

УДК 577.152:57.021

С.Д.Николаева (6 курс, каф. ЭФ),  
Р.Г.Парнова, д.б.н., вед.н.с. (ИЭФБ им. И.М.Сеченова)

## ОБНАРУЖЕНИЕ NO-СИНТАЗНОЙ АКТИВНОСТИ В ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ ЛЯГУШКИ

Оксид азота является одним из наиболее важных биологических медиаторов, вовлечённых в регуляцию огромного многообразия физиологических процессов – вазодилатацию, нейротрансмиссию, реакцию иммунной системы, состояние памяти и др. В тканях животных NO продуцируется ферментативно тремя различными изоформами NO-синтазы: индуцибельной (iNOS) или конститутивными (eNOS или nNOS). Они окисляют L-аргинин до L-цитруллина и NO. Для работы конститутивных изоформ фермента (нейрональной и эпителиальной) необходимы ионы  $Ca^{2+}$ , тогда как активность индуцибельной NO-синтазы не зависит от концентрации кальция. В нашей лаборатории было показано, что NO является одним из регуляторов водно-солевого баланса, обеспечивая торможение потока воды, стимулированного антидиуретическим гормоном, в мочевом пузыре лягушки. Оказалось, что негативный эффект NO на увеличение осмотической проницаемости опосредуется его действием на активность цитозольной гуанилатциклазы, нарастанием внутриклеточного цГМФ и активацией цГМФ-зависимой протеинкиназы.

Целью настоящей работы является исследование NO-синтазной активности в первичной культуре эпителиальных клеток мочевого пузыря лягушки. Клетки мукозного эпителия выделяли инкубацией мочевых пузырей в бескальциевой среде с добавлением ЭДТА и культивировали их в стерильных условиях в модифицированной среде L-15 с добавлением гентамицина. Количество NO, производимого клетками, определяли по количеству нитритов реактивом Грисса. Измерения производили через 1 или 2 суток культивации. Кроме того, исследовали влияние на активность фермента липополисахарида E.coli (ЛПС, активатора индуцибельной NO-синтазы, компонента клеточной стенки грам-отрицательных бактерий) и неселективного ингибитора всех типов NOS – L-NAME (1 мМ). Оказалось, что ЛПС (30 мкг/мл) увеличивал продукцию оксида азота в 1,65 раза, а под действием L-NAME продукция NO снизилась в 2,25 раза. Полученные данные свидетельствуют о том, что в эпителиальных клетках мочевого пузыря присутствует NO-синтазная активность, которая чувствительна к действию продуктов бактериального происхождения. Для определения типа NOS, присутствующей в эпителиальных клетках, был проведён иммуноблоттинг с использованием поликлональных антител против нейрональной и индуцибельной изоформ фермента, а также с антителами, специфичными для всех типов NOS. С антителами против nNOS получили 3 полосы, соответствующие белкам с молекулярной массой 130, 65 и 55 кДа. При использовании антител против iNOS получили полосу ~160 кДа. При этом мы не наблюдали отличий между контрольными клетками и клетками, стимулированными липополисахаридом. Полученные результаты позволяют предположить, что в эпителии мочевого пузыря лягушки присутствуют индуцибельная и нейрональная изоформы NO-синтазы. Вопрос об их функциональной роли остается пока открытым.