

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 апликации 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 Sciences of the USSR,  
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. Клевец, З. В. Гураль

## Идентификация активируемого деполяризацией кальциевого тока мембранных секреторных клеток

Результаты изучения действия верапамила, ионов марганца и гиперкалиевой деполяризации мембранны 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 трансмембранныго тока в условиях фиксации потенциала и внутреклеточной 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 мемbrane 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 Клевца [2]. Кальциевый ток регистрировали при наличии лишь кальциевого трансмембранного градиента. Остальные проникающие через мембрану ионы в физиологическом растворе заменили непроникающими. Поэтому внутреклеточную перфузию осуществляли изотоническим раствором  $\text{tris-SO}_4$ , внеклеточную — таким же раствором с добавлением  $\text{Ca}^{2+}$  в естественной концентрации (1,76 ммоль/л молочно-кислого кальция). Вне- и внутреклеточный растворы содержали 5,55 ммоль/л глюкозы. Во внеклеточном растворе поддерживали pH на уровне 7,2, внутреклеточного — 7,0. Для регистрации кальциевого тока использовали метод внутреклеточной перфузии [3]. Мембранный потенциал фиксировали на уровне —65 мВ и контролировали с помощью универсального вольтметра B7-16. Для смещения мембранныго потенциала в сторону

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

### Результаты и их обсуждение

Исследования показали, что появления заметной при деполяризации на 11 ляется от 20 до 44 пА и образом, потенциалоз кальциевые каналы дан ток активируются прином потенциале около Дальнейшая деполяризация проводится увеличен и при потенциале —10

Кальциевые входящие токи диализируемой секреторной железы личинки мотыля: а — осциллограммы токов, вызванные деполяризацией мембранны до указанного (поддерживаемый потенциал внеклеточной концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  б — вольт-амперная характеристика изменения максимумов тока.

нок, б) он достигает Смещение мембранныго потенциала, что, по-видимому, сдвигается к кальциевому равновесию.

Как видно из рисунка, значение, а затем несогласованности деполяризации мембранны, тока зависит также от кальциевый раствор (в среднем в 2,25 раза, имеющих веществ) он соединяется к блокаторам электропроводности клеток. Верапамил (1 мкмоль/л) блокирует ток в среднем и вызывает ослабление.

Таким образом, можно сказать, что в мемbrane секреторных клеток функционируют электроуправляемые каналы, в клетки проникает связь.

M. Yu. Klevets, Z. V. Gural  
IDENTIFICATION OF THE CURRENT OF THE SECRETORY CALCIUM CHANNELS

The inward depolarization of the *Chironomus* larva has been studied using the intracellular dialysis technique. An activation threshold of —10 mV, reversion under —10 mV, reversal potential

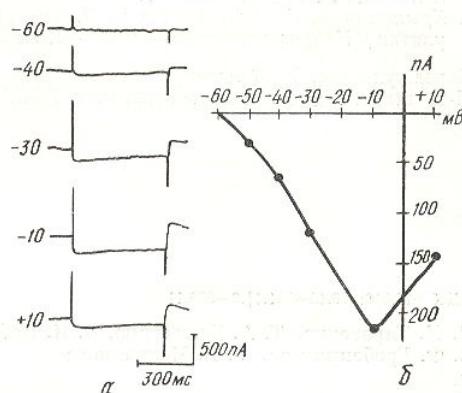
деполяризации использовали положительные импульсы длительностью 500 мс. Возникающие в ответ на деполяризацию токи измеряли с помощью электрокардиометра ЭКМ-01, предназначенног для визуального наблюдения, запоминания и цифрового измерения амплитуд и интервалов времени электрофизиологического сигнала в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

### Результаты и их обсуждение

Исследования показали, что деполяризация мембранны на 5 мВ не вызывает появления заметного трансмембранныго 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 (рисунок, б).

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

а — осциллограммы токов, вызванных деполяризацией мембранны 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 ( $215,83 \text{ пA} \pm 13,17 \text{ пA}$ ). 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 мембранны, 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 мемbrane секреторных клеток слюнной железы личинки мотыля функционируют электроуправляемые кальциевые каналы, через которые в клетки проникает кальций, обеспечивающий электросекреторную связь.

M. Yu. Klevets, Z. V. Gural

### 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 chironomid 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

extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration causes current amplification; the current decreases under the influence of verapamil, chlorpromazine,  $\text{Mn}^{2+}$  and  $\text{Co}^{2+}$ . These results could indicate the existence of potential-dependent calcium channels in the secretory cell membrane.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гриньків М. Я., Клевець М. Ю., Шостаковська І. В. Роль кальцію в екструзії піщеварительних ферментів ацинарними клетками поджелудочної желези // Фізіол. журн.— 1988.— 34, № 4.— С. 13—18.
  - Клевець М. Ю. Изучение проводимости ионов плазматической мембраной секреторных клеток в состоянии покоя методом внутриклеточного диализа // Там же.— 1986.— 32, № 2.— С. 224—227.
  - Крышталь О. А., Пидопличко В. И. Внутриклеточная перфузия гигантских нейронов улитки // Нейрофизиология.— 1975.— 7, № 3.— С. 327—329.

Львов. ун-т им. И. Франко  
М-ва высш. и сред. спец. образования УССР

Материал поступил  
в редакцию 11.06.89.

УДК 616.316:616.45—001.11.3—036.11

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

## Реакция слюнных желез на острый стресс

Со времени классических исследований И. П. Павлова известно, что слюнные железы отличаются высокой чувствительностью к нейрогенным влияниям. Предложено исследование активности амилазы слюны в качестве метода контроля за уровнем тренированности организма [8]. В то же время имеются указания на разнонаправленное изменение активности фермента слюны под влиянием психического напряжения [7].

Цель нашей работы — изучить в эксперименте реакцию подчелюстных слюнных желез на острый стресс и возможность адаптации к нему.

## Методика

Опыты выполнены на 34 крысах-самцах массой 150—200 г. Острый стресс воспроизводили иммобилизацией животного с погружением в воду (22°C) в течение 3 ч [19]. Адаптацию к острому стрессу вызывали постепенным увеличением продолжительности воздействия стрессом от 5 до 30 мин в течение 14 сут. На 15-е сутки крыс подвергали действию острого стресса. Животных забивали кровопусканием под гексеналовым наркозом через 2 ч после завершения стресса. О реакции слюнных желез крови на стресс судили по относительной массе органа, активности амилазы (по Вольгемуту) и интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ) — ведущего механизма клеточных повреждений [2], учитывая активность супероксиддисмутазы (СОД) [1] и перекисный гемолиз эритроцитов [9]. Тяжесть стресс-синдрома оценивали по частоте язвенных поражений желудка. Результаты опытов обработаны статистически с применением непараметрического критерия ТМФ (точный метод Фишера) [3].

## Результаты и их обсуждение

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-

104

Физиол. журн., 1990, т. 36, № 2

логичную реакцию состояниях иного происхождения стресса отмечали резко выраженные изменения в слюнных железах, которая более характерна для крыс (таблица). При исследовании ткани слюнных желез ( $0,0629 \pm 0,001$  и  $0,0601 \pm 0,001$  мкг/мл) видимому, в механизме острого стресса основное значение имеет ферменты, возникшие при расщеплении нейтральных продуктов ПОЛ. Ионная активность  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -АТФаза в слюнных железах значительно обоснована Медведевым.

Активность супероксистресса уменьшилась в острый стресс сопрово- компонента антиоксидантной защиты слюнных желез активации ПОЛ крови и перекисного гемолиза. Активности СОД в

## Влияние острого стресса на подчелюстных слюнных жел

Характер воздействия (число животных)	Амиакти
Контроль (9)	(64)
Острый стресс (9)	(16)
Повторные короткие стрессорные воздействия (7)	(32)
Повторные короткие стрессорные воздействия и стресс (9)	(256)

Примечание. Значения  $\lambda$  используются непараметрически с контролем.

Известно, что адаптация к действиям способствует Примененный нами рефлексия сопровождался развитием острого стресса в этих условиях отмечались лазы и незначительное снижение с таковыми контрастами коротких повторных стрессов. Эффект острого стресса негативного влияния на СОД перекисной резистентности

Таким образом, слышностью к патогенномуражением их относительны

Физиол. журн., 1990, т. 36,