

результаты исследования, животные реагируют неодинаково на введение трития. При увеличении времени распределения метки в конечном счете достигается приближенное к истинному значение содержания воды в теле. Таким же образом наблюдается и достижение плато, что объясняется равномерным распределением тритиевой воды, сохраняющимся длительное время.

Сходные результаты получены и на 12-месячных крысах, однако, в данном случае абсолютная ошибка тритиевого теста увеличилась до 4,3 %, при этом значение ( $63,2 \pm 1,7$ ) % соответствовало наиболее приближенному к реальному значению содержания воды в организме — ( $60,5 \pm 0,9$ ) %.

При сравнении результатов, полученных с помощью прямого химического анализа и тритиевого теста, по содержанию жира в организме крыс при наиболее благоприятном времени распределения метки у 4-месячных животных, показано, что при расчете относительного содержания жира в организме средняя абсолютная ошибка возросла до 8 %. При этом среднее содержание жира, определенное тритиевым тестом, составило ( $12,5 \pm 0,78$ ) % и прямым химическим анализом — ( $13,5 \pm 0,63$ ) %. У 12-месячных крыс — ( $11,6 \pm 1,2$ ) и ( $12,5 \pm 0,9$ ) % соответственно со сходной средней абсолютной ошибкой 8 %.

Анализ полученных результатов показал, что лишь у 58 % 12-месячных крыс (7 из 12) удалось получить близкие к истинным результаты, у остальных — тритиевый метод был не эффективен (не реально низкие, или даже отрицательные значения содержания жира в теле, вследствие значительного превышения содержания в нем воды). Это еще раз подтверждает то положение, что распределение метки в организме проходит индивидуально и неодинаково по времени. При необходимости однократного исследования — взятия крови, исходя из данных литературы и результатов собственных исследований, следует рекомендовать время аппликации метки от 2 до 3 ч.

Таким образом, тритиевый тест имеет ряд дефектов, и если на 4-месячных животных получено удовлетворительное совпадение результатов тритиевого теста и прямого химического анализа, то у 12-месячных наблюдалось существенное расхождение. Исходя из этого, можно сделать вывод, что с увеличением возраста и массы тела растет погрешность тритиевого теста. В связи с этим, к выбору тритиевого теста следует подходить избирательно, принимая во внимание возможность ошибки, увеличивающейся с возрастом и массой тела.

K. L. Pisarchuk

#### APPROBATION OF THE TRITIUM TEST TO DETERMINE FAT CONTENT IN THE RAT ORGANISM

An indirect method for estimation of the fat percentage in the animal organism, a tritium test, was studied on laboratory male rats aged 4 and 12 months. Results obtained from the tritium test and direct chemical analysis were compared. With age a mean absolute error of the tritium test increased (from 1 to 8 %) as against actual values of the water and fat percentage in the organism obtained by a direct chemical analysis.

The data obtained testify to the relative insolvency of the tritium test, as well as the necessity to carry additional investigations in order to obtain adequate data.

Institute of Gerontology, Academy of Medical  
Institute of the USSR, Kiev

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бурштейн А. И. Методы исследования пищевых продуктов. — Киев; Госмедиздат УССР, 1963. — 642 с.
2. Гацко Г. Г., Чайка Л. Д. Избыточный вес и преждевременное старение. — Минск, 1984. — 63 с.
3. Gordon B. J., Topps J. H., Begg T. W. Total body water of rats as measured with

- different amounts of injected tritiated water // *Proc. Nutr. Soc.*—1971.—30, N 2.—P. A54—A55.
4. Holleman D. F., Dietrich R. A. An evaluation of the tritiated water method for estimating body water in small rodents // *Canad. J. Zool.*—1975.—53, N 9.—P. 1376—1378.
  5. Knittle J. L., Hirsch J. Effect of early nutrition in the development of rat epididymal fat pads: cellularity and metabolism // *J. Clin. Invest.*—1968.—47.—P. 2091—2098.
  6. Kodama A. M. In vivo and in vitro determination of body fat and body water in the hamster // *J. Appl. Physiol.*—1971. 31, N 2.—P. 218—223.
  7. Palmer S. Diet, nutrition and cancer: the future of dietary policy // *Cancer Res.*—1983.—43, N 5.—P. 2509—2514.
  8. Rothwell N. J., Stock M. J. In vivo determination of body composition by tritium dilution in the rat // *Brit. J. Nutr.*—1979.—41, N 3.—P. 625—628.
  9. Smith B. W., McManus J. J. The effect of litter size on the bioenergetics and water requirements of lactating *Mus musculus* // *Comp. Biochem. and Physiol.*—1975.—51, N 1A.—P. 111—119.
  10. Tisavipat A., Vibulsreth S., Sheng H. P., Huggins R. A. Total body water measured by dessication and by tritiated water in adult rats // *J. Appl. Physiol.*—1974.—37, N 5.—P. 699—702.

Ин-т геронтологии АМН СССР,  
Киев

Материал поступил  
в редакцию 17.04.89

УДК 612.014.42:612.31

М. Ю. Клевцев, З. В. Гураль

## Идентификация активируемого деполяриацией кальциевого тока мембраны секреторных клеток

Результаты изучения действия верапамила, ионов марганца и гиперкальциевого деполяризации мембраны на экструзию белковых компонентов секреторными клетками поджелудочной железы крыс [1] позволяют предположить, что вход ионов кальция в клетки во время стимуляции секреции осуществляется по электроуправляемым кальциевым каналам. Однако получить прямое подтверждение входа кальция через потенциалозависимые каналы при регистрации кальциевого трансмембранного тока в условиях фиксации потенциала и внутриклеточной перфузии на экзокринных секреторных клетках млекопитающих в настоящее время не представляется возможным. В связи с этим, предположив, что кальций играет такую же роль в сопряжении процессов стимул — секреция в секреторных клетках у беспозвоночных, как и позвоночных, мы провели исследования по идентификации тока электроуправляемых кальциевых каналов в мембране крупных клеток слюнной железы личинки мотыля (*Chironomus plumosus* L.) [2].

### Методика

Опыты проведены на изолированных секреторных клетках. Препарирование желез и изолирование клеток осуществляли в физиологическом растворе, состав которого описан в работе Клевцева [2]. Кальциевый ток регистрировали при наличии лишь кальциевого трансмембранного градиента. Остальные проникающие через мембрану ионы в физиологическом растворе заменяли непроницаемыми. Поэтому внутриклеточную перфузию осуществляли изотоническим раствором *трис*-SO<sub>4</sub>, внеклеточную — таким же раствором с добавлением Ca<sup>2+</sup> в естественной концентрации (1,76 ммоль/л молочнокислого кальция). Вне- и внутриклеточный растворы содержали 5,55 ммоль/л глюкозы. Во внеклеточном растворе поддерживали pH на уровне 7,2, внутриклеточного — 7,0. Для регистрации кальциевого тока использовали метод внутриклеточной перфузии [3]. Мембранный потенциал фиксировали на уровне —65 мВ и контролировали с помощью универсального вольтметра В7-16. Для смещения мембранного потенциала в сторону

деполяризации использовали непроницающие в ответ на деполяризацию ЭКМ-01, предназначенного для измерения амплитуд и интервалов выбранных исследователем.

### Результаты и их обсуждение

Исследования показали, что в ответ на деполяризацию появляется заметный ток при деполяризации на 10 мВ, который уменьшается от 20 до 44 пА и, таким образом, потенциалозависимые кальциевые каналы данток активируются при деполяризации. Дальнейшая деполяризация сопровождается увеличением тока при деполяризации —10 мВ.

Кальциевые входящие токи регистрировали в секторной мембране личинки мотыля: а — осциллограммы токов, вызванные деполяризацией мембраны до указанных значений (поддерживаемый потенциал — —65 мВ); б — вольт-амперная характеристика (максимум) тока.

но, б) он достигает максимума. Смещение мембранного потенциала, что, по-видимому, соответствует кальциевому равновесию.

Как видно из рис. 1, деполяризация мембраны, вызывающая ток, зависит также от концентрации кальциевого раствора (в среднем в 2,25 раза, от концентрации веществ) он сокращается. Верапамил (1 мМ) блокирует ток в среднем в 2,5 раза, вызывая ослабление тока.

Таким образом, в мембране секреторных клеток функционируют электроуправляемые кальциевые каналы, в клетки проникает кальций.

М. Ю. Клевцев, З. В. Гураль

### IDENTIFICATION OF THE CURRENT OF THE SECRETORY

The inward depolarization-activated calcium current in the chironomid larva has been identified by the intracellular dialysis method. An activation threshold of about —10 mV, reversion to

Физиол. журн., 1990, т. 36, № 2

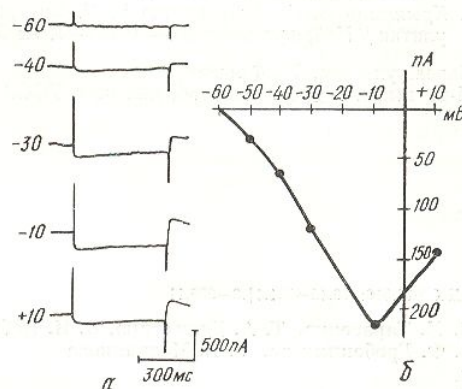
деполяризации использовали положительные импульсы длительностью 500 мс. Возникающие в ответ на деполяризацию токи измеряли с помощью электрокардиометра ЭКМ-01, предназначенного для визуального наблюдения, запоминания и цифрового измерения амплитуд и интервалов времени электрофизиологического сигнала в точках, выбранных исследователем.

## Результаты и их обсуждение

Исследования показали, что деполяризация мембраны на 5 мВ не вызывает появления заметного трансмембранного тока (рисунок, а). Лишь при деполяризации на 15 мВ появляется входящий ток, который колеблется от 20 до 44 пА и составляет в среднем  $(32,0 \pm 2,32)$  пА. Таким образом, потенциалозависимые кальциевые каналы данных клеток активируются при мембранном потенциале около -50 мВ. Дальнейшая деполяризация сопровождается увеличением тока и при потенциале -10 мВ (рису-

Кальциевые входящие токи в мембране диализируемой секреторной клетки слюнной железы личинки мотыля:

а — осциллограммы токов, вызванных деполяризацией мембраны до указанных слева значений (поддерживаемый потенциал -65 мВ, внеклеточная концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  1,76 ммоль/л); б — вольт-амперная характеристика (средние значения максимумов) тока.



нок, б) он достигает максимального значения ( $215,83 \text{ пА} \pm 13,17 \text{ пА}$ ). Смещение мембранного потенциала до 10 мВ вызывает ослабление тока, что, по-видимому, связано с приближением мембранного потенциала к кальциевому равновесному потенциалу.

Как видно из рисунка а, кальциевый ток достигает максимального значения, а затем несколько уменьшается при продолжающейся деполяризации мембраны, что свидетельствует об инактивации. Амплитуда тока зависит также от трансмембранного кальциевого градиента: гиперкальциевый раствор (35 ммоль/л  $\text{Ca}^{2+}$ ) вызывает его увеличение в среднем в 2,25 раза, а в условиях бескальциевой среды (без хелатирующих веществ) он составляет лишь 29 % исходного. Ток чувствителен к блокаторам электроуправляемых кальциевых каналов других типов клеток. Верапамил ( $10^{-4}$  моль/л) и хлорпромазин ( $10^{-4}$  моль/л) уменьшают ток в среднем на 50 %. Катионы марганца и кобальта (5 ммоль/л) вызывают ослабление тока в среднем не более чем на 60 %.

Таким образом, приведенные результаты позволяют предположить, что в мембране секреторных клеток слюнной железы личинки мотыля функционируют электроуправляемые кальциевые каналы, через которые в клетки проникает кальций, обеспечивающий электросекреторную связь.

М. Ю. Клевets, З. В. Гурал

## IDENTIFICATION OF THE DEPOLARIZATION-ACTIVATED CALCIUM CURRENT OF THE SECRETORY CELLS MEMBRANE

The inward depolarization-activated current of the salivary gland cell membrane of the chironomus larva has been registered by the voltage-clamp method under conditions of the intracellular dialysis in the presence of the calcium transmembrane gradient only. An activation threshold of the current is about -50 mV, the current maximum is under +10 mV, reversion up to +10 mV leads to the current reduction. An increase in the

I. Franko University, Ministry of Higher and Secondary Special Education  
of the Ukrainian SSR, Lvov

1. Гринькин М. Я., Клевец М. Ю., Шостаковская И. В. Роль кальция в экстружии пищеварительных ферментов ацинарными клетками поджелудочной железы // Физиол. журн.— 1988.— 34, № 4.— С. 13—18.
2. Клевец М. Ю. Изучение проводимости ионов плазматической мембраной секреторных клеток в состоянии покоя методом внутриклеточного диализа // Там же.— 1986.— 32, № 2.— С. 224—227.
3. Крыштал О. А., Пидопличко В. И. Внутриклеточная перфузия гигантских нейронов улитки // Нейрофизиология.— 1975.— 7, № 3.— С. 327—329.

Материал поступил  
в редакцию 11.06.89

Л. М. Тарасенко, Т. А. Девяткина, О. И. Цебржинский,  
В. Ф. Гребенникова, С. В. Мельникова

У большинства крыс, перенесших острый стресс, уменьшилась относительная масса слюнных желез по сравнению с таковой контрольных крыс ( $0,277 \pm 0,019$  и  $0,309 \% \pm 0,037 \%$  соответственно;  $P_{\text{тмф}} = 0,05$ ). Ана-