

В. М. БРЕСЛЕР, А. А. НИКИФОРОВ

**ДЕЙСТВИЕ 3',5'-АМФ НА АКТИВНЫЙ ТРАНСПОРТ
ОРГАНИЧЕСКОЙ КИСЛОТЫ В ПРОКСИМАЛЬНЫХ КАНАЛЬЦАХ
ПЕРЕЖИВАЮЩЕЙ ПОЧКИ ЛЯГУШКИ**

(Представлено академиком Е. М. Крепом 26 VII 1974)

Циклическая АМФ (3',5'-АМФ) в клетках Metazoa играет роль медиаторного вещества, через посредство которого реализуются эффекты ряда нестероидных гормонов (¹⁻⁶). Действие 3',5'-АМФ на внутриклеточный обмен многообразно и осуществляется на различных уровнях структурно-химической организации клетки. Среди прочих эффектов 3',5'-АМФ, несомненно, заслуживает внимания изменение проницаемости плазматической мембраны клеток для Na⁺, воды и, видимо, также органических веществ (⁴⁻⁷). Внутриклеточная концентрация 3',5'-АМФ регулируется в основном активностью двух ферментов — аденилциклазы, осуществляющей превращение АТФ в 3',5'-АМФ и фосфодиэстеразы, превращающей 3',5'-АМФ в 5'-АМФ (¹⁻⁶). Воздействия, повышающие активность аденилциклазы (например, гормоны) или понижающие активность фосфодиэстеразы (например, ингибирующий ее теофиллин) увеличивают концентрацию 3',5'-АМФ в клетке; кроме того, внутриклеточная концентрация повышается и при наличии в среде экзогенной 3',5'-АМФ (¹⁻⁸).

Механизм изменения проницаемости мембраны для органических веществ под действием 3',5'-АМФ нуждается в изучении; одной из удобных для этой цели экспериментальных моделей может, видимо, быть система активного транспорта органических кислот в проксимальных канальцах почки, поскольку имеются указания на то, что 3',5'-АМФ влияет на работу этой системы (⁷).

Ранее нами было показано, что активный транспорт кислот через базальную и апикальную мембраны клеток канальцев может быть визуализирован *in vivo* и *in vitro* применением маркерной флуоресцирующей кислоты (флуоресцеин) и контактной флуоресцентной микроскопии, а также охарактеризован количественно путем измерения проникшего в канальцы флуоресцеина на специальном микрофлуориметре, оснащенный контактной оптикой (^{9, 10}).

Целью настоящей работы было количественное изучение действия 3',5'-АМФ на активный транспорт флуоресцеина в проксимальных канальцах. Объектом исследования служили переживающие *in vitro* почки лягушек-самцов (*Rana temporaria*). Методика постановки опытов была в основном такой же, как в наших предшествующих работах (^{9, 10}). Одна из свежееудаленных почек инкубировалась 15 мин. при комнатной температуре в 10 мл раствора Рингера, содержащего $5 \cdot 10^{-5}$ M флуоресцеина и различные концентрации 3',5'-АМФ, теофиллина или обоих этих веществ; вторая почка помещалась в чистый раствор Рингера. В каждой из них последовательно измерялась флуоресценция 40 индивидуальных проксимальных канальцев. В контроле инкубация проводилась в растворе Рингера, содержащем только флуоресцеин. Диаметр фотометрического зонда в плоскости объекта составлял 60 мкм, т. е. в него помещался весь поперечник проксимального канальца. Для выделения возбуждающего света служил светофильтр ФС-1-6, для выделения света флуоресценции — склеенный запираю-

щий светофильтр ЖС-18+ЖС-19. На каждую точку в опыте и контролях использовались почки 3–5 лягушек, т. е. измерялось 120–200 канальцев. Количество (концентрация) флуоресцеина в канальце определялось как разность между флуоресценцией канальцев после инкубации в среде, содержащей флуоресцеин, и собственной зеленой флуоресценцией клеток проксимальных канальцев (¹⁰). Весь цифровой материал подвергался статистической обработке на ЭВМ «Проминь»; вычислялись средние значения и границы доверительного интервала при 95% уровне значимости. Одно-

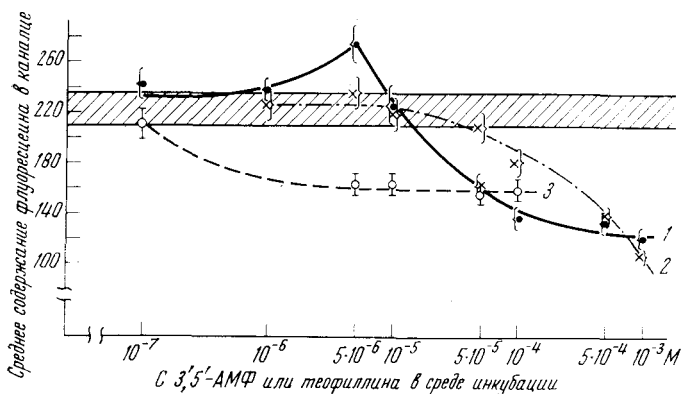


Рис. 1. Действие различных концентраций 3',5'-АМФ (1), теофиллина (2) или сочетания постоянной концентрации теофиллина ($5 \cdot 10^{-5}$ M) и меняющейся — 3',5'-АМФ (3) на среднее содержание флуоресцеина в проксимальных канальцах (рабочие единицы). Заштрихованная область — границы доверительного интервала для контроля, скобки у точек отмечают границы доверительного интервала при 95% уровне значимости

временно с микрофлуориметрией осуществлялся визуальный морфологический контроль за транспортом флуоресцеина в цитоплазму клеток канальца и его просвет.

При изменении концентрации 3',5'-АМФ в среде (от 10^{-7} до 10^{-3} M) наблюдалось сначала небольшое, но достоверное увеличение среднего количества флуоресцеина, проходящего в каналец за время инкубации, а затем его постепенное снижение, достигавшее 53,6% по отношению к контролю (рис. 1). При изменении концентрации теофиллина в среде (от 10^{-6} до 10^{-3} M) наблюдалось постепенное уменьшение среднего количества флуоресцеина в канальцах, достигавшее 47,7% к контролю (рис. 1). При наличии в среде постоянной концентрации теофиллина ($5 \cdot 10^{-5}$ M) и меняющихся концентраций 3',5'-АМФ достоверное снижение среднего количества флуоресцеина в канальцах наступает при действии более низкой концентрации 3',5'-АМФ ($5 \cdot 10^{-6}$ M) и далее не меняется с ее увеличением.

Введение в среду инкубации 5'-АМФ (10^{-3} M) не снижает среднего количества флуоресцеина в канальцах; наблюдается даже небольшое, но статистически достоверное его повышение (рис. 2). АДФ (10^{-3} M) не оказывает достоверного эффекта на транспорт флуоресцеина. Предварительная 15-минутная инкубация с 3',5'-АМФ с последующей 15-минутной инкубацией в растворе флуоресцеина оказывает на его транспорт в каналец значительно более слабый тормозящий эффект, чем 15-минутная инкубация в присутствии 3',5'-АМФ и флуоресцеина (рис. 2).

Зависимость между средним количеством флуоресцеина в канальце и продолжительностью инкубации имеет линейный характер (¹⁰). При наличии в среде 3',5'-АМФ характер этой зависимости меняется (рис. 3): начиная с 10-й минуты инкубации транспорт флуоресцеина в каналец практически прекращается.

Таким образом, ингибирующее действие 3',5'-АМФ на транспорт кислоты специфично именно для этого соединения и отсутствует у других пуринов (5'-АМФ, АДФ). Ингибирующее действие 3',5'-АМФ на транспорт является, как свидетельствуют опыты с раздельной инкубацией, обратимым. Важно отметить, что форма кривых, описывающих изменения среднего содержания флуоресцеина в канальцах при действии меняющихся концентраций 3',5'-АМФ и теофиллина, оказывается различной. Кривая, описывающая изменения среднего содержания флуоресцеина в канальцах при

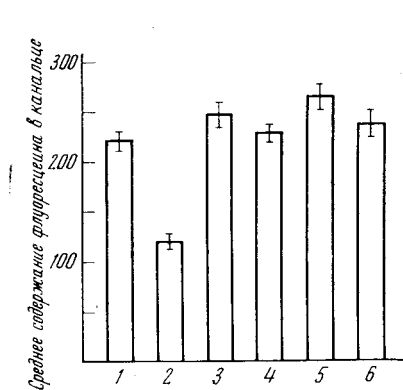


Рис. 2

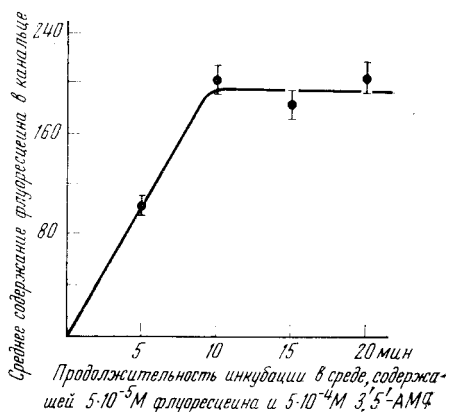


Рис. 3

Рис. 2. Действие 3',5'-АМФ, 5'-АМФ и АДФ на среднее содержание флуоресцеина в проксимальных канальцах (рабочие единицы). 1 — инкубация 15 мин. в $5 \cdot 10^{-5}$ М растворе флуоресцеина на растворе Рингера; 2 — инкубация 15 мин. в растворе Рингера, содержащем $5 \cdot 10^{-5}$ М флуоресцеин и 10^{-3} М 3',5'-АМФ; 3 — инкубация 15 мин. в растворе Рингера, содержащем $5 \cdot 10^{-5}$ М флуоресцеина и 10^{-3} М 5'-АМФ; 4 — инкубация 15 мин. в растворе Рингера, содержащем $5 \cdot 10^{-5}$ М флуоресцеин и 10^{-3} М АДФ; 5 — инкубация 15 мин. в растворе Рингера и затем 15 мин. в $5 \cdot 10^{-5}$ М растворе флуоресцеина в растворе Рингера; 6 — инкубация 15 мин. в растворе Рингера, содержащем 10^{-3} М 3',5'-АМФ и затем 15 мин. в $5 \cdot 10^{-5}$ М растворе флуоресцеина в растворе Рингера. 95% уровень значимости

Рис. 3. Зависимость между средним содержанием флуоресцеина (рабочие единицы) в канальцах и продолжительностью инкубации

наличии в среде постоянной концентрации теофиллина и меняющейся концентрации 3',5'-АМФ, похожа по форме на кривую для 3',5'-АМФ, но отличается от нее по численным значениям координат. В присутствии теофиллина начинают оказывать достоверное тормозящее действие на транспорт флуоресцеина концентрации 3',5'-АМФ, сами по себе не активные, более высокие концентрации 3',5'-АМФ действуют так же и, даже, видимо, слабее. Различия между вышеупомянутыми тремя кривыми связаны, очевидно, с тем, что при действии на цепь реакций



экзогенной 3',5'-АМФ, теофиллина или обоих этих веществ внутриклеточная концентрация 3',5'-АМФ должна меняться различным способом. Во всяком случае, форма экспериментальных кривых в общем хорошо соответствует ожидаемой на основании уравнений ферментативной кинетики для рассматриваемых ситуаций (¹¹).

Итак, торможение транспорта органической кислоты (флуоресцеина) в проксимальных канальцах пропорционально внутриклеточной концентрации 3',5'-АМФ. Каков же механизм этого торможения? Как известно, транспорт органических кислот в проксимальных канальцах тесно связан с транспортом Na^+ (⁹, ¹², ¹³). 3',5'-АМФ увеличивает проницаемость кле-

точных мембран для Na^+ (¹⁻⁶), что должно, очевидно, снижать разность потенциалов между наружной и внутренней поверхностью мембраны. В настоящее время считается, что активный транспорт многих веществ через различные мембраны осуществляется переносчиками под действием силы электростатического поля (^{10, 14-16}). С этой точки зрения становится понятным торможение 3',5'-АМФ транспорта органической кислоты (флуоресцеина). Из подобного объяснения следует, что под действием 3',5'-АМФ должен меняться транспорт не только органических кислот, но одновременно и других органических веществ, проникновение которых через мембрану осуществляется при участии поля, а также должна перестраиваться доменная структура жидкокристаллического слоя мембран (¹⁰), и это создает возможности дальнейшей экспериментальной проверки справедливости предлагаемого объяснения.

Институт эволюционной физиологии и биохимии
им. И. М. Сеченова
Академии наук СССР
Ленинград

Поступило
8 VII 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ G. Robison, R. Butcher, E. Sutherland, *Ann. Rev. Biochem.*, v. 37, 149 (1968).
² G. Robison, E. Sutherland, R. Butcher, *Cyclic AMP*, N. Y., 1971. ³ E. Sutherland, G. Robison, *Pharmacol. Rev.*, v. 18, 145 (1966). ⁴ J. Orloff, J. Handler, *Proc. II Intern. Pharmacol. Meeting, Praha*, v. 10, 1964, p. 133. ⁵ J. Orloff, J. Handler, *Am. J. Med.*, v. 42, 757 (1967). ⁶ J. Grantham, M. Burg, *J. Physiol.*, v. 211, 225 (1966). ⁷ H. Tost, G. Köver, E. Szöcs, *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.*, v. 37, 245 (1970). ⁸ S. Iard, M. Bernard, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 41, 781 (1970). ⁹ В. М. Бреслер, Ю. В. Наточин, *Бюлл. экп. биол. и мед.*, т. 75, 67 (1973). ¹⁰ С. Е. Бреслер, В. М. Бреслер, ДАН, т. 214, 936 (1974). ¹¹ Л. Узбб, *Ингибиторы ферментов и метаболизма*, М., 1966. ¹² T. Hoshi, H. Hayashi, *Japan J. Physiol.*, v. 20, 683 (1970). ¹³ Ю. В. Наточин, В кн.: *Физиология почки*, Л., 1972. ¹⁴ R. Mitchell, *XX Symp. Soc. General Microbiol.*, N. Y., 1970, p. 121. ¹⁵ В. П. Скулачев, *Трансформация энергии в биомембранах*, М., 1972. ¹⁶ В. П. Скулачев, *Усп. совр. биол.*, т. 77, 125 (1974).