в желудок в объеме 30 мл/кг. Выяснилось, что если у контрольных собак явное увеличение мочеотделения отмечено к 30 мин после водной нагрузки при среднем выведении мочи к 1-му часу в размере  $22,2 \pm 3,1\%$ , то на фоне введения В. увеличение диуреза достигалось только к 45-й минуте, а процент выведения воды к 1-му часу достигал лишь  $9,9 \pm 0,8\%$ , но к 3-му часу характер кривых выравнивался.

В то же время в условиях введения О. мочеотделение возрастало уже к 15-й минуте, а к первому часу выведение водной нагрузки достигало  $49 \pm 4,2\%$ , ко 2-му часу после введения водной нагрузки диурез снижался, хотя в течение 3-го часа еще держался в пределах  $8,1 \pm 1,1\%$ .

Своеобразной была кривая развития водного диуреза на фоне питуитрина: вряд ли ее можно было назвать строго промежуточной между кривыми, полученными в условиях действия вазопрессина и окситоцина.

Следуя строгому соблюдению учета уровней эндогенных гормонов в системной циркуляции, мы ввели экзогенный О. с расчетом создания в крови концентраций гормона в пределах 50 мкед./мл и при инъекции таких доз на фоне предварительной 2-дневной водной депривации наблюдали явное диуретическое действие О. На основании приведенных сопоставлений можно дополнительно утверждать, что эндогенный окситоцин (в числе других факторов) избавляет организм от «лишней» воды.

## Исследование роли простагландина $E_2$ в регуляции ионовывделительной функции почки крыс при водном диурезе

**А.Е. Боголепова**

**Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, г. Санкт-Петербург**

Образующийся в почке простагландин  $E_2$  наряду с вазопрессинном участвует в регуляции транспорта воды и ионов. Представляло интерес выяснение роли простагландина  $E_2$  в регуляции ионовывделительной функции почек крыс при водном диурезе.

Эксперимент проводился на белых крысах линии Вистар в возрасте 4–6 месяцев. Животные получали *per os* 5 мл воды на 100 г массы тела. Крысы находились в клетках-пеналах, моча собиралась при произвольном мочеиспускании в течение 4 часов. Концентрация креатинина определялась на спектрофотометре «СФ-26» (Россия), концентрация осмотически активных веществ – на миллиосмометре «МТ-4» («Буревестник», Россия), концентрация ионов натрия и калия – на пламенном фотометре «Corning-410» (Великобритания), концентрация ионов магния – на атомно-абсорбционном спектрофотометре «Hitachi-508» (Япония). Для подготовки проб к определению простагландинов в аликвоты мочи добавляли ингибитор простагландинсинтазы индометацин (10 мкг на 1 мл пробы), после чего их немедленно помещали в холодильную камеру. Измерение и расчет концентрации простагландина  $E_2$  осуществляли на автоматическом ридере «Elx800» («BioTEK Instruments», США). Статистическая обработка данных производилась с использованием t-критерия Стьюдента.

Доза введенного внутримышечно диклофенака нат-

рия («Акрихин», Россия) составляла 500 мкг на 100 г массы тела. После введения диклофенака средний уровень выведения водной нагрузки за 2 часа снизился на 58%. На фоне действия препарата наблюдалось уменьшение диуреза с  $0,049 \pm 0,003$  до  $0,026 \pm 0,003$  ммоль/мин на 100 г массы тела. Отличия в уровне клубочковой фильтрации не выявлены. Инъекция диклофенака вызвала снижение экскреции осмотически активных веществ (с  $3,4 \pm 0,15$  до  $1,8 \pm 0,122$  ммоль/мин), ионов натрия ( $0,372 \pm 0,033$  и  $0,08 \pm 0,014$  ммоль/мин) и магния ( $0,03 \pm 0,001$  и  $0,015 \pm 0,001$  ммоль/мин). При водном диурезе в условиях блокады синтеза простагландинов диклофенаком отмечается увеличение реабсорбции осмотически свободной воды по сравнению с реакцией контрольной группы на водную нагрузку (с  $-0,033 \pm 0,0015$  до  $-0,017 \pm 0,001$  мл/мин). При использовании диклофенака закономерно снижается экскреция простагландина  $E_2$  (с  $0,392 \pm 0,052$  до  $0,121 \pm 0,012$  нг/мин).

Таким образом, простагландин  $E_2$  участвует в выведении водной нагрузки, видимо, за счет уменьшения реабсорбции осмотически свободной воды и нарастания экскреции осмотически активных веществ, в том числе ионов натрия и магния.

*Благодарность.* Работа поддержана РФФИ (грант № 02-04-48065), программой «Ведущие научные школы» (грант № 00-15-97771), программой президиума РАН.

## Влияние никеля и рН на водную проницаемость аквапоринов 3 и 4 человека

А.А. Бондарь<sup>1</sup>, М.Н. Зеленина<sup>2,3</sup>, Н.Б. Илларионова<sup>1</sup>, С.М. Зеленин<sup>1,3</sup>, А. Аперия<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН,

<sup>2</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск (Россия);

<sup>3</sup> Каролинский Институт, г. Стокгольм (Швеция)

Координированные изменения водной проницаемости апикальной и базолатеральной мембран за счет оперативной регуляции аквапоринов 2, 3 и 4 обеспечивают гибкую и эффективную систему водного транспорта в главных клетках собирательных трубок почки. AQP2 экспрессируется преимущественно в апикальной, а AQP3 и AQP4 только в базолатеральной мембране. Известно, что ртуть ингибирует большинство водных каналов млекопитающих, кроме AQP4, посредством связывания ионов металла с остатками цистеина. Золото и серебро ингибируют водный канал, локализованный в эритроцитах человека, предположительно AQP1, но молекулярные основы такого ингибирования пока не выявлены. Мы исследовали влияние  $Ni^{2+}$  на водную проницаемость AQP3 и 4 человека. Поскольку есть данные, что AQP3, экспрессированный в ооцитах лягушки, является рН чувствительным, мы исследовали влияние закисления внеклеточной среды на водную проницаемость данных каналов. С помощью экспрессии слитых с GFP водных каналов AQP3 и 4 человека в клетках легких, где, как и в почке, они экспрессируются, мы показали, что  $Ni^{2+}$  и рН регулируют водную проницаемость AQP3 человека, но не оказывают никакого влияния на AQP4. Рекombинантными ДНК кратковременно трансфецировали клетки линии BEAS-2b и при помощи конфокальной микроскопии измеряли водную проницаемость ( $P_f$ ) как клеток, экспрессирующих AQP3 человека, так и контрольных соседних нетрансфецированных клеток, как описано нами ранее (Zelenina et al., *AJP* 2002). Инкубация с  $NiCl_2$  быстро и дозозависимо снижала проницаемость клеток, экспрессирующих AQP3. Эффект был обратимым, и при отмывке водная проницаемость клеток восстанавливалась. Закисление внеклеточной среды также вызывало быстрое, дозозависимое и обратимое ингибирование AQP3. Он был

практически не проницаем для молекул воды при рН = 5,5 и показывал максимальные значения  $P_f$  при рН = 7,7. Чувствительность AQP3 к  $Ni^{2+}$  была ниже при щелочных значениях рН по сравнению с нейтральными и кислыми рН. Гистидин, имеющий значение рКа около 6,5, представляет собой наиболее вероятную молекулярную мишень для регуляции активности белков при изменениях рН среды и является одновременно предпочтительным сайтом связывания  $Ni^{2+}$ . Путем серии мутаций гистидинов, расположенных во внеклеточных петлях AQP3 человека, и других а. к. остатков, способных взаимодействовать с His, мы идентифицировали Trp128, Ser152 и His241, которые оказались ответственными за эффект блокирования AQP3 человека соединениями никеля. Ser152 был идентифицирован нами в качестве общего сайта, отвечающего за чувствительность канала как к никелю, так и к изменениям рН. Локализованные также во внеклеточных петлях белка AQP3 остатки His53, Trp124 и His154 оказались вовлечены в регуляцию проницаемости AQP3 при изменении рН внеклеточной жидкости. Кроме того, выяснилось, что ароматическое кольцо His154 имеет важное значение для обеспечения водной проницаемости канала AQP3 как таковой. Молекулярные сайты, ответственные за чувствительность аквапоринов к тяжелым металлам и рН, могут быть использованы для будущих разработок терапевтических агентов для лечения патологических состояний организма человека, вызванных влиянием этих факторов. Избирательное ингибирование AQP3 никелем, AQP2 ртутью и нечувствительность AQP4 к ионам данных металлов может быть использовано как инструмент для детального изучения роли и механизмов регуляции этих водных каналов, экспрессирующихся в главных клетках собирательных трубок почки.

## Возрастные особенности транспорта калия в дистальном отделе толстой кишки крыс

Е.Н. Боровец, Р.И. Айзман

Новосибирский государственный педагогический университет, г. Новосибирск

Для нормального роста и развития организма, особенно в раннем онтогенезе, требуется положительный баланс калия. Он может быть достигнут более высоким уровнем абсорбции катиона в пищеварительном тракте и низким уровнем его секреции в почках и толстой кишке.

Известно, что транспорт калия в дистальном отделе толстой кишки состоит из двух потоков – секреции и абсорбции. Секреция калия обеспечивается  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТ-

Фазой и  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $2Cl^-$ -котранспортером, локализованными на базолатеральной мембране клеток. Абсорбция катиона осуществляется с помощью калий-зависимых АТФаз, локализованных в апикальной мембране клеток. В настоящее время имеется ряд доказательств существования, по крайней мере, двух калий-абсорбирующих насосов – оубаин-нечувствительной  $H^+$ ,  $K^+$ -АТФазы и оубаин-чувствительной  $Na$ -независимой  $K^+$ -АТФазы.

Для оценки эффективности описанных  $K$ -транспорт-

ных систем были выполнены эксперименты на 20-дневных крысятах и взрослых крысах. Установлено, что в условиях перфузии *in vivo* калиевыми растворами абсорбция калия у крысят почти в 9 раз выше, чем у взрослых животных. Использование перед перфузией специфических блокаторов апикально расположенных насосов: омепразола (для блокады  $H^+$ ,  $K^+$ -АТФазы), оубаина (для ингибирования оубаин-чувствительной  $K^+$ -зависимой АТФазы) показало, что у крысят всасывание калия по сравнению с контролем снижалось на 84 и 60%, а у взрослых животных на 55 и 45% соответственно.

Исследование поглощения  $^{86}Rb$  как маркера транспорта калия выявило, что общий захват  $^{86}Rb$  был достоверно выше у крысят.

Использование блокаторов со стороны люминальной мембраны показало, что у крысят в два раза больше, чем у взрослых крыс, был снижен захват  $^{86}Rb$  в присутствии оубаина и после действия SCH-специфического ингибитора  $H^+$ ,  $K^+$ -АТФазы.

У взрослых животных сильнее, чем у крысят, захват

$^{86}Rb$  снижал буметанид (блокатор  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $2Cl^-$ -котранспортера), и оубаин (ингибитор  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТФазы).

Анализ активности оубаин-чувствительной  $Na$ -независимой  $K^+$ -АТФазы и оубаин-нечувствительной  $H^+$ ,  $K^+$ -АТФазы в пузырьках щеточной каемки апикальной мембраны показал, что активность обеих АТФаз значительно выше у крысят, чем у взрослых животных.

Сказанное выше позволяет заключить, что активность апикально расположенных абсорбирующих  $K^+$ -зависимых АТФаз:  $H^+$ ,  $K^+$ -АТФазы и оубаин-чувствительной  $Na$ -независимой  $K^+$ -АТФазы выше у крысят, а базолатеральная  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТФаза и  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $2Cl^-$ -котранспортер, ответственные за секрецию катиона, имеют более высокую активность у взрослых животных. Это обстоятельство, вероятно, является одной из причин положительного баланса калия в раннем онтогенезе, на что указывает достоверно более высокое содержание катиона в клетках и основных тканевых депо (скелетных мышцах).

## Зависимость мочегонного действия фуросемида и спиронолактона от суточных биоритмов у крыс

**В.М. Брюханов, Я.Ф. Зверев, И.Е. Госсен**

**Кафедра фармакологии Алтайского медицинского университета, г. Барнаул**

Одной из актуальных проблем хронофармакологии является феномен флюктуации фармакологического эффекта в зависимости от биологических ритмов организма. В этом контексте было интересно исследовать эффективность действия таких диуретиков, как фуросемид и спиронолактон, в зависимости от колебаний суточных циркадных ритмов в организме крыс.

Эксперименты поставлены на самках крыс массой 150–250 г. Животные были разделены на две группы. Первой группе диуретики (фуросемид – 20 мг/кг внутривнутрибрюшинно, спиронолактон – 50 мг/кг внутрь) вводили в 12 часов дня, второй – в 12 часов ночи. У крыс, находившихся в индивидуальных клетках в условиях свободного доступа к воде и пище, мочу собирали в течение суток после введения препаратов, измеряя диурез, экскрецию натрия и калия каждые 6 часов. О скорости клубочковой фильтрации судили по экскреции креатинина.

Оказалось, что у крыс, получавших фуросемид в 12 часов дня, уровень суточного мочеотделения был на 40% выше, чем у животных, которым препарат вводили в 12 часов ночи. Суточная экскреция натрия также была значительно выше (в среднем на 30%). Выделение калия и скорость фильтрации существенно не различались. Полученные различия диуретического и натрийуретического эффектов фуросемида были настолько очевидными, насколько, на первый взгляд, странными, учитывая, что крысы – ночные животные, и наибольшая суточная активность присуща им именно в ночные часы. Анализ, однако, показал, что в результате такого мощного воздействия на почки, которое оказывает фуросемид в данной дозе в условиях внутрибрюшинного введения, все показатели экскреторной функции почек за первые 6 часов были одинаковыми у всех групп животных независимо от времени введения. Различия

же были обусловлены процессами, происходившими в последующие 18 часов. Так что у крыс, получивших диуретик в 12 часов дня, более сильное воздействие на почки обеспечивалось в период с 18 часов до 12 часов следующего дня, то есть в основном в ночной период. Соответственно у животных, которым препарат вводили в 12 часов ночи, различия в эффектах были ограничены рамками временного интервала с 6 утра до 12 часов ночи следующих суток, то есть главным образом светлым периодом суток.

При применении спиронолактона различия были не столь ощутимыми. У крыс, которым препарат вводился утром, выявлялись явная тенденция к увеличению мочеотделения, 5-кратный рост экскреции натрия и уменьшение выделения калия на фоне неизменной фильтрации. При введении спиронолактона в вечерние часы диуретическое действие практически отсутствовало, а натрийуретическое – было значительно меньшим. Обнаруживались также некоторые различия в динамике мочеотделения в зависимости от времени введения препарата, которые определялись главным образом варьированием «дневного» компонента суточного мочеотделения.

Таким образом, мочегонное действие фуросемида в условиях однократного внутрибрюшинного введения крысам значительно варьирует в зависимости от циркадных ритмов с развитием более сильного эффекта в ночной период времени. Различия в эффектах спиронолактона, по всей вероятности, обусловлены суточными колебаниями активности гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы, что, в свою очередь, в значительной степени определяется возбудимостью минералокортикоидных рецепторов, конкурентным антагонистом которых является спиронолактон.



## Определение пространства распределения жидкости

### Д-КСИЛОЗНЫМ ТЕСТОМ

**Р.Э. Гарунова**

**Дагестанская государственная медицинская академия, г. Махачкала**

Определение пространства распределения д-ксилозы проводили методикой разведения. Применяя этот принцип, можно измерить объем любого сектора, если имеется тест-вещество, которое при инъекции проникает в это пространство, гомогенно в нем распределяется и не экскретируется с большой скоростью почками. Для измерения используются тест-вещества, которые могут быть определены колориметрически, или меченые соединения.

Д-ксилоза отвечает всем требованиям, предъявляемым к тест-веществу для определения объема жидкостных пространств, основанных на принципе разведения. Д-ксилоза после внутривенного введения быстро и равномерно распределяется в организме в течение 5 минут после инъекции, практически не метаболизируется, не является токсичной, не ведет к изменению объема жидкости (в малых дозах).

После внутривенного введения д-ксилоза сначала быстро рассеивается в циркулирующем объеме плазмы, а затем переходит через капиллярные мембраны в тканевую жидкость. Д-ксилоза проникает в межтканевую жидкость и через клеточные мембраны внутрь клеток.

Вещества, которые равномерно распределяются как во внутриклеточном, так и во внеклеточном пространстве, являются показателями общего обмена воды в организме. Д-ксилоза отвечает этим требованиям, она равномерно свободно распределяется как в межтканевой, так и во внутриклеточной жидкости организма и может быть показателем общего пространства распределения.

Целью настоящей работы явилось определение пространства распределения с помощью д-ксилозного теста.

Исследования проводились на собаках ( $n = 9$ ) в три этапа: контрольный период, на фоне введения тиопентала Na (40 мг/кг) и после полной поперечной перерезки спинного мозга (ПППСМ) на уровне Th<sub>7</sub>–Th<sub>8</sub>.

Стерильный раствор д-ксилозы (20%) вводили внутривенно одномоментно из расчета 120 мг/кг веса. Затем через 5 минут производили забор крови – 0,3 мл. Пространство распределения вычисляли по формуле  $DV = I/P_{max}$ , где  $I$  – внутривенно введенная доза д-ксилозы;  $P_{max}$  – концентрация д-ксилозы в 1 мл крови через 5 минут после введения. Пересчитывали общее пространство распределения д-ксилозы к весу тела в %.

По результатам наших исследований: в контрольный период DV д-ксилозы составляло от 41,4 до 46,8%. На фоне наркоза пространство распределения было равно от 46,6 до 52,3%. Через 10 дней – от 42,4 до 44,8%. После ПППСМ показатели распределения жидкости варьировали в пределах от 41,8 до 59,4% соответственно фазному изменению диуреза и основных процессов мочеобразования. При выраженных отеках значение пространства распределения д-ксилозы возрастало.

Представляет практический интерес дальнейшее исследование д-ксилозы для определения пространства распределения наряду с уже существующими методиками.

## Влияние природных цеолитов на абсорбцию натрия в кишечнике крыс

**А.Д. Герасев**

**Новосибирский государственный педагогический университет, г. Новосибирск**

Исследование выполнено в серии острых экспериментов на взрослых самцах крыс линии Вистар. Крысы экспериментальной (Э) группы в течение 7 дней получали корм с добавлением 5% (по массе) природных цеолитов (ПЦ) Шивыртуйского месторождения (95% клиноптилолит, фракция 0–1 мм). Контрольные животные (К) потребляли такой же корм без цеолитов. Для изучения процессов транспорта натрия в кишечнике использовали метод перфузии кишечника в условиях *in vivo*. Для этого под эфирным наркозом у крыс вскрывали брюшную полость по средней линии живота. В операционную рану выводили участок дистального отдела толстого кишечника (ДОТК). ДОТК изолировали путем наложения лигатур, сохраняя иннервацию и кровообращение. Выделенный сегмент кишечника промывали теплым ( $t = +37^\circ\text{C}$ ) раствором, объемом 5 мл, после чего перфузировали таким же раствором в течение 20 минут со скоростью 15 мл/ч. Для изучения механизма влияния природных цеолитов на работу

транспортных систем эпителиоцитов во второй серии экспериментов перед перфузией в просвет кишечника вводили на 10 минут раствор оубаина. Для оценки соотношения секреторных и абсорбционных процессов в кишечнике рассчитывали изменение содержания ионов натрия в перфузате на массу высушенного образца перфузируемого участка ДОТК. Расчет проводили по следующей формуле  $\Delta C_{Na^+} = (\Delta C \times 1000)/m$ , где  $\Delta C_{Na^+}$  – изменение содержания ионов в мкмоль/1 г сухого веса;  $m$  – масса участка кишечника (мг); 1000 – коэффициент;  $\Delta C$  – разница в содержании ионов в перфузате и во вводимом растворе.

При обработке материала в первой серии экспериментов было установлено, что содержание натрия в перфузате экспериментальных животных выше, чем у контрольных (табл. 1). Данная зависимость отмечалась как при перфузии кишечника водой, так и при использовании 2,5% раствора NaCl.

Для выяснения механизма обнаруженных различий во второй серии экспериментов перфузия ДОТК была

Таблица 1

**Влияние ПЦ на содержание  $\text{Na}^+$  в перфузате ДОТК (мкмоль/1 г сухого веса)**

Группы животных	Перфузия $\text{H}_2\text{O}$		Перфузия 2,5% раствором $\text{NaCl}$	
	без блокатора	оубаина	без блокатора	оубаина
К (n = 6)	31,2 ± 5,4	133,7 ± 16,6*	-5198,1 ± 1131,4	-3216,4 ± 858,6
Э (n = 6)	84,5 ± 8,7*	128,8 ± 25,8	-3500,7 ± 210,2	-2861,7 ± 701,9

\* Достоверные отличия между контрольными и экспериментальными животными.

# Достоверные отличия по сравнению с результатами серии без блокаторов.

проведена после использования оубаина. Применение блокатора в группе (К) привело к повышению содержания натрия в перфузате, что, вероятно, является следствием подавления оубаином активности  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы. У экспериментальных животных использование блокатора практически не изменило содержания натрия в кишечнике. При этом ПЦ существенно не влияли на ионоосмотические показатели плазмы крови, а также на водно-электролитный состав тканей печени, скелетной мускулатуры и перфузируемого участка кишечника.

Данные факты, на наш взгляд, свидетельствуют о том, что природные цеолиты снижают абсорбцию натрия в ДОТК, вероятно, за счет угнетения активности оубаин-чувствительных транспортных систем.

## Перекисное окисление липидов и антиокислительная защита мембран клеток при сахарном диабете в клинике и эксперименте

**Ф.С. Дзугоева, С.Г. Дзугоев, А.Е. Гурина, Б.Н. Кабоева**

**Северо-Осетинская государственная медицинская академия, г. Владикавказ**

К настоящему времени накоплен экспериментальный и клинический материал, свидетельствующий о важной роли перекисного окисления липидов (ПОЛ) в развитии и прогрессировании диабетической нефропатии (ДН). Однако комплексного экспериментально-клинического анализа интенсивности ПОЛ, активности мембранных ферментов и изменения антиокислительной системы (АОС) на фоне диабетической нефропатии в доступной литературе не представлено.

Целью настоящего исследования было изучение функционального состояния почек, ПОЛ и АОЗ (антиокислительная защита) клетки и активности  $\text{Na},\text{K}$ -АТФазы почечной ткани в условиях инсулиновой недостаточности.

Исследования проведены на 50 больных сахарным диабетом (СД) I и II типов с явлениями ДН различной степени тяжести, а также при экспериментальном СД. По концентрации гидроперекисей (ГП) и малонового диальдегида (МДА) судили об активности ПОЛ, а по активности супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы – об АОЗ клетки. О липидном микроокружении судили по изменению активности  $\text{Na},\text{K}$ -АТФазы почечной ткани.

Анализ полученных данных показал активацию процессов ПОЛ при СД I и II типов в состоянии декомпенсации, что приводит к накоплению первичных продуктов – ГП, диеновых конъюгатов и вторичных – МДА. Кроме того, при ДН, сопровождающейся недостаточностью функционального состояния почек, наблюдались протеинурия и повышение содержания креатинина и мочевины в плазме крови.

Интенсификация ПОЛ может быть вызвана: 1) увеличением количества инициаторов ПОЛ; 2) снижением активности факторов защиты, которые разрушают или

предупреждают образование АФК.

Наши исследования продемонстрировали компенсаторное повышение активности каталазы на фоне активации СРО как фактора АОЗ при СД I и II типов, причем активация каталазы вызывала ингибирование процесса ПОЛ у больных СД II типа, а при СД I типа интенсивность ПОЛ оставалась более высокой, чем в норме.

ПОЛ может изменять качественный состав фосфолипидов (ФЛ) клеточных мембран и физико-химические свойства, выражающиеся в увеличении вязкости мембраны и снижении активности мембранных ферментов. Нами была исследована активность фермента  $\text{Na},\text{K}$ -АТФазы в почечной ткани при экспериментальном СД. Данные показали статистически достоверное ( $p < 0,001$ ) снижение его активности как в корковом (на 31,8%), так и в мозговом (на 46,1%) веществе почечной ткани.

Интенсификация ПОЛ при СД приводит к появлению гидрофильной гидропероксидной группировки полиненасыщенных жирных кислот мембранных ФЛ, что нарушает гидрофобность фосфолипидного бислоя. МДА, обладая свойствами поперечно-сшивающих бифункциональных реагентов, способен приводить к полимеризации биомолекул. Перекисные радикалы осуществляют окисление аминокислотных остатков мембранных белков, изменяя их конфигурацию и каталитическую активность.

Таким образом, при сахарном диабете в клинике и эксперименте имеет место оксидативный стресс, вызывающий активацию АОЗ клетки как проявление адаптивных механизмов.

## Влияние введения гуанетидина в пре- и постнатальные периоды онтогенеза на функции почек у крыс

**И.А. Дюкарев**

**Новосибирский государственный педагогический университет, г. Новосибирск**

Целью настоящей работы явилось выяснение влияния химической десимпатизации гуанетидином беременных крыс на становление водно-солевого гомеостаза их потомства.

Эксперименты проводились на крысах линии Wistar (n = 184). Пренатальная десимпатизация достигалась путем ежедневного внутрибрюшинного введения гуанетидина в количестве 25 мг/кг массы тела беременным самкам в течение всей беременности, постнатальная – крыскам с момента рождения ежедневно в течение 30 дней. Контрольным животным вводился физиологический раствор в том же объеме (n = 80).

Влияние пренатальной десимпатизации оценивалось в условиях спонтанного мочеотделения и после введения 5%-й водной нагрузки у потомства десимпатизированных крыс в 10, 20, 30 и 60-дневные сроки постнатальной жизни, постнатальной – на 30-й день жизни при тех же условиях.

При сопоставлении влияний пре- и постнатальной симпатэктомии можно отметить, что в условиях спонтанного мочеотделения отличие между животными с различными воздействиями наблюдается в исходном уровне экскреции калия. Крысята, родившиеся от десимпатизированных самок, имеют достоверно более низкий уровень экскреции калия (в 2 раза) по сравнению с животными, перенесшими раннюю постнатальную симпатэктомию.

При рассмотрении гидроуретической функции крысят этих групп после введения 5 мл воды на 100 г массы тела можно отметить, что отличие влияния пренатальной симпатэктомии от постнатального введения гуанетидина на диурез проявляется в удлинении его пика с 1-го часа на 2-й час реакции. Кроме того,

«пренатально» десимпатизированные крысята выводят достоверно больше жидкости по сравнению с «постнатально» десимпатизированными животными вплоть до окончания наблюдения. Это приводит к достоверным различиям средних показателей гидроуреза за время наблюдения ( $2,53 \pm 0,37$  против  $1,13 \pm 0,13$  мл/ч  $\square$  100 г).

Натрий- и калийурез в «пренатальной» группе после введения воды превышает показатели «постнатальных» крысят. В среднем за время реагирования «пренатально» десимпатизированные животные выводят натрия в 2 раза, а калия в 5,5 раза больше, чем «постнатальные» крысята.

По данным регрессионного анализа, антенатальное введение гуанетидина, по сравнению с постнатальной десимпатизацией приводит к усилению роли клубочковых процессов в ответ на гипоосмотический сдвиг в 30-дневный период постнатальной жизни.

Подводя итог сравнению пренатального и постнатального влияний гуанетидина на парциальные функции почек, можно отметить, что пренатальная симпатэктомия по сравнению с постнатальным воздействием приводит к достоверному увеличению экскреции ионов в ответ на введение водной нагрузки. Пренатальная десимпатизация приводит к более сильным нарушениям регуляции калиевого гомеостаза по сравнению с постнатальным введением гуанетидина и усилению роли клубочковых процессов в условиях гипоосмотического сдвига.

Симпатическая нервная система играет важную роль в становлении почечной функции у крыс. Нарушение симпатической иннервации у матери в период беременности приводит к нарушениям водно-солевого гомеостаза у потомства.

## Влияние изменений суточных биоритмов на уровень мочеотделения у крыс

**Я.Ф. Зверев, В.М. Брюханов**

**Кафедра фармакологии Алтайского медицинского университета, г. Барнаул**

Хорошо известно, что функционирование всех физиологических систем организма подвержено суточным (циркадным), месячным и сезонным колебаниям. Соответственно нарушения биоритмов чреваты развитием целого ряда патологических состояний и заболеваний. В этой связи представляло интерес изучение влияния циркадных колебаний на уровень мочеотделения у крыс, а также изменений экскреторной функции почек в условиях нарушения суточных биоритмов.

Эксперименты проведены на самках крыс массой около 200 г, находившихся в индивидуальных клетках, приспособленных для сбора мочи, в условиях свободного доступа к воде и пище. Мочу собирали в течение

суток, измеряя диурез, экскрецию натрия и калия каждые 12 часов. О величине клубочковой фильтрации судили по экскреции креатинина. Для воздействия на суточные биоритмы в одной из серии экспериментов определяли функцию почек у крыс, находившихся на протяжении 7 суток в условиях постоянной темноты («долгая ночь») или в течение такого же периода времени пребывавших на свету («долгий день»). В другой серии опытов на протяжении 7 суток изменяли суточные биоритмы, помещая животных во время светового дня в темное помещение на 12 часов, а затем в ночное время на такой же период включая дневное освещение.

Оказалось, что в течение суток процесс мочеот-

деления у крыс осуществляется неравномерно. Отношение «ночного» диуреза (с 20<sup>00</sup> до 8<sup>00</sup>) к «дневному» (с 8<sup>00</sup> до 20<sup>00</sup>) составило 2,1. Аналогичной динамикой характеризовалось и выделение электролитов. На наш взгляд, в этом нет ничего странного, учитывая, что крысы являются ночными животными, и наибольшая активность функции почек приходится у них на темное время суток.

Вероятно, по этой же причине показатели почечной функции у животных, находившихся в условиях «долгой ночи», мало отличались от нормы. Что касается крыс, длительно пребывавших на свету, нами впервые были зафиксированы существенные изменения функции почек в сравнении с контролем. На фоне нормального суточного диуреза, экскреции калия и креатинина выявлялось 10-кратное увеличение их значений суточного выделения натрия. Объяснить этот удивительный факт можно будет после специального исследования. Здесь же выскажем предположение, что, скорее всего, это связано со стрессовым воздействием света и реализуется благодаря вовлечению регуляторных возможностей эпифиза и супрахиазматических ядер гипоталамуса через эффек-

ты дофамина и мелатонина.

В условиях извращения суточных биоритмов (перемена дня и ночи) параметры экскреторной функции напоминали таковые у крыс, длительное время пребывавших на свету, то есть на фоне нормального уровня суточного мочеотделения, экскреции калия и фильтрации выделение натрия было резко повышенным и составило около 200 мкмоль/сут, что в 10 раз превосходило нормальные величины. Эти результаты показывают, что извращение суточного ритма оказывает на почки крыс стрессовое воздействие, аналогичное длительному влиянию света.

Таким образом, в экспериментах на крысах установлено, что процесс мочеотделения у этих животных происходит в 2 раза интенсивнее в ночное время. Длительное пребывание животных на свету и в условиях извращения суточных ритмов приводит к изменению экскреторной функции почек, выражающемуся в усилении выделения из организма натрия.

## Взаимодействие вазопрессинергической и серотонергической систем мозга в регуляции водного баланса

**Л.Н. Иванова**

**Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск**

Основная роль в сохранении водного баланса организма принадлежит нейрогипофизарному гормону – вазопрессину, регулирующему реабсорбцию осмотически свободной воды в дистальных канальцах почки. Интенсивность секреции нейропептида детерминируется потоком импульсов от осмо- и волюморепцепторов, интеграция которых осуществляется в стволе мозга и гипоталамических центрах. В последние годы появились работы, свидетельствующие о том, что в контроль секреции вазопрессина может быть вовлечен серотонин, один из важных регуляторов многих поведенческих и вегетативных функций (Jonson a. Thornhorst, 1997; Попова и др., 2000; Porova et al., 2002). Однако полученные данные противоречивы и не дают четкого представления о характере взаимодействия вазопрессинергической и серотонергической систем мозга в регуляции водного баланса и концентрирующей функции почек.

В докладе будут приведены результаты исследования, выполненного сотрудниками лаборатории фено-

генетики поведения и лаборатории физиологической генетики ИЦиГ СО РАН на крысах нормальной линии Вистар и крысах Браттлборо с генетическим дефектом синтеза вазопрессина. Комплекс данных послужил основанием для заключения, что серотонергическая система мозга оказывает стимулирующее влияние на синтез и секрецию вазопрессина и различного типа рецепторы серотонина вовлекаются в регуляцию жажды и солевого аппетита. В свою очередь, вазопрессинергическая система активирует метаболизм серотонина в гипоталамусе.

Таким образом, при гиперосмии и гиповолемии вазопрессинергическая и серотонергическая системы мозга взаимодействуют в процессе реализации осморегулирующих реакций, обеспечивая изменения концентрирующей функции почек, адекватные ситуации.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 01-04-49526), ведущие научные школы (грант № 00-15-97974).

## Действие ретаболила на содержание 5-метилцитозина в ДНК почек и сердечной мышцы крыс

**Н.В. Кляшева**

**Чувашский государственный университет, г. Чебоксары**

Известно, что стероид-рецепторные комплексы имеют повышенное сродство к определенным участкам ДНК, которые активируются и стимулируют транскрипцию соседних генов, продукты которых действуют на другие гены и вызывают более поздний вторичный ответ. Однако тончайшие механизмы воздействия анаболиков на геном клеток эукариот остаются на сегодняшний день до конца не выясненными. Метилирование цитозина в ядерной ДНК видоспецифично, тканеспецифично, изменяется в онтогенезе, при действии экстремальных физических факторов, лекарственных препаратов и т. д. (Ванюшин Б.Ф., 1974; Жаворонкова Е.Н., Ванюшин Б.Ф., 1987). Известно, что более активные гены, содержащие ДНК, менее метилированы, а менее активные гены более метилированы (Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж. и др., 1994; Сингер М., Берг П., 1998).

Целью исследований явилось изучение содержания 5-метилцитозина (5-МЦ) в ДНК из почек и сердечной мышцы при введении ретаболила животным. Исследование провели на белых беспородных крысах-самцах (масса 200–230 г, возраст – 3 мес.). Животным опытной группы вводили внутримышечно ретаболил (19-нортестостерон-17β-деканоат, «Gedeon Richter», Венгрия) в дозе 1,0 мг/кг (в 4 приема в течение 1 месяца). Контрольным животным вводили стерильное оливковое масло в том же режиме.

Суммарные препараты ДНК получали из ядерной

фракции по методу Г.П. Бенинга (1969) с нашими изменениями без применения проназы. Хроматографические исследования проводили по методу Б.Ф. Ванюшина (1964, 1980). Содержание азотистых оснований определяли по величине оптической плотности методом СФ-метрии, применяли специальные коэффициенты для расчета и выражали в мол. %. Полученные результаты оценивали с помощью критерия Стьюдента.

Содержание 5-МЦ в ДНК из ядер сердечной мышцы в опыте по сравнению с контролем уменьшилось в 1,5 раза (соответственно  $1,10 \pm 0,12$  мол. % – в опыте и  $1,65 \pm 0,10$  мол. % – в контроле;  $p < 0,002$ ). В почках не было обнаружено достоверных изменений по содержанию 5-МЦ в ДНК при введении ретаболила ( $1,32 \pm 0,22$  мол. % – в опыте и  $1,20 \pm 0,15$  мол. % – в контроле;  $p > 0,05$ ).

На основании полученных результатов исследований можно сделать заключение о различиях процессов метилирования в сердечной мышце и почках крысы при введении ретаболила, о чем косвенно судили по содержанию 5-МЦ в ДНК. Не исключено, что указанные различия связаны с изменением активности (или доступности) 5-метилтрансфераз, метилирующих ДНК по цитозиновым основаниям, что может привести к изменениям в экспрессии генома клеток-мишеней указанных органов.

## Содержание некоторых медиаторов в интактных почках крыс

**В.А. Козлов, О.С. Глазырина, А.Ю. Толмачева**

**Чувашский государственный университет, г. Чебоксары**

Ранее работами школы Д.С. Гордон (1982) установлено, что в лимфоидных органах содержание катехоламинов (КА), серотонина (СТ) и гистамина (Г), сильно различается в феврале-марте и июле-августе. Для почек подобные данные были получены В.С. Смирновой (1974, 1976) в описательном исследовании без изучения количественных параметров, поскольку тогда это было невозможно.

**Цель исследования.** Изучить содержание ацетилхолина (АЦХ), КА, СТ и Г в различных отделах почки в осенне-зимний и летний периоды.

**Методы исследования.** Эксперименты проведены на криостатных срезах интактных почек 23 беспородных крыс обоего пола массой от 140 до 200 г. В срезах почек исследовано содержание АЦХ (по Козлову В.А. и соавт., патент № 2159433, 1999), КА и СТ (Фальк-Хилларп), Г (Кросс), флюориметр «ФМЭЛ-1А». В каждом срезе измерено по десять объектов (объектив ×40, окуляр ×10, зонд 1,5).

**Результаты исследования.** Максимальная интенсивность флюоресценции АЦХ обнаруживается в

Таблица 1

**Интенсивность флюоресценции аминов в почках интактных крыс,  $M \pm m$  ( $p < 0,0001$ )**

Время года		Ноябрь-февраль, n = 150	Июль-сентябрь, n = 50
КА	Субкапсулярные клубочки	$0,09 \pm 0,01$	$1,9 \pm 0,14$
	Юкстамедуллярные клубочки	$0,13 \pm 0,03$	$1,82 \pm 0,09$
	Проксимальные каналы	$0,18 \pm 0,02$	$3,9 \pm 0,35$
	Дистальные каналы	$0,12 \pm 0,1$	$3,15 \pm 0,19$
	Петли Генле	$0,06 \pm 0,01$	$0,95 \pm 0,06$
СТ	Субкапсулярные клубочки	$0,35 \pm 0,05$	$0,89 \pm 0,08$
	Юкстамедуллярные клубочки	$0,69 \pm 0,09$	$1,94 \pm 0,29$
	Проксимальные каналы	$0,47 \pm 0,04$	$2,59 \pm 0,21$
	Дистальные каналы	$0,64 \pm 0,07$	$2,02 \pm 0,19$
	Петли Генле	$0,23 \pm 0,03$	$0,61 \pm 0,04$
Г	Субкапсулярные клубочки	$0,45 \pm 0,08$	$3,5 \pm 0,42$
	Юкстамедуллярные клубочки	$0,69 \pm 0,1$	$7,56 \pm 1,09$
	Проксимальные каналы	$1,06 \pm 0,2$	$2,86 \pm 0,25$
	Дистальные каналы	$0,84 \pm 0,14$	$4,81 \pm 0,59$
	Петли Генле	$0,24 \pm 0,04$	$2,72 \pm 0,28$

субкапсулярных клубочках (СК) –  $11,8 \pm 0,9$  мВ (милливольт) и в проксимальных канальцах (ПК)  $14,6 \pm 0,9$ ; в юкстамедулярных клубочках (ЮК) –  $14,3 \pm 1,0$  ( $p < 0,01$  к СК), в дистальных канальцах (ДК) –  $12,6 \pm 0,8$ , а в петлях Генле (ПГ) –  $7,26 \pm 0,4$  мВ ( $p < 0,0001$  по отношению к ПК и  $p < 0,005$  по отношению к ДК). Выявлена высокая индивидуальная варибельность содержания АЦХ. При исследовании флюоресценции КА, С и Г содержание биоаминов в осенне-зимний период ( $n = 15$ ) было меньше, чем в летний ( $n = 5$ ).

Во всех случаях различия флюоресценции аминов

между ПК, ДК и ПГ достоверны ( $p < 0,001$ ). Наблюдается достоверная положительная корреляция между содержанием КА в различных отделах нефрона в разное время года –  $r = 0,87$  ( $p < 0,01$ ), между содержанием СТ –  $r = 0,73$  ( $p < 0,01$ ), между СТ и КА –  $r = 0,93$  ( $p < 0,01$ ). Достоверной корреляции между содержанием Г в различных отделах нефрона в разное время года не обнаружено ( $r = 0,16$ ).

**Выводы.** Несмотря на выраженные различия в содержании исследованных аминов в ноябре-феврале и июле-сентябре, их соотношение в различных отделах нефрона остается неизменным.

## Ультраструктурный и иммуноцитохимический анализ цитоплазматических источников аквапоринов в гранулярных клетках мочевого пузыря лягушки

**Я.Ю. Комиссарчик, Е.С. Снигиревская**  
Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург

Эпителий мочевого пузыря амфибий относится к типу вазопрессин-чувствительных непроницаемых эпителиев. Значительное увеличение его водной проницаемости при добавлении антидиуретического гормона (АДГ) – вазотоцина – сопровождается перестройками структуры апикальной мембраны гранулярных клеток, транспортирующих воду. С помощью метода замораживания-скалывания было показано, что на Р-поверхности скола апикальной мембраны появляются агрегаты внутримембранных частиц (ВМЧ), отсутствующие при исходно низкой водной проницаемости эпителия и представляющие собой мембранные домены, обладающие высокой водной проницаемостью и содержащие белки водных каналов – аквапорины. В настоящее время отсутствует единая точка зрения, касающаяся цитоплазматических источников этих белков. Полученные нами данные позволяют предположить, что источниками аквапоринов являются мембраны специфических гранул, сливающихся с апикальной мембраной при стимуляции водного транспорта.

Для идентификации мембран гранул с высокой водной проницаемостью, соответствующей участкам

апикальной мембраны, занятой агрегатами ВМЧ, было проведено иммуноэлектронно-микроскопическое изучение локализации аквапоринов в исследуемых клетках. В качестве первых антител были использованы моноклональные антитела к аквапоринам апикальной мембраны эпителиальных клеток собирательных трубок почки млекопитающих (AQP2), являющиеся так же, как и аквапорины апикальной мембраны гранулярных клеток мочевого пузыря лягушки, вазопрессин-регулируемыми. В качестве вторых антител использовались иммуноглобулины кролика, иммунизированного иммуноглобулинами мыши, конъюгированные с коллоидным золотом. Несмотря на низкую интенсивность иммунной реакции, локализация метки всегда носила специфический характер.

Как правило, частицы золота выявлялись только на апикальной мембране гранулярных клеток и на мембранах гранул.

Полученные данные подтверждают высказанную нами ранее гипотезу о доставке и встраивании аквапоринов в апикальную мембрану исследуемых клеток из мембран некоторого пула специфических гранул.

Работа поддержана грантом РФФИ № 00-04-49480.

## Функциональная морфология почек гибернантов

**В.А. Лавриненко, Л.В. Шестопалова**  
Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск

Угнетение жизнедеятельности организма, носящее сезонный циклический характер, особенно ярко выражено у грызунов, впадающих в зимнюю спячку. Адаптация к условиям гибернации сопровождается изменением многих физиологических параметров. В период зимней спячки снижается уровень окислительного метаболизма, значительные изменения претерпевает углеводный обмен, наблюдается резкое замедление частоты дыхательных движений, сердечных сокращений (Калабухов Н.И., Wang L.C.H.). Исключением не является и водно-солевой обмен. Так, переход в

торпидное состояние вызывает увеличение концентрации ряда ионов (магния, кальция, калия) в плазме крови, повышается концентрация мочевины в крови, возрастает осмоляльность внутренней среды (Fergen L.G., Монин Ю.Г., Гончаревская О.А.). Во время зимней спячки резко уменьшается количество мочи, а концентрация ее значительно возрастает.

Целью настоящей работы явилось изучение морфологических особенностей почек гибернантов на примере краснощекского суслика (*Citellus erythrogegnus Brandt*). Зимняя спячка у этого вида грызунов продолжается

7–8 месяцев в году. Исследовались почки животных, находившихся в состоянии активности (май, июнь) и торпидности (февраль). Использовались общепринятые гистологические методы и гистохимические приемы – метод Хейла и ШИК-реакция, позволяющие выявить гликозаминогликаны (ГАГ) разной природы.

При макроскопическом исследовании почек краснощеких сусликов в весенне-летний и зимний периоды на поперечном разрезе почки отчетливо различаются корковое и мозговое вещество с наружной и внутренней зонами. Сосочек широкий, но неудлиненный. В субкапсулярной полосе коры насчитывается примерно в три раза больше клубочков, чем в юкстамедуллярной зоне. Почечные тельца активных грызунов имеют отчетливо выраженную подкапсулярную щель, кровеносные капилляры довольно широкие, сосудистый клубочек выглядит рыхлым. Переход в состояние гибернации приводит к изменению почечных телец, отмечается увеличение щели и уплотнение клубочка. Подобные изменения могут быть связаны со снижением клубочковой

фильтрации и уменьшением выделяемой мочи. Канальцевые структуры имеют строение, типичное для почки млекопитающих. В активный период в почке кислые ГАГ выявляются в сосудистом клубочке и в виде апикальной выстилки в восходящих отделах петель Генле, дистальных канальцах и некоторых собирательных трубках. В средней трети сосочка Хейл-позитивный материал обнаружен в интерстиции. У спящих сусликов кислые ГАГ практически не обнаруживаются, за исключением сосудистых клубочков. ШИК-положительную реакцию дают базальные мембраны на протяжении всего нефрона, выявляется некоторое количество зернистости в собирательных трубках. Значительно увеличивается содержание ШИК-позитивной зернистости в мозговом слое почки у спящих животных, что, возможно, свидетельствует о накоплении гликогена. Эти изменения, по-видимому, связаны с блокированием углеводного обмена во время зимней спячки.

## Молекулярные механизмы развития гормональной чувствительности к альдостерону дистальных сегментов почек крыс в постнатальном онтогенезе

**Н.С. Логвиненко**

**Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск**

Известно, что в раннем онтогенезе почки незрелорожденных животных, в том числе и крыс, не отвечают повышением реабсорбции натрия в ответ на введение альдостерона. Гормональная компетентность по отношению к альдостерону развивается только к концу вининга, примерно к 20-му дню жизни, когда животные переходят на смешанное питание. Однако причины отсутствия чувствительности почек к альдостерону в раннем онтогенезе до сих пор не известны.

Целью настоящего исследования явилось изучение возрастных особенностей рецепции альдостерона в почках крыс, а также регуляции альдостероном экспрессии и активности натриевого насоса в постнатальном онтогенезе.

Проведено изучение специфического связывания  $^3\text{H}$ -альдостерона в полученных методом микродиссекции фрагментах дистального извитого канальца и кортикальной собирательной трубки. Для блокады глюкокортикоидных рецепторов использовался синтетический глюкокортикоид RU-38486 ( $10^{-7}$  М; «Rassel Uclaf», Франция). Обнаружено, что величина специфического связывания альдостерона в этих отделах нефрона достоверно не отличается у 10-дневных и взрослых животных. Полученные данные свидетельствуют о том, что отсутствие гормональной компетентности почек 10-дневных крысят может быть связано с незрелостью пострецепторных этапов в механизме действия гормона.

Изучение влияния альдостерона на экспрессию и активность  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы – одного из основных аль-

достерон-индуцируемых белков, опосредующих его внутриклеточную функцию – проводили через 11 часов после начала гормональной индукции. Адреналэктомизированным животным вводился альдостерон (5 мкг/100 г веса тела каждые 3 часа) и альдостерон со спиронолактоном (12 мг/100 г веса тела). Методом Нозерн-блот и рт-ПЦР проводили анализ уровня экспрессии альфа- и бета-субъединиц  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы; гидролитическую активность натриевого насоса изучали с помощью гидролиза АТФ. Было показано, что как на уровне регуляции экспрессии субъединиц  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы, так и на уровне регуляции активности зрелого белка, встроенного в клеточную мембрану, механизм гормональной индукции имеет свои возрастные особенности. Установлено, что спиронолактон, ингибирующий эффект альдостерона в почках взрослых крыс на уровне взаимодействия с рецепторами первого типа, не проявляет своего действия в у 10-дневных животных. В результате проведенного исследования можно сделать вывод о том, что одной из основных причин отсутствия реакции незрелой почки на альдостерон может служить отсутствие  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы в спектре индуцируемых белков, регуляция которых осуществляется через взаимодействие гормона с минералокортикоидными рецепторами. На основании собственных и литературных данных предлагается модель молекулярных механизмов действия альдостерона на функцию натриевого насоса в дистальных сегментах почки крысы.

Работа поддержана грантом РФФИ № 02-04-49886.

## Особенности транспорта калия в тонком и толстом кишечнике крыс

С.Н. Луканина

Новосибирский государственный педагогический университет, г. Новосибирск

Целью настоящей работы являлось изучение особенностей транспорта калия в тонком и толстом кишечнике крыс в условиях цеолитной диеты.

Исследование выполнено в серии острых экспериментов на взрослых самцах крыс линии Вистар. В пищу крыс экспериментальной (Э) группы добавляли цеолит Шивыртуйского месторождения (95% – клиноптилолит) из расчета 5% от массы корма. Контрольные (К) животные получали такой же корм без цеолитов. Изучение транспортных процессов через кишечную стенку проводили на 7-е сутки после начала приема цеолитов методом перфузии *in vivo*: выделенные участки тонкого (ТК) и дистального отдела толстого кишечника (ДОТК) в течение 20 минут перфузировали 1% раствором КСl. Для оценки влияния цеолитов на функционирование различных транспортных систем эпителиоцитов кишечника в отдельных сериях экспериментов использовали следующие ингибиторы: ортованадат натрия ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) (для подавления Р-АТФ-зависимых переносчиков), оубаин (для ингибирования апикальной  $\text{K}^+$ -АТФазы) и омепразол (для блокады апикальной  $\text{H}^+$ - $\text{K}^+$ -АТФазы).

При анализе экспериментального материала было

показано, что цеолитная диета значительно повышала содержание калия в просвете ТК и ДОТК (табл. 1). Использование блокаторов в группе К вызывало аналогичный эффект. Вероятно, природные цеолиты, поступая в ЖКТ с пищей, подавляют интенсивность работы  $\text{K}^+$ -абсорбирующих транспортных механизмов.

Применение блокаторов транспортных механизмов на фоне цеолитной диеты практически не вызывало изменения содержания калия в кишечнике по сравнению с экспериментом без блокады ионных насосов (табл. 1). Отсутствие эффекта от ингибиторов в условиях цеолитной диеты, вероятно, можно объяснить тем, что цеолиты, поступающие в организм с кормом, подавляли  $\text{K}^+$ -насосы в такой степени, что блокаторы на этом фоне не проявляли своей активности.

Цеолиты практически не влияли на ионоосмотические показатели плазмы крови воротной вены печени и нижней полой вены, а также на водно-электролитный состав тканей печени, скелетной мускулатуры и перфузируемых участков кишечника.

Таким образом, природные цеолиты снижают абсорбцию калия в кишечнике за счет подавления активности апикальных  $\text{K}^+$ -абсорбирующих транспортных систем эпителиоцитов.

Таблица 1

Влияние природных цеолитов на содержание  $\text{K}^+$  в перфузате тонкого кишечника и ДОТК (мкмоль/1 г сухого веса) ( $M \pm m$ )

Группы животных	Без блокаторов		$\text{Na}_3\text{VO}_4$		Оубаин		Омепразол	
	ТК	ДОТК	ТК	ДОТК	ТК	ДОТК	ТК	ДОТК
К (n = 6)	-1094,5 ± 108,7	-1539,5 ± 173,7	-467,7 ± 45,0*	-705,6 ± 93,2*	-332,8 ± 44,3*	-294,4 ± 61,7*	-451,8 ± 41,7*	-582,6 ± 56,1*
Э (n = 6)	-398,7 ± 33,6*	-790,9 ± 130,0*	-542,4 ± 36,9*	-876,9 ± 107,6	-622,7 ± 59,7*	-997,1 ± 154,2*	-349,6 ± 27,7	-659,9 ± 34,6

\* Достоверные отличия между контрольными и экспериментальными животными.

\* Достоверные отличия по сравнению с результатами серии без блокаторов.

## Реализация осморегулирующих реакций в условиях подавления и активации метаболизма серотонина

Н.Н. Мелиди, Л.Н. Кочкаева

Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск

Ведущая роль в системе поддержания водного баланса у млекопитающих принадлежит гормону нейрогипофиза вазопрессину, регулирующему водовыделительную функцию почки. В последние годы появились работы, свидетельствующие о том, что в контроль секреции вазопрессина может быть вовлечен серотонин. В связи с этим в настоящей работе изучалось влияние подавления или активации метаболизма серотонина на развитие осморегулирующих реакций, осуществляемых при участии вазопрессина. В экспериментах на крысах линии Вистар установлено, что подавление уровня серотонина путем внутрибрюшинного введения блокатора его синтеза, п-хлорфениланина, в

дозе 300 мг/кг веса тела за 48 часов до опыта не отразилось на характере изменений показателей почечной функции, вызванных водной нагрузкой. Повышение содержания серотонина в мозге путем введения его предшественника, 5-гидрокситриптофана (50 мг/кг веса тела), одновременно с введением водной нагрузки приводило к быстрому падению диуреза вследствие резкого нарастания реабсорбции осмотически свободной воды в почечных канальцах. При гипертонической нагрузке (2% раствора хлорида натрия) диурез был обусловлен торможением реабсорбции натрия в почечных канальцах, на фоне возросшего уровня реабсорбции осмотически свободной воды, т.



е. на фоне стимуляции секреции вазопрессина. В этих условиях повышение уровня серотонина оказалось неэффективным. Полученные данные расцениваются как свидетельство вовлечения серотонергической системы в регуляцию водного баланса организма и

стимулирующего влияния серотонина на синтез и секрецию вазопрессина.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 01-04-49526); «Ведущие научные школы» (грант № 00-15-97974).

## Особенности морфологической структуры и взаимосвязей показателей гидро- и натрийуретической функций почек с сохранной и нарушенной иннервацией у крысят разного возраста

**Я.Л. Муравьева**

**Новосибирский государственный педагогический университет, г. Новосибирск**

Выяснению влияния нервов почки на деятельность этого органа посвящены многочисленные исследования. Тем не менее онтогенетический аспект этой проблемы недостаточно ясен. Нами были сопоставлены результаты исследования структуры почки с данными о взаимосвязях показателей гидроуретической и натрийуретической функций этого органа у 25- и 35-дневных крысят контрольной (25К, 35К), ложнопериоперированной (25Л, 35Л) и денервированной (25Д, 35Д) групп в условиях спонтанного мочеотделения и через один час после введения водной нагрузки в объеме 50 мл/кг массы тела.

В условиях спонтанного мочеотделения у 25Д в отличие от 25К и 25Л наблюдается повышение скорости клубочковой фильтрации (СКФ), натрийуреза ( $U_{Na}V$ ) и клиренса натрия на 48,8, 45,5 и 50,5% соответственно. Диурез ( $V$ ), относительная реабсорбция жидкости ( $\%R_{H_2O}$ ) и экскретируемая фракция натрия ( $\%EF_{Na}$ ) у 25К, 25Л и 25Д одинаковы. Для всех трех групп характерны отрицательные корреляции между СКФ и  $\%EF_{Na}$ , но у 25Д повышение СКФ приводит к меньшему, чем у других групп, изменению  $\%EF_{Na}$  (25К:  $y = -0,865x + 14,573$ ; 25Л:  $y = -1,789x + 27,816$ ; 25Д:  $y = -0,472x + 13,376$ ). Связь между  $\%R_{H_2O}$  и  $U_{Na}V$  характерна для 25К ( $y = -5,166x + 521,33$ ) и 25Л ( $y = -1,623x + 229,74$ ), у 25Д она отсутствует. Эти данные могут говорить об уменьшении у 25Д чувствительности механизма клубочково-канальцевого равновесия и снижении роли проксимальной реабсорбции в экскреции натрия из-за угнетения активного транспорта ионов в проксимальных канальцах. Действительно, почка 25Д отличается от 25К и 25Л не только разрыхлением петель капилляров части клубочков почечных телец (КПТ). У 25Д признаки функционального напряжения (расширение просветов, белковая зернистая дистрофия эпителия) более выражены, чем у 25К и 25Л, не только в проксимальных (ПК), но и в дистальных канальцах (ДК) и собирательных трубках (СТ). Возможно, усиление дистальной реабсорбции натрия у 25Д еще не способно компенсировать ослабления его реабсорбции в ПК, что и приводит к повышению  $U_{Na}V$ . На первом часе после введения нагрузки 25Д отличаются от контроля лишь более высоким натрий-калиевым коэффициентом и пониженной экскрецией калия. Гидроурез сопровожда-

ется исчезновением корреляции между СКФ и  $\%EF_{Na}$  у всех трех групп. Связь между  $\%R_{H_2O}$  и  $U_{Na}V$  сохраняется только у 25К ( $y = -4,228x + 402,6$ ). При этом у 25К наблюдается уменьшение КПТ за счет расширения капсул Шумлянско-Боумана (КШБ) и выраженное в равной мере расширение ПК и ДК с усилением белковой зернистой дистрофии эпителия. 25Л отличаются от 25К разрыхлением части КПТ, неравномерным расширением КШБ, резким расширением части ПК. У 25Д менее, чем у 25К и 25Л, выражены изменения почечных телец, но значительно расширены ПК и СТ, ярче выражена дистрофия эпителия.

В 35 дней при спонтанном мочеотделении фильтрационно-реабсорбционные процессы усиливаются: СКФ возрастает на 73,9%, а  $V$  и  $U_{Na}V$  не отличаются от 25К. На том же уровне, что и у 35К, показатели функции почек находятся у 35Л и 35Д. Ни у одной группы не выявляется корреляции между СКФ и  $\%EF_{Na}$ . Напротив,  $\%R_{H_2O}$  и  $U_{Na}V$  связаны у всех трех групп однотипно (35К:  $y = -9,97x + 898,66$ ; 35Л:  $y = -9,107x + 908,71$ ; 35Д:  $y = -8,704x + 882,1$ ). Тем не менее если у 35К и 35Л просвет КШБ, ПК и ДК щелевидный (что может говорить о возрастании транспортных возможностей нефроцитов), то 35Д характеризуются похожими на 25Д, хотя и менее выраженными изменениями структуры нефронов. На 1-м часе после введения нагрузки показатели функции почек у всех трех групп изменяются одинаково. Связь между  $\%R_{H_2O}$  и  $U_{Na}V$  исчезает у всех трех групп. У 35К просвет ПК расширен, особенно вблизи КПТ, а ДК остаются щелевидными. 35Л отличаются от 35К равномерным расширением не только ПК, но и ДК. Состояние нефронов у 35Д в условиях гидроуреза отличается от 35К очень ярко: сильно расширены КШБ и канальцы, особенно ПК, дистрофия эпителия выражена даже больше, чем у 25Д. Таким образом, на пике водного диуреза признаки большего, чем у других групп, функционального напряжения выражены не только в ПК, но и в ДК. Компенсаторным усилением дистальной реабсорбции может быть обусловлено равенство показателей гидро- и ионоуреза у 35К и 35Д.

## К учету характера методических подходов при изучении водно-солевого обмена у спинальных животных

**Г.Г. Мусалов**

**Дагестанская государственная медицинская академия, г. Махачкала**

Сорокалетний опыт работы коллектива кафедры со спинальными животными (СЖ) подсказывает обязательность соблюдения ряда условий для получения объективных показателей состояния у них функций почек и водно-солевого гомеостаза. Так, при анализе результатов исследований на СЖ должно быть оговорено:

1. Сбор мочи осуществляется через фистулу или катетеризацией мочевого пузыря. И в том, и в другом случае обязательно не менее чем 3-разовое (в сутки) освобождение пузыря открытием фистулы или осторожным выжиманием его содержимого. В противном случае из-за нарушения работы сфинктеров в результате спинальной травмы (рефлекторная анурия) развивается застой в мочевыводящих путях, что, несомненно, усугубляет патологический процесс и ускоряет наслоение морфологических изменений на морфофункциональные сдвиги.

2. При травме спинного мозга (СМ) резко ослаблен процесс адаптации к условиям среды, в частности и к условиям эксперимента. Отсюда, важно соблюдать плавность перехода работы со спонтанного диуреза на разовую или восполняемую водную или водно-солевую нагрузки: учитывать, что при содержании СЖ в условиях жажды (да и в других случаях) возможно проявление мотивационных срывов, таких, как питье собственной мочи.

3. При изучении реакции СЖ на водно-солевые нагрузки важно соблюдать не менее чем недельный интервал между опытами, при этом систематически взвешивать животных, а повторное исследование начинать на фоне достижения исходного веса (или меньше

такового), контролируя состояние тканей (возможна их отечность из-за нервно-трофических расстройств).

4. Следует учитывать, что при травме СМ возрастает порог для проявления эффектов эндо- и экзогенных вазопрессина и окситоцина; кортизон и др. гормоны не вызывают увеличения диуреза, экскреции электролитов, скорости клубочковой фильтрации в тех дозах, которые значимо повышают эти показатели у интактных животных, т. е. речь идет о неадекватных реакциях на гормоны.

5. В ходе исследования парциальных функций почек, размеров спонтанного, водного, солевого диуреза у СЖ выявляются повторяющиеся с определенной закономерностью от животного к животному (не всегда адекватно стандартному водно-солевому режиму) периоды спада, подъема или нормализации названных параметров после травмы СМ. Недоучет фактора фазности по обсуждаемой проблеме и приводит к разноречиям в сведениях литературы по состоянию водно-солевого обмена и функций почек у СЖ.

6. Используя модель нарушения водно-солевого обмена – полную поперечную перерезку спинного мозга, предложенную А.Г. Гинецинским (1956), учитывая приведенные выше методические подходы и соблюдая особенности условий эксперимента на СЖ, коллектив нашей кафедры получил результаты, учет которых важен не только в эксперименте, но и в клинике, при ведении спинальных больных, особенно если учесть, что повреждения СМ остаются наиболее опасными для жизни человека осложнениями уличного, промышленного и военного травматизма, а исход травмы определяется, прежде всего, урологическими осложнениями.

## Вазопрессин: обновление пула в организме и механизм действия

**Ю.В. Наточин**

**Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, г. Санкт-Петербург**

Измерение ряда физико-химических показателей сыворотки крови у человека и некоторых позвоночных животных показало, что одной из наиболее строго контролируемых констант жидкостей внутренней среды является осмоляльность сыворотки крови. Коэффициент вариаций этого параметра у здорового человека составляет около 1%. От осмоляльности крови зависит объем каждой клетки, основная роль в осморегуляции принадлежит антидиуретическому гормону (АДГ – аргинин-вазопрессин, аргинин-вазотоцин, лизин-вазопрессин и др.). Проведенные в нашей лаборатории микропункционные исследования показали, что этот же гормон усиливает реабсорбцию ионов натрия в начальном отделе дистального сегмента нефрона, обеспечивается положительный баланс натрия и увеличение объема внеклеточной жидкости.

АДГ можно рассматривать как *гормон стабилизации объема клетки и объема внеклеточной жидкости*. Необычно организована и клеточная система реализации эффекта этого гормона, в которой он служит и триггером, и модулятором. При действии на клетки осморегулирующего эпителия (собираательные трубки, кожа и мочевой пузырь бесхвостых амфибий) АДГ при участии  $V_2$ -рецепторов способствует образованию цАМФ и встраиванию аквапорина-2 в люминальную мембрану. Этот триггерный эффект АДГ находится под действием ряда модулирующих влияний, включающих стимуляцию  $V_1$ -рецепторов, секрецию простагландинов, веществ, воздействующих на образование цГМФ, изменение активности фосфодиэстераз и др. Клетки осморегулирующего эпителия способны в ответ на изменение их объема вырабатывать аутоактоиды, ме-

няющие реакцию на АДГ. Существенное значение имеет скорость обновления пула АДГ в организме, поскольку кроме секреции АДГ нейрогипофизом, иногда имеется еще несколько дополнительных источников поступления гормона в кровь. К ним относится его избыточная секреция в кровь при ряде патологических состояний (пневмония, SIADH), всасывание АДГ в тонкой кишке из пищи. Эксперименты на крысах *in vivo* с введением АДГ *per os*, опыты с изолированной петлей тонкой кишки, в которую вводили АДГ, показали возможность всасывания в нерасщепленном виде физиологически активного АДГ (вазопрессин, вазотоцин). Используя разработанный нами метод определения АДГ (чувствительность  $10^{-12}$  М), была показана прямая зависимость между количеством вводимого в кишку АДГ и его всасыванием через стенку тонкой кишки. Поскольку одним

из органов гидролиза полипептидов ультрафильтрата плазмы является почка, эти результаты позволяют предположить ее важную роль в постоянной инактивации АДГ крови, независимо от источника гормона. Это обусловлено высокой гидролитической активностью клеток проксимального канальца, которые дополняют функции эпителия тонкой кишки для гидролиза тех пептидов, которые поступают в кровь. Полученные результаты свидетельствуют о значении метаболической функции почки в осуществлении ряда ее функций, в том числе участия в осморегуляции и волюморегуляции.

*Благодарность.* Работа поддержана РФФИ (грант № 02-04-48065) программой «Ведущие научные школы» (грант № 00-15-97771), Минпромнауки (гос. контракт № 43.004.11.1519), программой президиума РАН.

## Физиологическая регуляция водной проницаемости базолатеральной мембраны эпителиальных клеток собирательной трубки наружного слоя мозгового вещества почки крысы

**В.В. Нестеров\*, Г.С. Батурина, Г.Р. Ходус, Е.И. Соленов, Л.Н. Иванова**  
Институт цитологии и генетики СО РАН,

\* Новосибирская государственная медицинская академия, г. Новосибирск

Хорошо известно, что трансэпителиальная водная проницаемость собирательных трубок млекопитающих регулируется антидиуретическим гормоном аргинин-вазопрессином (AVP), который вызывает встраивание водных каналов AQP2 в апикальную мембрану главных клеток. Гораздо меньше известно о возможной физиологической регуляции базолатеральной мембраны этих клеток, хотя в литературе имеются данные об увеличении экспрессии мРНК и белка AQP3 при дегидратации животных. Кроме того, недавно были получены данные о транспорте AQP2 не только в апикальную, но и в базолатеральную мембрану. Эти факты позволяют задать вопрос: не является ли водная проницаемость базолатеральной мембраны объектом физиологической регуляции?

Коэффициент кажущейся водной проницаемости ( $P_f$ ) базолатеральной мембраны измерялся на изолированных фрагментах собирательных трубок наружного слоя мозгового вещества (OMCD), выделенных из почек дегидратированных или гипергидратированных крыс. Во второй группе экспериментов мы оценивали изменения базолатеральной  $P_f$  в ответ на стимуляцию вазопрессиновых рецепторов V2-типа. В этих экспериментах  $P_f$  измерялась на фрагментах OMCD, полученных от гипергидратированных животных, в нестимулированных условиях и после 30-минутной инкубации с агонистом V2-рецепторов dDAVP ( $10^{-7}$  М).

Водная проницаемость дегидратированных животных была достоверно выше, чем у гипергидратированных ( $126,0 \pm 9,7$  против  $54,1 \pm 4,4$  мкмоль/с,  $p < 0,001$ ), инкубация с препаратами ртути резко понижала  $P_f$  в обоих случаях ( $38,0 \pm 6,6$  мкмоль/с,  $p < 0,001$ ).

Инкубация изолированных OMCD с dDAVP также достоверно повышала проницаемость базолатеральной мембраны ( $111,8 \pm 16,14$  против  $54,1 \pm 4,4$  мкмоль/с,  $p < 0,001$ ), ртуть подавляла водную проницаемость до  $38,0 \pm 6,6$  мкмоль/с, после отмывки ртути  $P_f$  восстанавливалась до контрольного уровня.

Далее было предпринято исследование возможных механизмов повышения  $P_f$  под действием вазопрессина. Полуколичественным RT-PCR оценивали содержание мРНК V2-рецептора, а также водных каналов AQP2, 3 и 4 во внешнем и внутреннем мозговом веществе дегидратированных и гипергидратированных животных. У дегидратированных животных экспрессия мРНК AQP2 и AQP4, а также рецептора V2 достоверно выше как во внешнем, так и во внутреннем мозговом веществе. Экспрессия AQP3 при дегидратации увеличивалась во внутреннем мозговом веществе. Таким образом, причиной повышения  $P_f$  базолатеральной мембраны клеток эпителия собирательных трубок может быть увеличение экспрессии любого из этих аквапоринов. Значительный эффект ртути в наших экспериментах указывает, что наибольшее значение для этой реакции имеют ртуть-чувствительные каналы. Достоверный эффект острой инкубации с dDAVP позволяет предположить, что некоторые негеномные механизмы действия вазопрессина участвуют в регуляции базолатеральной водной проницаемости. В этой регуляции также участвуют преимущественно ртуть-чувствительные пути. Таким образом, водная проницаемость базолатеральной мембраны клеток эпителия собирательной трубки почки крысы, по-видимому, является объектом физиологической регуляции.

## Роль цГМФ-зависимых сигнальных механизмов в регуляции транспорта воды в осморегулирующем эпителии

**Р.Г. Парнова, Е.М. Фок, Е.А. Лаврова, В.Т. Бахтеева, Е.В. Черниговская**  
**Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, г. Санкт-Петербург**

В последнее десятилетие достигнуты огромные успехи в изучении роли цГМФ как сигнальной молекулы в реализации эффектов различных биологически активных веществ. Мишенями его внутриклеточного действия являются цГМФ-зависимые фосфодиэстеразы (ФДЭ), специфические протеинкиназы (ПКГ) и ионные каналы. Поскольку до сих пор мало что известно об участии цГМФ-зависимых механизмов в регуляции транспорта воды в осморегулирующем эпителии, в экспериментах на изолированном мочевом пузыре лягушки в данной работе была предпринята попытка изучить функциональную роль и механизмы реализации данных сигнальных процессов в клетке. Нами было изучено действие двух цГМФ-мобилизующих агентов, активирующих цитозольную или мембранную гуанилатциклазу (ГЦ): донора NO нитропруссид натрия (НПН) и атриального натрийуретического фактора (АНФ). НПН в концентрациях от 150 до 250 мкМ тормозил увеличение осмотической проницаемости, стимулированной аргинин-вазотоцином (АВТ); его эффект проявлялся только в присутствии запринаста, ингибитора фосфодиэстеразы (ФДЭ) типа V, расщепляющей цГМФ, и не снимался при добавлении ингибиторов цГМФ-активируемой ФДЭ II. Функциональное действие НПН сопровождалось увеличением цГМФ в ткани мочевого пузыря, но не влияло на уровень цАМФ. Ингибитор цитозольной ГЦ, ODC (25–100 мкМ), вызывал усиление гидросмотического действия АВТ, тогда как проникающий аналог цГМФ, 8-рСРТ-сGMP, являющийся специфическим активатором протеинкиназы G, ингибировал действие гормона. Иммуногистохимия срезов мочевого пузыря с использованием антител к

различным типам NO-синтазы (NOS) выявила экспрессию нейрональной NOS в клетках слизистой оболочки. Другой цГМФ-мобилизующий агент, АНФ ( $5 \times 10^{-8}$  М и выше), в присутствии изобутилметилксантина или запринаста вызывал дозо-зависимое усиление АВТ-стимулированного транспорта воды. Так же, как и НПН, АНФ вызывал увеличение уровня цГМФ в ткани пузыря, однако в отличие от стимулятора цитозольной ГЦ приводил к резкому увеличению концентрации цАМФ. Измерение активности аденилатциклазы фракции плазматических мембран показало, что наблюдаемый эффект АНФ не связан с изменением активности этого фермента. Совокупность этих данных свидетельствует о том, что в мочевом пузыре лягушки цГМФ, продуцируемый цитозольной формой ГЦ, тормозит АВТ-стимулированное увеличение осмотической проницаемости, действуя, вероятно, напрямую через активацию ПКГ. По крайней мере, одним из активаторов данного сигнального пути является эндогенный NO. Мишенью действия цГМФ, образуемого в клетках мочевого пузыря при АНФ-индуцированной активации мембранной формы ГЦ, является цГМФ-ингибируемая ФДЭ типа III, торможение активности которой приводит к увеличению уровня цАМФ и как следствие – к усилению действия АВТ на транспорт воды. Таким образом, эффекты цГМФ в клетках мочевого пузыря лягушки являются строго компартиментализованными и имеют различные мишени своего сигнального действия. Этот факт позволяет обеспечивать цГМФ разнонаправленные функциональные влияния – тормозить или усиливать действие антидиуретического гормона в увеличении осмотической проницаемости.

Работа поддержана грантом РФФИ (№ 03-04-49772).

## Анализ роли аутокоидов в регуляции проницаемости для воды эпителия мочевого пузыря лягушки

**Н.П. Пруцкова**  
**Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, г. Санкт-Петербург**

Мочевой пузырь лягушки обладает в исходном состоянии низкой осмотической проницаемостью, составляющей  $0,07 \pm 0,02$  мкл/мин  $\square$  см<sup>2</sup>. В регуляции проницаемости эпителия для воды участвует АДГ и аутокоиды, образующиеся в клетках мочевого пузыря. Задачей настоящей работы явилось изучение роли аутокоидов в восстановлении проницаемости после действия АДГ. Опыты поставлены на мочевых пузырях самцов лягушек *Rana temporaria* L. Мочевые пузыри, заполнявшиеся гипотоническим раствором Рингера, помещали в термостатируемые сосуды с аэрируемым раствором Рингера. Одна из долей мочевого пузыря каждой лягушки служила контролем для сравнения

с результатами экспериментальных воздействий на другую долю. Исследована динамика восстановления водонепроницаемости эпителия мочевого пузыря лягушки после повышения исходной осмотической проницаемости при действии аргинин-вазотоцина или десмопрессина. Показано, что после прекращения удаления секретируемых клетками аутокоидов благодаря периодической смене раствора Рингера со стороны серозной оболочки, система автономной клеточной регуляции быстро обеспечивает восстановление уровня аутокоидов, необходимого для снижения проницаемости для воды при отсутствии АДГ. Изучение характера восстановления водонепроницаемости после различных способов повышения потока воды свидетельствует

о том, что для восстановления водонепроницаемости функционально более значимо прекращение гормон-рецепторных взаимодействий, чем накопление аутоакоидов.

*Благодарность.* Работа поддержана РФФИ (грант № 02-04-48065), программой «Ведущие научные школы» (грант № 00-15-97771), Минпромнауки (гос. контракт № 43.004.11.1519), программой президиума РАН.

## Трансформированные стероиды – потенциальные регуляторы водно-солевого обмена

**В.М. Ржезников, Л.Е. Голубовская, О.Н. Минайлова**  
**Институт экспериментальной эндокринологии Эндокринологического научного центра РАМН, г. Москва**

В результате многолетних исследований по химии трансформированных стероидов было показано, что путем изменения структуры природных гормонов возможно получение продуктов с резко измененными свойствами.

Особые успехи были достигнуты в синтезе трансформированных кортикостероидов. Введение фтора в положение 9 $\alpha$  молекулы кортизола усиливает задержку натрия в 50 раз по сравнению с исходным кортизолом, а 9 $\alpha$ -фтор-2 $\alpha$ -метилкортизол превосходит кортизол по этому показателю в 90 раз (Физер Л., Физер М. Стероиды. М.: Мир, 1963: 618).

Важно, что химической трансформацией структуры стероида можно не только усилить или ослабить его ак-

тивность, но и получить новые свойства, не отмеченные для этого типа соединений.

В лаборатории химии стероидов ИЭЭ ЭНЦ РАМН проводились работы по синтезу и структурно-функциональному анализу трансформированных стероидов. Представлены исследования в ряду стероидных нитратов. Отмечена роль стерического фактора-конфигурации о-нитрогруппы, положения заместителя в стероидной молекуле, участия соседних групп в изменении активности стероида.

Обсуждаются механизмы проявления активности различных стероидных нитратов, включающие в том числе взаимодействие с рецепторами к стероидным гормонам, а также с рецепторами к важному биорегуляторам, влияющим на проводимость ионных каналов.

## Влияние индапамида на проницаемость стенки мочевого пузыря лягушки для уранина

**О.В. Самокрутова, И.И. Мунина**  
**Самарский государственный медицинский университет, г. Самара**

В лечении гипертонической болезни широко используется препарат индапамид, сочетающий в себе свойства блокатора кальциевых каналов и салуретика. Последний эффект препарата мало изучен. Одним из аспектов механизма действия диуретиков является их влияние на проницаемость межклеточных промежутков для обратных «шунтирующих» потоков ионов из интерстиция в просвет почечного канальца. Исследования, проведенные на кафедре фармакологии СамГМУ, показали, что подобным эффектом обладают маннит, этакриновая кислота, гидрохлортиазид.

**Целью** исследования явилось изучение влияния индапамида на проницаемость стенки мочевого пузыря лягушки для уранина, молекулы которого переносятся только по межклеточным промежуткам. Стенка мочевого пузыря лягушки может служить моделью почечного канальца. Поэтому, изучив транспорт уранина через стенку мочевого пузыря под действием индапамида, мы можем сделать вывод о влиянии препарата на проницаемость межклеточных промежутков нефрона.

**Методы исследования.** Фиксированный на стеклянной трубке мочевой пузырь наполнялся раствором уранина в концентрации 100 мг% и помещался

в аэрируемую кювету, содержащую раствор Рингера. При этом уранин двигался по градиенту концентрации в направлении от мукозной поверхности к серозной. Во второй серии экспериментов опыты проводились на вывернутых мочевых пузырях, и перенос маркера осуществлялся от серозной поверхности к мукозной. Нарастание концентрации уранина в омывающем растворе оценивали спектрофлуориметрически по интенсивности роста кривой флюоресценции. При этом рассчитывали тангенс угла, образованного кривой флюоресценции и направлением движения ленты самописца. Флюоресценцию уранина возбуждали светом длиной волны 493 нм. В каждом опыте после регистрации уровня флюоресценции в контроле из мочевого пузыря удалялся раствор уранина и вводилась новая порция маркера с добавлением индапамида в концентрации 1 ммоль/л (метод разработан на кафедре фармакологии под руководством А.А. Лебедева).

**Результаты** опытов приведены в табл. 1. При обработке результатов мы применили разностный метод, то есть в таблице приведены не абсолютные значения  $\text{tg } \alpha$ , а прирост в опыте по сравнению с контролем ( $\Delta m \pm m$ ).

Индапамид увеличивает проницаемость стенки

Таблица 1

**Влияние индапамида на перенос уранина через стенку мочевого пузыря лягушки**

Направление градиента	Контроль (М)	Индапамид	
		30 мин ( $\Delta M \pm m$ )	60 мин ( $\Delta M \pm m$ )
Сероза → мукоза	3,42	$3,17 \pm 1,08$ $p < 0,05$	$2,81 \pm 1,64$ $p > 0,05$
Мукоза → сероза	3,24	$-0,58 \pm 0,88$ $p > 0,05$	$-0,91 \pm 1,08$ $p > 0,05$

мочевого пузыря лягушки для уранина только при направлении градиента концентрации от «серозы» к «мукозе» и не влияет на проницаемость при обратном направлении градиента. Переноса результаты модельных опытов на почечный каналец, можно предположить, что индапамид, действуя со стороны базолатеральных мембран почечного эпителия, увеличивает проницаемость межклеточных промежутков, а значит – может усиливать обратные «шунтирующие» потоки ионов из интерстиция в просвет канальца.

## Сборы лекарственных растений в лечении экспериментальной патологии почек

**Е.М. Санаров, В.М. Брюханов, Я.Ф. Зверев**

**Кафедра фармакогнозии, кафедра фармакологии Алтайского медицинского университета, г. Барнаул**

Заболевания почек широко распространены среди населения Алтайского края. На их долю приходится до 25% от общей обращаемости к врачу. При этом интерес к лекарственным растениям и их сборам, применяемым для лечения почечной патологии, постоянно растет. Несомненным достоинством фитотерапии является разнообразие биологически активных веществ, содержащихся в растениях, благодаря чему обеспечивается поливалентность фармакологических эффектов. Кроме того, для применения фитотерапевтических препаратов характерна низкая токсичность, дешевизна и возможность длительного применения без существенных сдвигов гомеостатических параметров организма.

Объектами нашего исследования явились сборы, составленные из 5–9 лекарственных растений, произрастающих на территории Алтайского края и широко используемых в народной медицине. Изучали их влияние на течение экспериментального гломерулонефрита. По итогам скрининговых исследований семи сборов для углубленного изучения были выбраны два, проявившие наиболее выраженное диуретическое, противовоспалительное и антимикробное действие.

Гломерулонефрит моделировали по классическому методу Masugi, в результате чего развивался диффузный цитотоксический гломерулонефрит, наиболее близкий к клиническим формам тяжелого нефрита человека. Основным критерием заболевания служил уровень суточной протеинурии. Кроме того, определяли скорость клубочковой фильтрации по креатинину и активность в моче лактатдегидрогеназы (ЛДГ), щелочной фосфатазы (ЩФ) и гамма-глутамилтрансферазы

(ГТТ). В наших экспериментах среднетяжелая форма заболевания развилась у 44% животных, легкая – у 34%, не заболело 22% крыс.

30-дневное введение отваров сборов в дозе 0,5 г/кг привело к значительному облегчению течения заболевания. При применении первого сбора наблюдалось не только улучшение качественных показателей почечной функции, но и благоприятное изменение динамики развития заболевания. Явные признаки болезни развились лишь у половины леченых животных. Не происходило значительного падения скорости фильтрации, уменьшалась ферментурия. Наиболее существенная положительная динамика характеризовала развитие протеинурии. Выделение белка с мочой было значительно меньшим, чем в контроле, и после 12-го дня болезни последовательно снижалось. Так что к концу периода наблюдения экскреция белка практически не отличалась от показателей контрольных животных. Поэтому неудивительно, что содержание общего белка плазмы у крыс, получавших сбор, к концу опыта было достоверно выше, чем в контроле.

Аналогичный, хотя и более слабый терапевтический эффект проявлялся и при использовании второго сбора. Количество заболевших животных было меньшим, уровень протеинурии и ферментурии – ниже в сравнении с контрольной группой, а скорость фильтрации и уровень общего белка в плазме превосходили контрольные показатели.

Таким образом, использованные сборы оказывают благоприятное влияние на течение экспериментального гломерулонефрита, а первый из них может быть рекомендован для клинических испытаний.

## Влияние диуретиков на транспортные процессы в толстом кишечнике

**И.В. Смирнов, А.В. Аладышев**

**Кафедра фармакологии Алтайского медицинского университета, г. Барнаул**

Известно, что мочегонные препараты изменяют не только транспорт жидкости, ионов, органических веществ в нефроне, но и обладают выраженным экстра-ренальным действием. В частности ранее в нашей лаборатории было показано, что фуросемид и этакриновая кислота в значительной степени изменяют процессы транспорта ионов и воды в проницаемом эпителии тонкого кишечника. Несмотря на то, что эти препараты относятся к одной фармакологической группе, т. н. «петлевых» диуретиков, вызываемые ими изменения в транспорте ионов и воды в различных участках тонкого кишечника не всегда были одинаковы.

В настоящей работе нами изучено влияние фуросемида и этакриновой кислоты на транспорт воды, ионов и глюкозы в плотном эпителии слепой кишки крыс в условиях *in vitro*. Изолированная слепая кишка белых беспородных крыс (массой 190–270 граммов) промывалась Кребс-бикарбонатным раствором, заполнялась 3 мл этого же раствора, содержащего фуросемид ( $2 \times 10^{-3}$  моль/л), этакриновую кислоту ( $10^{-4}$  моль/л), либо не содержащего препарата (контроль), и помещалась в пробирку с подогреваемым и оксигенируемым Кребс-бикарбонатным раствором. Через 30 минут измеряли количество жидкости в слепой кишке и определяли концентрацию натрия, калия, хлоридов, глюкозы, а также измеряли осмолярность.

Зная исходные и конечные показатели концентрации веществ, рассчитывали величины результирующих транспортных потоков.

В контрольных опытах наблюдался результирующий мукозно-серозно-направленный поток жидкости ( $6,11 \pm 2,085$  мкл/мин), натрия ( $1,16 \pm 0,250$  мкМ/мин), глюкозы ( $0,15 \pm 0,019$  мкМ/мин) и отсутствовал транспорт калия ( $-0,10 \pm 0,014$  мкМ/мин) и хлоридов ( $-0,03 \pm 0,340$  мкМ/мин). Осмолярность раствора составила  $242,8 \pm 4,49$  ммоль/л. Фуросемид не вызывал достоверных изменений транспорта жидкости, ионов и глюкозы, тогда как этакриновая кислота существенно изменяла показатели транспорта. Результирующий мукозно-серозный поток жидкости замедлялся до  $1,11 \pm 0,748$  мкл/мин ( $p < 0,05$ ). При этом скорость транспорта ионов составила: натрия  $-0,63 \pm 0,123$  мкМ/мин ( $p < 0,001$ ); калия  $-0,19 \pm 0,016$  мкМ/мин ( $p < 0,001$ ); хлоридов  $-1,31 \pm 0,407$  мкМ/мин ( $p < 0,05$ ). Транспорт глюкозы в слепой кишке под действием этакриновой кислоты не изменялся ( $0,16 \pm 0,026$  мкМ/мин), а осмолярность в просвете достоверно увеличивалась до  $256,8 \pm 3,46$  ммоль/л ( $p < 0,05$ ).

Полученные нами результаты свидетельствуют о существенных различиях в эффектах фуросемида и этакриновой кислоты на транспорт жидкости и ионов в слепой кишке крыс.

## Ультраструктурные изменения вакуолярной системы гранулярных клеток мочевого пузыря лягушки при АДГ-индуцированных водных потоках

**Е.С. Снигиревская, Я.Ю. Комиссарчик**

**Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург**

Стимуляция вазопрессином осмотических потоков воды вызывает ряд существенных изменений клеток. В частности значительные набухания гранулярных клеток мочевого пузыря амфибий и основных клеток собирательных трубок почки млекопитающих. Существенным изменениям подвергаются также внутриклеточные структуры: тубуловезикулярные элементы вакуолярной системы, основные элементы цитоскелета, аппарат Гольджи (аГ) и др.

В настоящей работе различными методами электронной микроскопии (метод ультратонких срезов, замораживание–скальвание, замораживание–замещение, иммуноцитохимия, анализ элементного состава и др.) исследовались структурные изменения указанных органоидов при АДГ-стимулированных водных потоках.

Для гранулярных клеток мочевого пузыря лягушки характерен хорошо развитый аГ. При исходно низкой водной проницаемости стенки мочевого пузыря аГ этих клеток состоит из цистерн, тубул, пузырьков и конденсированных вакуолей. При кратковременном

действии АДГ (5 мин) происходит фрагментация аГ на отдельные стопки цистерн – диктиосомы. Этот процесс в большой степени определяется микротрубочками, количество которых увеличивается в несколько раз. При этом воздействии часть цистерн аГ набухает. При максимальном водном потоке в исследуемых клетках появляются крупные вакуоли, к которым прилегают компоненты аГ: цистерны, мелкие гладкие и окаймленные пузырьки, а также элементы цитоскелета. Рентгеноспектральный анализ содержимого вакуолей показал резкое падение содержания в них ионов калия, в то время как концентрация этих ионов в цитоплазме остается равной 110–120 мМ.

Полученные результаты позволяют предположить, что аГ принимает непосредственное участие в формировании крупных вакуолей, появляющихся в гранулярных клетках при усилении водного потока. Анализ мембран цистерн аГ и мембран вакуолей методом замораживания–скальвания указывает на аналогичное распределение в них внутримембранных частиц (ВМЧ).

При использовании филипиновой метки для локализации холестерина показано, что мембраны вакуолей в отличие от других внутриклеточных мембран обогащены холестерином. Не исключено, что это обстоятельство определяет особенности проницаемости мембран вакуолей.

В докладе предполагается обсудить структурную и функциональную аналогию выявленных в гранулярных клетках при больших водных потоках крупных вакуолей и сократительных вакуолей некоторых простейших.

Работа частично поддержана грантом РФФИ № 00-04-49554.

## Вазопрессин и окситоцин как стрессорные гормоны-нейропептиды

**Т.С. Сулаквелидзе**

**Дагестанская государственная медицинская академия, г. Махачкала**

В последние годы стал очевидным характер полифункциональных влияний гормонов-нейропептидов вазопрессина (В.) и окситоцина (О.). Сообщают об их роли как «стрессовых и антистрессовых гормонов» (Gibbs, 1986; Uvnas-Moberg, 1977), относя к «традиционным пептидам стресса», а секретирующие их ядра и их связи – к формирующим центры реализации механизмов стресса (Bhattacharya, 1998; Фиделина, 1999, и др.)

В этой связи в настоящей работе анализируются результаты оценки уровней В. и О. в ситуациях стресса: на фоне быстрого и медленного кровопускания, жесткой (84-часовой) жажды, при инфузии животным водно-солевых растворов с большой скоростью ( $n = 78$ ). Другими методиками биотестирования и радиоиммуноанализа оценены уровни В. и О. в плазме крови и ликворе, полученных путем параллельных заборов.

Как и ожидалось, выброс В. в системную циркуляцию и ликвор под влиянием специфических для него стимулов (кровопускание, введение гипертонических растворов) значительно ( $p < 0,001$ ) возрастал с проявлениями после часовой инфузии стрессорных явлений – дрожи, реакций возбуждения, жадного питья и др. По Yoshida (1971), при названных ситуациях достигается своеобразный «потолок» в реакциях супраоптических и паравентрикулярных ядер по выбросу секрета. По нашим данным, в этих условиях освобождается только В., ибо концентрация О. в плазме и ликворе собак снижалась ( $p < 0,01$ ). Столь своеобразное соотношение в уровнях В. и О. выявлял, видимо, еще Theobald (1959), наблюдая антидиурез, но без увеличения маточной и молокоизгоняющей активности плазмы крови. После кровопускания уровни В. в системной циркуляции резко возрастали, а О. – либо практически не изменялись (на фоне быстрого кровопускания) или даже снижались ( $p < 0,01$ ) при медленной геморрагии. Создавалось впечатление, что О. «уступал место» В., который выбрасывался в жидкие среды организма при «осмотическом

шоке» и дефиците воды в больших количествах. Сложные реципрокные взаимодействия в «стресс»-условиях проявлялись и на уровне систем выброса В. и О. в ликворную систему. К примеру: если при переводе животных из условий обычной гидратации к жесткой жажде уровень О. в ликворе возрастал ( $p < 0,01$ ), то на фоне инфузии с большой скоростью 0,07 M NaCl он падал ( $p < 0,001$ ). При этом отмечался параллельный резкий рост ( $p < 0,001$ ) О. в плазме крови. О., видимо, «включал» ренальную и экстраренальные системы выделения и «избавлял» организм от «лишней воды», ибо перераспределение уровней О. в пользу системной циркуляции сопровождалось в наших опытах увеличением выведения жидкости ренальным и экстраренальными путями. Что касается В., то в опытах на крысах ( $n = 22$ ) инъекцией его в мозговые желудочки мы показали, что через ликвор В. включает стрессовую фазу водной депривации – мотивационное возбуждение, обеспечивающее поиск и потребление воды. Выявленная у животных противоположность в уровнях В. и О. в жидких средах в условиях наших опытов соотносится с данными, с одной стороны, о седативном, с другой – о возбуждающем действии О. и В. при физическом и эмоционально-болевым стрессах (Kerstin, 1997; Engelmann, 2000; и др.). Здесь в условиях, близких к экстремальным, важно удержать воду в мозговой ткани или освободить ее от избытка жидкости. Возможно, этим и объясняется выявленная нами сопряженность в изменении уровней В. и О. Из клинических наблюдений: у пациентов с ушибами головного мозга тяжелой степени, утраченным сознанием (иногда с последующей ретроградной амнезией) повышались ( $p < 0,05$ ) уровни В. и О. в плазме и ликворе. Высокие показатели О. в ликворе выявлены у больных с травматической эпилепсией, особенно ( $p < 0,05$ ) при давности заболевания 10–15 лет, при наличии признаков ликворной гипертензии и с повторяющимися в течение суток приступами судорог.



## Морфологические основы адаптации почки в условиях экспериментальной патологии

**С.В. Талалаев**

**Алтайский медицинский университет, кафедра гистологии, г. Барнаул**

Важной морфологической характеристикой функционального состояния нефронов вторичной почки млекопитающих является состояние эпителии канальцев, его высота. Основываясь на результатах данного исследования, можно говорить о нескольких возможных причинах ее изменения.

В первую очередь, это результат изменяющейся функциональной активности нефронов или их отдельных частей. В норме и особенно при повышении функциональной нагрузки при тех или иных вмешательствах возникают известные изменения размеров клеток: их увеличение в активном состоянии и некоторое уменьшение в состоянии относительного покоя. Имеющаяся незначительная вариабельность высоты эпителиоцитов канальцев нефронов в почках интактных и экспериментальных животных, в метанефросе которых присутствуют нефроны без видимых морфологических повреждений, является результатом последовательного чередования фаз относительного «покоя» и «работы».

Уменьшение высоты эпителии, в первую очередь проксимальных отделов, происходит из-за разрушения апикальных частей клеток вследствие либо прямого повреждающего действия факторов внешней среды, либо в результате повышенной функциональной нагрузки на клетки при обратной реабсорбции необычных компонентов первичной мочи, например крупномолекулярных белков, попадающих в просвет нефрона при гломерулонефрите.

Уплотнение эпителии может быть в случаях полного разрушения и слущивания отдельных эпителиоцитов с последующим восстановлением целостности выстилки канальца. Клетки, расположенные на границах поврежденного участка, перекрывают большую поверхность эпителии. При таком механизме восстановления они

утрачивают свою типичную форму в результате изменения линейных размеров высоты и ширины.

И наконец, снижение высоты эпителии может происходить за счет содержимого, находящегося в просвете нефрона, которое оказывает давление на стенку канальца. В таких случаях возникает механическое растяжение стенки канальца, что увеличивает его диаметр с соответствующим увеличением площади внутренней поверхности эпителии. Для сохранения непрерывности эпителии его клетки, увеличивая свою площадь, уменьшают высоту.

Подводя итог морфологии реактивных изменений эпителии нефрона, можно выделить несколько морфофункциональных состояний. В первую очередь, это те, которые отражают физиологическую норму. Такой эпителий встречается в нефронах интактных животных. Другое состояние эпителии нефронов имеет признаки повышенной функциональной нагрузки (введение диуретиков). Для него характерно частичное повреждение эпителиоцитов и усиление регенераторных процессов. Существующее определенное равновесие между разрушением и восстановлением клеток эпителии позволяет сохранить целостность эпителиальной выстилки нефрона, что позволяет ему выполнять ряд основных функций. И наконец, эпителий, в котором деструктивные процессы преобладают. Нефроны с таким эпителием присутствовали в почках при нефрите Масуги и пиелонефрите. Его регенераторные возможности не обеспечивали восстановление эпителиального пласта, что нарушало его целостность. Эти повреждения приводили к полному разрушению эпителии и канальца в целом. В конечном итоге они приводили к неспособности выполнять какие-либо функции.

## Исследование секреции почкой ангиотензин-превращающего фермента и его активности в ткани почек у крыс с разными типами вегетативного реагирования

**В.И. Федоров, О.П. Черкасова**

**Институт лазерной физики СО РАН, г. Новосибирск**

Нами впервые показано, что наряду с ренином почка секретирует в кровь ангиотензин-превращающий фермент. Так, у крыс-мезотоников активность ангиотензин-превращающего фермента в плазме оттекающей от почки венозной крови в 1,5 раза выше, чем артериальной, что сопоставимо с аналогичными показателями для ренина (1,4 раза). Интенсивность секреции ангиотензин-превращающего фермента связана с типом вегетативного реагирования. У ваготонических животных секреция исходно снижена: соотношение

активности ангиотензин-превращающего фермента в плазме оттекающей от почки венозной крови и артериальной – 0,76.

У мезотонических животных активность ангиотензин-превращающего фермента коркового вещества почки в 5 раз меньше, чем у симпатотонических и практически не отличается от ваготонических животных. По сравнению с тканью легкого – основного источника ангиотензин-превращающего фермента в организме – активность в коре почки ниже у мезото-

ников в 4, у симпатикотоников – в 25,7, у ваготоников – в 3,6 раза.

Нами впервые показано, что на активность ангиотензин-превращающего фермента коркового вещества почки и его секрецию в кровь оказывает влияние холинергическая система. Так, после системного внутривенного введения карбахола (стабильный аналог ацетилхолина) мезотоническим крысам в дозах  $10^{-10}$ – $10^{-8}$  моль/кг наблюдали дозозависимое уменьшение секреции ангиотензин-превращающего фермента почкой. При этом доза  $10^{-10}$  моль/кг явилась подпороговой для изменения артериального давления и сердечного ритма, что свидетельствует о высокой чувствительности звена ренин-ангиотензинной системы, ответственного за образование активной формы ангиотензина, к изменениям вегетативного статуса. У ваготонических животных секреция ангиотензин-превращающего фермента почкой после введения карбахола

уменьшается достоверно по сравнению с пониженным исходным уровнем.

После системного внутривенного введения карбахола в дозе  $10^{-10}$  моль/кг активность ангиотензин-превращающего фермента в коре почки достоверно увеличивается у мезо- и ваготонических животных примерно в равной степени (в обоих случаях более чем в три раза), тогда как у симпатотонических животных достоверных отличий не отмечено. Дальнейшее увеличение дозы карбахола до  $10^{-9}$  и  $10^{-8}$  моль/кг вызывало у мезотонических животных тенденцию к уменьшению, а у ваготонических – к усилению первоначального эффекта.

Таким образом, повышение активности фермента в ткани почки и снижение ее в оттекающей от почки крови свидетельствует об уменьшении секреции почкой ангиотензин-превращающего фермента под действием ацетилхолина.

## Люминесцентно-гистохимический анализ действия сензита на почку

**А.А. Федоров, Г.Д. Аникин**

**Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова, г. Чебоксары**

Сензит – производное фенилалкиламинов, принадлежит группе блокаторов кальциевых каналов, около 80% выводится почками. Имеются клинические подтверждения, что препарат при нефрогенной гипертензии замедляет течение возникающей почечной недостаточности. Данная работа является продолжением исследований, проводимых на кафедре фармакологии по изучению механизма действия антагонистов кальция на тканевом уровне с помощью люминесцентно-гистохимического метода Фалька и Хилларпа. С помощью люминесцентного микроскопа спустя 45 минут в условных единицах определяли содержание катехоламинов в почечной ткани у двадцати крыс в условиях однократного в/б введения 50 мг/кг препарата.

При резорбтивном действии сензит увеличивает свечение канальцев коркового слоя, которое становится ярким желто-зеленым. Появляется туманная дымка, затрудняющая просмотр деталей препарата. Люминесценция мозгового слоя ярче, чем в контроле, и имеет серо-зеленый цвет. Стенки кровеносных сосудов люминесцируют интенсивнее, чем у интактных животных. Особенно это выражено на поперечных срезах. Реакция с парами формальдегида выявила адренергические нервные волокна с высокой интенсивностью свечения. В капсуле почки наблюдали такие же адренергические нервные волокна.

Для выяснения возможности прямого действия препарата на почку проведены опыты с инкубацией кусочков почки в растворе Кребса–Рингера, с добавлением сензита в концентрации 1,25 мг/мл. В опытах с

инкубацией срезов почки наблюдали двукратное увеличение интенсивности свечения эпителия канальцев коркового и более слабое – мозгового вещества почки. Еще в большей мере возросла яркость свечения почечных телец, которые стали светло-зелеными. Увеличивалась флюоресценция стенок кровеносных сосудов.

Таким образом, сензит увеличивает интенсивность флюоресценции структур почки, что указывает на накопление в них свободных катехоламинов и может являться результатом как прямого действия на почку, так и опосредованного влияния через другие органы и системы.

Результаты инкубации указывают на способность сензита усиливать свечение тканевых катехоламинов при прямом действии на адренергические нервные волокна. Можно предположить, что сензит увеличивает высвобождение медиатора из гранул терминальных аксонов, так как резко возрастает интенсивность свечения эпителия канальцев, сосудистых и соединительно-тканых структур, что говорит об экстронейрональном поглощении медиатора тканевыми структурами. Можно предположить, что одновременно замедляется метаболизм норадреналина, вследствие чего появляется туманное диффузное фоновое свечение. Нельзя исключить влияние сензита на скорость синтеза катехоламинов в нейроне. Таким образом, в данной работе с помощью люминесцентно-гистохимического метода получены дополнительные сведения о механизме почечного действия сензита.

## Исследование водной проницаемости клеток эпителия собирательных трубок почки крысы

Г.Р. Ходус, Г.С. Батурина, В.В. Нестеров\*, Е.И. Соленов

Институт цитологии и генетики СО РАН,

\* Новосибирская государственная медицинская академия, г. Новосибирск

Изменение водной проницаемости эпителия собирательных трубок под воздействием вазопрессина лежит в основе регуляции реабсорбции воды в почке. За последнее десятилетие, механизмы регуляции вазопрессином транспорта воды в главных клетках эпителия собирательных трубок (СТ) стали объектом интенсивных молекулярно-биологических исследований. В то же время биофизические исследования в этой области развиты в меньшей степени. Цель нашей работы заключалась в разработке биофизического подхода к исследованию регуляции водной проницаемости базолатеральной мембраны клеток СТ почки млекопитающих.

Изучение водной проницаемости в живых клетках и тканях сопряжено с определенными методическими трудностями, преодоление которых порождает разнообразные методические подходы. Нами был создан новый метод измерения осмотической водной проницаемости базолатеральной мембраны клеток эпителия СТ. Установка была создана на базе микроскопа «МИКМЕД-2 Ломо», цифровой ССD видеокамеры и персонального компьютера. Созданная аппаратура позволяет инъецировать масляную каплю в просвет

канальца, вести запись видеоизображения и проводить длительную инкубацию канальцев при заданной температуре.

Основываясь на математической модели диффузионного переноса воды через полупроницаемую мембрану, мы использовали скорость изменения объема клеток для количественной оценки коэффициента кажущейся осмотической водной проницаемости  $P_f$  плазматической мембраны. Проницаемость базолатеральной мембраны клеток СТ наружного мозгового вещества почки крысы изучали *in vitro* на изолированных фрагментах СТ, в которых движение воды через апикальную поверхность блокировали вазелиновым маслом. С помощью цифровой видеосистемы регистрировали увеличение объема клеток эпителия канальцев в ответ на быстрое (~100 мс) снижение осмолярности с 600 до 300 мосм/кг. Скорость изменения объема клеток эпителия СТ оценивали с помощью морфометрического анализа видеоизображения.

Разработанная методика позволяет проводить экспериментальные исследования воздействия различных факторов на проницаемость для воды базолатеральной мембраны клеток почечного эпителия.

## Исследование влияния вазотоцина и набухания клеток мочевого пузыря лягушки на секрецию простагландина $E_2$

Е.И. Шахматова

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, г. Санкт-Петербург

В процессе эволюции позвоночных, вероятно, вначале сформировался клеточный механизм снижения осмотической проницаемости, который мог лечь в основу миграции животных в пресные водоемы. Каждая клетка эпителия, соприкасающаяся с гипотонической средой, должна была поддерживать водонепроницаемость. Возникло предположение о возможной роли аутокоидов в регуляции этой функции. Изучению этого предположения посвящено настоящее исследование. Опыты проведены на мочевых пузырях самцов зимних травяных лягушек *Rana temporaria* L. Определение осмотической проницаемости эпителия стенки мочевого пузыря проводилось гравиметрическим методом. Содержание воды в ткани пузыря измеряли после высушивания ее в термостате в течение 24 ч при температуре 105 °С, пробы взвешивали на микроаналитических весах «Mettler AJ100». Концентрацию простагландина  $E_2$  в пробах определяли с помощью набора для иммуноферментного анализа («R & D Systems», U.K.). Измерение оптической плотности осуществляли на автоматическом ридере «ELx800» («BIO-ТЕК Instruments», США).

Эксперименты показали, что секреция простагландина  $E_2$  увеличивается при набухании клеток. Она возрастает также при действии вазотоцина, который вызывает набухание клеток. Наряду с локальной защитой клеток простагландинами от осмотической экспансии воды участие в этой функции гормона нейрогипофиза позволило оповестить более широкий круг клеток организма для обеспечения осмотического гомеостаза. Итогом становится блокирование встраивания аквапоринов в люминальную плазматическую мембрану, снижение осмотической проницаемости и противодействие поступлению воды в тело животных. Одним из способов автоматической регуляции была выработка данной клеткой физиологически активных веществ, которые секретировались во внеклеточную жидкость и участвовали в регуляции объема данной и соседних клеток, то есть обеспечивали ауто- и паракринную регуляцию.

*Благодарность.* Работа поддержана РФФИ (грант № 02-04-48065), программой «Ведущие научные школы» (грант № 00-15-97803), программой президиума РАН.

## Особенности ионодепонирующей способности тканей у гипер- и гипотиреоидных крыс

**Т.А. Штеклина, А.Я. Тернер**

**Новосибирский государственный педагогический университет, ГУ НИИ физиологии СО РАМН, г. Новосибирск**

В литературе имеются убедительные данные об антинатрийуретическом действии тиреоидных гормонов. Целью настоящего исследования явилось изучение особенностей депонирования тканями ионов и воды у гипер- и гипотиреоидных крыс.

Крысы линии Вистар были разделены на 3 группы. В первой группе у животных удалялась щитовидная железа. Животным второй группы ежедневно в течение 10 дней вводилось 4 мг L-тироксина на 100 г массы тела. Третья группа крыс была контрольной. В день эксперимента крысы забивались. В образцах плазмы радиоиммунным методом определялись концентрации свободного тироксина и общего трийодтиронина. В тканях определялись концентрации натрия и калия методом пламенной фотометрии, а также содержание воды по разнице между влажным и сухим весом.

Анализ содержания тиреоидных гормонов в плазме подтвердил получение заданных моделей. Так, у тиреоидэктомированных крыс содержание свободного тироксина в плазме крови составляло в среднем 7,67 пг/мл, тогда как у крыс с гипертиреозом его содержание было почти в 5 раз больше и составляло 35,53 пг/мл. В контрольной группе животных содержание  $T_4$  составляло 19,4 пг/мл. При оценке концентрации трийодтиронина в плазме крови не было выявлено достоверных различий между контрольными и гипертиреоидными крысами. Содержание  $T_3$  у гипотиреоидных крыс было достоверно ниже – на 33,4% в сравнении с контролем.

Дисперсионный анализ показал, что функциональное состояние щитовидной железы достоверно влияет на содержание натрия в тканях. Отмечена тенденция его роста в условиях гипертиреозидизма практически во всех тканях, однако достоверное изменение на 15,5% было отмечено лишь в скелетной мышце. В сосочке почки происходило снижение концентрации натрия в сравнении с контролем на 26,4%. Вероятно, это связано с тем, что почки гипертиреоидных крыс экскретируют меньшие количества этого катиона. Наряду с повышенной натрий-депонирующей способностью ткани гипертиреоидных крыс демонстрировали и высокое содержание калия в печени и сердце. В сосочке и коре почки наблюдалось снижение концентрации калия в сравнении с контролем на 37,63 и 16,45% соответственно. Кроме того, у гипертиреоидных крыс отмечалось достоверное повышение содержания воды в сравнении с контролем в тканях печени и сердца.

У гипотиреоидных крыс, напротив, регистрировалось достоверное снижение содержания натрия в сравнении с контролем: в печени на 15,95%, в сердце на 12,6%, в коре почки на 11,33%. Между тем, в скелетной мышце это снижение составило всего лишь 5,56% и было недостоверным. Параллельно со снижением уровня натрия отмечено уменьшение концентрации калия в печени, сердце, сосочке и коре почки.

Таким образом, на основе анализа полученных результатов можно сделать вывод о том, что от уровня тиреоидных гормонов прямо или опосредованно зависит содержание ионов в тканях.

## Реакция почек на солевую нагрузку у крыс с различным уровнем гормонов щитовидной железы

**Т.А. Штеклина, А.Я. Тернер**

**Новосибирский государственный педагогический университет, ГУ НИИ физиологии СО РАМН, г. Новосибирск**

В настоящее время есть свидетельства того, что гормоны щитовидной железы обладают выраженным антинатрийуретическим действием. Целью настоящего исследования было выяснение особенностей функционирования почек у крыс с экспериментальным гипо- и гипертиреозом в условиях солевой нагрузки.

Исследование проводилось на 40 крысах линии Вистар средней массой 284 г. Они были разделены на 3 группы. Животным 1-й группы под эфирным наркозом удалялась щитовидная железа. Во второй группе крысам в течение 10 дней вводился тироксин из расчета 4 мкг на 100 г массы тела. Третья группа была контрольной. План эксперимента был следую-

щим. Перед началом исследования крыс высаживали в метаболические клетки, и в течение 1–2 часов у них собиралась фоновая моча. Затем всем крысам с помощью желудочного зонда вводилась солевая нагрузка (2% раствор хлорида натрия) из расчета 5 мл/100 г массы тела. Порции мочи собирались в течение 3 часов за каждые 60 минут. В конце эксперимента у крыс брали кровь из нижней полой вены.

В результате проведенного исследования удалось установить, что у гипотиреоидных крыс базальный диурез был значительно выше по сравнению с эутиреоидными и составлял 0,34 мл/ч на 100 г массы тела, тогда как в контроле 0,166 мл/ч. У гипертиреоидных

животных этот показатель ниже, чем в контроле, и составлял 0,133 мл/ч. После солевой нагрузки у крыс этих 3 групп развивался интенсивный диурез, причем у крыс с гипофункцией щитовидной железы диурез достигал максимальных значений к 1-му часу после солевой нагрузки, тогда как у гипер- и эутиреоидных крыс полиурия достигала максимума лишь ко 2-му часу наблюдения (1,64 мл/ч на 100 г массы тела и 1,93 мл/ч соответственно). К 3-му часу отмечалось снижение скорости мочеотделения у крыс всех групп.

Анализ скорости клубочковой фильтрации не выявил достоверных различий ни в фоновом периоде, ни в течение 1-го часа после солевой нагрузки. Однако значения относительной реабсорбции жидкости достоверно отличались. К 1-му часу у гипотиреоидных крыс этот показатель снижался в среднем до 88,4%,

у эутиреоидных до 91,3%, а у гипертиреоидных до 95,93%. О более сильном угнетении реабсорбции у гипотиреоидных крыс свидетельствует и меньшая величина осмотического концентрационного индекса. Он оказался равным 1,9, тогда как у гипертиреоидных и эутиреоидных животных  $U/Posm$  равнялся 2,8 и 2,9 соответственно.

Экскреция натрия уже в фоновом периоде была достоверно выше у гипотиреоидных животных, тогда как у гипертиреоидных она была наименьшей. Достоверные отличия по экскреции натрия обнаруживались в 1-й час реакции. Так, у гипертиреоидных крыс выведение натрия составило 211,6, у контрольных 355,1, а у гипотиреоидных 529,1 мкмоль/ч  $\square$  100 г. Таким образом, гормоны щитовидной железы принимают существенное участие в регуляции экскреции почками натрия и воды.