

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

ВЛИЯНИЕ ВОДНОЙ НАГРУЗКИ НА АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ МЕТАЛЛОЗАВИСИМЫХ ДЕГИДРОГЕНАЗ ПОЧКИ В УСЛОВИЯХ НОРМАЛЬНОГО ПОСТУПЛЕНИЯ АТОМОВИТОВ

THE INFLUENCE OF WATER LOAD ON THE ACTIVITY OF SOME METAL DEPENDENT DEHYDROGENASES OF KIDNEY WITH THE NORMAL INTAKE OF TRACE ELEMENTS

В.А. Козлов, А.Ю. Уфукова, А.С. Толмачев, П.Б. Карышев
V.A. Kozlov, A.Y. Ufukova, A.S. Tolmachev, P.B. Karyshev

Кафедра фармакологии, Медицинский институт, Чувашский государственный университет, Московский просп. 45, Чебоксары 428015 Россия.

Department of Pharmacology, Medical institute, Chuvash State University, Moskovsky Avenue 45, Cheboksary 428045 Russia.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: NADH-дегидрогеназа, NADPH-дегидрогеназа, сукцинатдегидрогеназа, почка, фамотидин, H_2 -рецепторы, водная нагрузка.

KEY WORDS: NADH-dehydrogenase, NADPH-dehydrogenase, succinate dehydrogenase, kidney, phamotidine, H_2 -receptor, water-load.

РЕЗЮМЕ: В экспериментах на 95 крысах исследовано влияние водной нагрузки и блокатора H_2 -гистаминовых рецепторов фамотидина на активность почечных дегидрогеназ в различных участках нефрона. Продемонстрировано, что водная нагрузка увеличивает активность NADH-дегидрогеназы в почечных клубочках и канальцах, но не в петлях Генле. Тогда как фамотидин вызывает снижение активности этого фермента без водной нагрузки, а при нагрузке фамотидин усиливает вызванное водной нагрузкой увеличение активности фермента. Водная нагрузка уменьшает активность NADPH-дегидрогеназы, а фамотидин увеличивает ее активность, как на фоне нагрузки, так и без нее. Активность сукцинатдегидрогеназы при водной нагрузке значительно уменьшалась только в клубочках юкстамедуллярных нефронов, а фамотидин увеличивал активность этого фермента, как на фоне нагрузки, так и без нее. Полученные данные свидетельствуют, что активность молибден-NADPH-, цинк-NADH-зависимых дегидрогеназ и железо зависимой сукцинатдегидрогеназы меняется при водной нагрузке и регулируется H_2 -гистаминовыми рецепторами.

ABSTRACT: The influence of water load and blockers of H_2 -histamine receptors of phamotidine on the activity of kidney dehydrogenase in different nephron parts was studied in the experiments with 95

rats/ Water load was shown to increase NADH-dehydrogenase activity in glomerules and tubules but not in Henlei ansas. Water load decreases NADPH-dehydrogenase activity while phamotidine increases its activity both with load and without it. Succinate dehydrogenase activity with water load considerably decreased only in glomerules of yukstamedullary nephrones but phamotidine increased the activity of this enzyme both with load and without it. Obtained data prove that the activity of molybdenium-NADPH, zinc-NADH dependent dehydrogenases and iron dependent succinate dehydrogenase changes with water load and is regulated by H_2 -histamine receptors.

Введение

Несмотря на то, что наличие механизмов активного транспорта в почках постулировано и изучаемо уже давно, однако механизмы медиаторной регуляции этих процессов и их энергетического обеспечения все еще мало изучены. Согласно основным положениям хемиосмотической теории Митчелла наработка макроэргов обеспечивается путем создания водородного градиента на митохондриальной мембране. Поэтому одним из косвенных показателей состояния энергообмена может служить изучение активности дегидрогеназ, ферментов — продуцирующих протоны.

Известно, что регуляция протонного транспорта и протоногенез в обкладочных железах желудка регулируется H_2 -гистаминовыми рецепторами, поэтому, исходя из теории молекулярных блоков В.Т. Ивашкина и соавт. (1990), следует ожидать, что аналогичные процессы в почках регулируются аналогичным образом. Поэтому в данном исследовании мы постарались выяснить — влияет ли функциональная нагрузка на активность почечных молибден NADPH-, цинк NADH зависимых дегидрогеназ и железо зависимой сукцинатдегидрогеназы и регулируется ли активность этих ферментов H_2 -гистаминовыми рецепторами.

Материалы, методы и объем исследования

Эксперименты проведены на 95 белых беспородных крысах обоего пола, массой от 140 до 160 г, содержащихся на стандартном рационе вивария. Отбор, обсервацию животных и количество проведенных экспериментов осуществляли согласно рекомендациям И.М. Трахтенберга и соавт. (1991). Экспериментальные крысы получали водную нагрузку 6% от массы тела внутрибрюшинно. Часть этих крыс сразу же получала фамотидин 1мг/кг массы подкожно. Другая группа крыс получала только фамотидин без водной нагрузки. В каждой группе часть крыс не получала ни водной нагрузки ни фамотицина и служила контролем. После выполненных манипуляций все крысы разделялись на пять групп: контроль, забиваемые через 1 час после инъекций, через 2, 3 и 4 часа. Контрольные крысы были забиты вместе с 4 часовой группой. Забой животных осуществляли путем эфирной эвтаназии. Почки животных извлекали сразу же после прекращения дыхания и замораживали на предварительно охлажденных до $-18^{\circ}C$ криостатных блоках, после чего из них были изготовлены криостатные срезы.

Активность NADH-, NADPH зависимых дегидрогеназ и сукцинатдегидрогеназы исследовали тетразолиевым методом по З. Лойда и соавт. (1982). Почечные срезы сразу же после постановки реакции фиксировали нейтральным формалином, отмывали водой и заделывали в глицерин-желатин, закрывали бальзамом. Фотометрию проводили в проходящем свете по поглощению (красный светофильтр ($\lambda_{max}=625\pm 9$ нм, запирающий светофильтр 640 ± 11 нм), на люминесцентном микроскопе “Люмам-4”. Измерение осуществляли с помощью микрофлюориметра ФМЭЛ-1А. Дифференциацию отдельных участков нефрона осуществляли согласно рекомендациям А. Хэм, Д. Кормак (1983).

Электрические параметры определялись следующими показателями: входное напряжение 900В, сопротивление усилителя 10^6 Ом. В насадке был установлен зонд 1,5. Для измерения использовался ФЭУ-79, показания снимались с цифрового вольт-

метра на котором при измерении пустого участка стекла устанавливалось значение 1, принимаемое за 100%. На каждом срезе плаг-методом измерялось светопоглощение 10 исследуемых объектов.

Полученный цифровой материал был пересчитан по формуле $D=\lg(I_0/I)$, где D — оптическая плотность (безразмерная величина), $I_0=1$, I — показатель вольтметра, данные каждого среза служили для вычисления средней, которая исследовалась как статистическая величина, ошибки складывали, согласно правилу сложения ошибок (Агроскин, Папаян, 1977).

Полученный цифровой материал обработан статистически по методу Стьюдента с помощью прикладной программы EXCEL из пакета Microsoft Office 2000 в среде WINDOWS-98 при третьем аргументе равном “2” и четвертом аргументе равном “3”. Выбор аргументов связан с тем, что мы использовали несвязанные попарно выборки, для статистической оценки которых рекомендовано использовать ненаправленную гипотезу, кроме того, мы имели случай с несовпадающей в выборках дисперсией (Карлберг, 1995). Корреляционный анализ проведен с помощью того же пакета прикладных программ.

Результаты и их обсуждение

Водная нагрузка вызывала умеренное увеличение активности цинк-NADH зависимой дегидрогеназы в клубочковом аппарате почки, реакция истощивалась к четвертому часу наблюдения (табл. 1). Достоверных различий между водной нагрузкой и фамотидином на фоне водной нагрузки, кроме четвертого часа, не наблюдалось. В канальцевом аппарате после начального угнетения активности фермента происходило ее возрастание в 3-й час, особенно сильное в проксимальных отделах. В петлях Генле статистических изменений активности фермента не наблюдалось.

Фамотидин без нагрузки водой вызывал стойкое подавление активности NADH дегидрогеназы в субкапсулярных клубочках, тогда как в клубочках юкстамедуллярных нефронов эта реакция наблюдалась только в первый час эксперимента. В канальцевом аппарате стойкое снижение активности фермента наблюдалось в проксимальных отделах, а в дистальных реакция была колебательной, и после снижения активности в первый час происходило ее восстановление до исходного уровня во 2-й и 3-й часы наблюдения, а затем активность фермента подавлялась вновь.

В клубочковом аппарате фамотидин не изменял ответ NADH дегидрогеназы на водную нагрузку, аналогично происходило увеличение активности фермента в течение первых трех часов эксперимента, а к четвертому — активность восстанавливалась до исходного уровня. Разнонаправленность ответа на введение фамотицина хорошо демонст-

ТАБЛИЦА 1. Влияние водной нагрузки (N=11, n=100), фамотидина 1 мг/кг, п/к (N=3, n=30) и водной нагрузки на фоне фамотидина (N=5 n=50) на активность почечной NADHдегидрогеназы в различных отделах нефрона и зонах почки.

Объект	Водная нагрузка					Фамотидин без водной нагрузки					Фамотидин на фоне водной нагрузки					r_1	r_2
	И	1-й час	2-й час	3-й час	4-й час	И	1-й час	2-й час	3-й час	4-й час	И	1-й час	2-й час	3-й час	4-й час		
		0,16	0,17	0,17	0,16		0,16	0,056	0,077	0,081		0,085	0,12	0,16	0,19		
субкапсулярные	M	0,14	0,16	0,17	0,17	0,16	0,1	0,056	0,077	0,081	0,085	0,12	0,16	0,19	0,17	0,11	
	$\pm m$	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,009	0,003	0,004	0,006	0,005	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	
	$p_1 <$		0,05	0,001	0,05	NS		0,001	0,05	NS	NS		0,01	0,001	0,001	NS	
	$p_3 <$						0,002	0,001	0,001	0,001	0,001	NS	NS	NS	NS	0,001	
Клубочки	M	0,14	0,15	0,18	0,18	0,16	0,09	0,06	0,09	0,1	0,1	0,13	0,16	0,20	0,16	0,15	
	$\pm m$	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,005	0,004	0,005	0,005	0,005	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	
	$p_1 <$		NS	0,001	0,01	NS		0,001	NS	NS	NS		0,05	0,001	0,01	NS	
	$p_2 <$	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,05	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,001	
субкапсулярные	M	0,31	0,27	0,28	0,37	0,45	0,28	0,10	0,17	0,16	0,15	0,23	0,26	0,32	0,28	0,18	
	$\pm m$	0,02	0,01	0,02	0,02	0,04	0,019	0,008	0,013	0,016	0,008	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	
	$p_1 <$		0,05	NS	0,05	0,001		0,001	0,001	0,001	0,001		NS	0,001	0,001	0,001	
	$p_3 <$						NS	0,001	0,001	0,001	0,001	NS	NS	NS	0,001	0,001	
Канальцы	M	0,31	0,27	0,29	0,37	0,34	0,19	0,11	0,18	0,20	0,14	0,26	0,19	0,26	0,22	0,19	
	$\pm m$	0,01	0,02	0,02	0,02	0,03	0,005	0,008	0,017	0,016	0,005	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	
	$p_1 <$		0,05	NS	NS	0,001		0,001	NS	NS	NS		0,001	NS	0,01	0,001	
	$p_2 <$	NS	NS	NS	NS	0,05	0,001	NS	NS	0,05	NS	0,001	NS	NS	0,05	NS	
Петли Генле	M	0,33	0,32	0,35	0,38	0,32	0,36	0,12	0,23	0,22	0,14	0,3	0,27	0,26	0,23	0,28	
	$\pm m$	0,01	0,02	0,03	0,02	0,02	0,05	0,011	0,02	0,02	0,005	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	
	$p_1 <$		NS	NS	NS	NS		0,001	0,05	0,05	0,001		0,05	0,005	0,001	NS	
	$p_2 <$					NS	NS	0,001	0,001	0,001	0,001	0,01	0,05	0,001	0,001	0,001	

Примечание: здесь и далее p_1 — достоверность различий по отношению к интактной ткани;

p_2 — достоверность различий по отношению к аналогичному объему;

p_3 — достоверность различий по отношению к аналогичной временной точке на водной нагрузке;

r_1 — коэффициент корреляции, вычислен между рядами "Водная нагрузка" и "Фамотидин без водной нагрузки";

r_2 — коэффициент корреляции, вычислен между рядами "Водная нагрузка" и "Фамотидин на фоне водной нагрузки";

NS — не статистичный результат.

ТАБЛИЦА 2. Влияние водной нагрузки (N=11, n=100), фамотидина 1 мг/кг, п/к (N=3, n=30) и водной нагрузки на фоне фамотидина (N=6 n=60) на активность почечной НАДРНдегидрогеназы в различных отделах нефрона и зонах почки.

Объект	Водная нагрузка				Фамотидин без водной нагрузки				Фамотидин на фоне водной нагрузки				r ₁	r ₂			
	И	1-й час	2-й час	3-й час	4-й час	И	1-й час	2-й час	3-й час	4-й час	И	1-й час			2-й час	3-й час	4-й час
		0,07	0,06	0,06	0,07		0,07	0,049	0,064	0,078		0,063			0,052	0,05	0,09
Клубочки	субкапсулярные	±m	0,01	0,01	0,01	0,01	0,003	0,003	0,005	0,004	0,004	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	
		p ₁ <	NS	0,05	0,01	NS	0,001	0,001	0,001	0,01	NS	NS	0,05	0,01	0,01	NS	
		p ₃ <				0,001	0,05	NS	0,05	0,005	0,005	0,001	0,02	NS	0,001	0,001	
		M	0,08	0,06	0,07	0,06	0,04	0,07	0,10	0,07	0,08	0,06	0,1	0,06	0,11	0,04	
Канальцы	субкапсулярные	±m	0,01	0,01	0,01	0,01	0,003	0,003	0,009	0,003	0,005	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	
		p ₁ <	NS	0,05	0,005	NS	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	NS	0,05	0,05	0,005	NS	
		p ₂ <	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
		p ₃ <				0,001	NS	NS	0,05	0,11	0,12	0,14	0,22	0,15	0,19	0,06	
Петли Генле	дистальные	±m	0,19	0,12	0,12	0,14	0,09	0,13	0,16	0,10	0,15	0,16	0,16	0,09	0,17	0,07	
		p ₁ <	NS	0,001	0,001	0,001	0,006	0,005	0,007	0,006	0,007	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	
		p ₂ <	NS	NS	NS	NS	0,001	0,01	0,05	NS	0,001	NS	0,001	NS	NS	0,001	
		p ₃ <				0,001	0,01	NS	0,05	NS	0,001	NS	0,001	NS	0,001	NS	
	M	0,17	0,16	0,19	0,13	0,15	0,17	0,17	0,16	0,16	0,16	0,23	0,18	0,18	0,12	0,12	
	±m	0,01	0,01	0,01	0,01	0,005	0,006	0,005	0,005	0,005	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	
	p ₁ <	NS	NS	NS	0,001	NS	0,05	NS	NS	NS	NS	0,001	NS	NS	NS	NS	
	p ₂ <				0,004	0,002	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	NS	0,000	NS	0,000	0,001	

рируется расчетом корреляционных отношений между водной нагрузкой без введения фамотидина и введением фамотидина без водной нагрузки r_1 (средняя отрицательная корреляция, $p < 0,05$) и между водной нагрузкой без введения фамотидина и водной нагрузкой на фоне введения фамотидина — r_2 (сильная положительная корреляция, $p < 0,01$).

Если водная нагрузка сначала снижала активность фермента в проксимальных канальцах, а затем вызывала ее рост, то на фоне фамотидина реакция инверсировалась — происходил умеренный рост активности, а затем снижение ее ниже исходного уровня, корреляция сильная отрицательная ($p < 0,01$). Поскольку фамотидин без водной нагрузки просто сильно снижал активность фермента, то между реакцией на водную нагрузку и реакцией на фамотидин без водной нагрузки корреляции не наблюдается.

В петлях Генле фамотидин снижал активность фермента, не смотря на водную нагрузку, однако эта реакция была менее выражена, чем снижение активности фермента, вызванное одним фамотидином. Во всех случаях, как правило, не наблюдалось значительных различий между величиной ответа между субкапсулярными и юкта клубочками и проксимальными и дистальными канальцами в аналогичный момент времени.

Активность NADPH дегидрогеназы водной нагрузкой в клубочках изменялась противоположно изменению активности NADH дегидрогеназы в тех же отделах нефрона — происходило снижение активности фермента (Табл. 2). Аналогичный ответ наблюдался и в канальцевом аппарате, однако в проксимальных канальцах реакция была колебательной. Поэтому во всех случаях вычисления корреляционных отношений, наблюдается отрицательная корреляция ($p < 0,05$), кроме отношения “водная нагрузка” к “фамотидин без водной нагрузки”, где корреляция не обнаруживается. В петлях Генле снижение активности фермента наблюдалось только к третьему часу, а к четвертому — происходило восстановление до исходного уровня.

Фамотидин в клубочках, дистальных канальцах и петлях Генле вызывал реакцию противоположную ответу на водную нагрузку, в том числе и на фоне нагрузки. А в субкапсулярных канальцах активность фермента либо не менялась, либо — в третий час — снижалась.

Водная нагрузка практически не меняла активность сукцинатдегидрогеназы во всех отделах нефрона, кроме клубочков юкстамедулярных нефронов, где происходило снижение активности фермента (Табл. 3). Фамотидин вызывал колебательные изменения активности фермента в субкапсулярных клубочках, при этом в первый час активность фермента возрастала, а в третий — снижалась. Уменьшение активности наблюдалось в проксимальных канальцах и петлях Генле в третий час наблюдения и в дистальных — в первый. При этом корреляция между “водной нагрузкой” и

“фамотидином без водной нагрузки” отрицательная. Однако на фоне водной нагрузки фамотидин вызывал увеличение активности сукцинатдегидрогеназы в клубочках и проксимальных канальцах, в последних - к четвертому часу - происходило подавление ферментативной активности. В дистальных канальцах активность фермента в первый и четвертый часы снижалась, а в петлях Генле ответ было колебательным — снижение активности в первый час и увеличение во второй и четвертый. Корреляционные отношения между ответом на водную нагрузку с и без фамотидина в клубочковом аппарате отрицательные ($p < 0,05$), а в проксимальных канальцах — положительные.

Выводы

1. Водная нагрузка вызывает значительные изменения активности NADH и NADPH зависимых дегидрогеназ и практически не влияет на активность сукцинатдегидрогеназы в почках.

2. Фамотидин вызывает уменьшение активности NADH зависимой дегидрогеназы и увеличение активности NADPH зависимой дегидрогеназы, практически не влияя на активность сукцинатдегидрогеназы.

3. Введение фамотидина не влияет на направленность изменения активности NADH зависимой дегидрогеназы, вызванное водной нагрузкой в субкапсулярных клубочках и проксимальных канальцах, но реверсирует ответ в юкта клубочках и петлях Генле.

4. Фамотидин препятствует реализации ответа NADPH зависимой дегидрогеназы на водную нагрузку.

5. Фамотидин изменяет активность сукцинатдегидрогеназы как при изолированном введении, так и при сочетании с водной нагрузкой.

6. Активность цинк-NADH-, молибден-NADPH зависимых дегидрогеназ и сукцинатдегидрогеназы регулируется H_2 -гистаминовыми рецепторами.

Литература

- Агроскин Л.С., Папаян Г.В. 1977. Цитофотометрия. Л.: Наука. 295 с.
- Ивашкин В.Т., Минаян Г.Я., Уголев А.М. 1990. Теория функциональных блоков и проблемы клинической медицины. Л.: Наука. 303 с.
- Карлберг К. 1995. EXCEL 5 для Windows в вопросах и ответах. С.-Пб.: ВHV-Санкт-Петербург. 416 с.
- Лойда З., Госсрау Р., Шиблер Т. 1982. Гистохимия ферментов. М.: Мир. 272 с.
- Трахтенберг И.М., Сова Р.Е., Шефтель В.О., Онищенко Ф.А. 1991. Проблемы нормы в токсикологии (современные представления и методические подходы, основные параметры и константы). М.: Медицина. 208 с.
- Хэм А., Кормак Д. 1983. Гистология Т.5. М.: Мир. 296 с.

ТАБЛИЦА 3. ВЛИЯНИЕ ВОДНОЙ НАГРУЗКИ (N=6, n=60), ФАМОТИДИНА НА ФОНЕ ВОДНОЙ НАГРУЗКИ (N=6, n=60) НА АКТИВНОСТЬ ПОЧЕЧНОЙ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ.

Объект		Водная нагрузка				Фамотидин без водной нагрузки				Фамотидин на фоне водной нагрузки				r ₁	r ₂			
		И	1-й час	2-й час	3-й час	4-й час	И	1-й час	2-й час	3-й час	4-й час	И	1-й час			2-й час	3-й час	4-й час
			0,043	0,044	0,036	0,044		0,035	0,047	0,071	0,045		0,028			0,054	0,035	0,051
Клубочки	субкапсулярные	±m	0,003	0,004	0,004	0,005	0,003	0,007	0,004	0,003	0,008	0,003	0,005	0,008	0,003	0,005		
		p ₁ <	NS	NS	NS	0,05		0,05	NS	0,05	NS		0,01	0,001	NS	NS		
		p ₃ <					0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	NS	0,01	NS	NS	0,05		
		M	0,062	0,047	0,039	0,052	0,042	0,084	0,072	0,046	0,073	0,060	0,048	0,087	0,031	0,117		
Канальцы	юкста	±m	0,005	0,003	0,004	0,004	0,003	0,006	0,004	0,004	0,009	0,005	0,004	0,008	0,003	0,05		
		p ₁ <		0,001	0,001	NS	0,001		NS	NS	NS		NS	0,01	0,001	0,05		
		p ₂ <	0,001	NS	NS	NS	NS	NS	0,001	0,001	NS	NS	NS	NS	NS	0,005		
		p ₃ <						NS	NS	0,05	NS	NS	NS	0,001	0,001	0,01		
Петли Генле	субкапсулярные	M	0,264	0,292	0,261	0,3	0,253	0,210	0,242	0,207	0,167	0,202	0,252	0,233	0,312	0,190		
		±m	0,012	0,015	0,016	0,019	0,014	0,011	0,012	0,017	0,011	0,011	0,017	0,015	0,017	0,019		
		p ₁ <		NS	NS	NS	NS		NS	NS	0,01	NS		NS	0,02	0,02		
		p ₃ <						0,001	0,001	0,01	0,001	0,02	NS	NS	NS	0,02		
Петли Генле	дистальные	M	0,235	0,230	0,219	0,234	0,232	0,252	0,208	0,268	0,210	0,273	0,229	0,215	0,224	0,116		
		±m	0,007	0,01	0,018	0,014	0,01	0,015	0,006	0,014	0,013	0,013	0,009	0,008	0,02	0,02		
		p ₁ <		NS	NS	NS	NS		0,01	NS	NS	NS		NS	NS	0,001		
		p ₂ <	0,05	0,002	NS	0,005	NS	0,05	0,05	0,05	0,05	0,001	NS	0,001	NS	0,01		
Петли Генле		p ₃ <					NS	NS	0,005	0,05	NS	NS	NS	NS	0,001			
		M	0,259	0,227	0,241	0,316	0,239	0,291	0,257	0,303	0,212	0,264	0,207	0,249	0,219	0,297		
		±m	0,012	0,012	0,014	0,013	0,013	0,015	0,008	0,010	0,008	0,012	0,02	0,009	0,02	0,009		
		p ₁ <		NS	NS	0,002	NS		NS	NS	0,001	NS		0,01	NS	0,001		
	p ₂ <						NS	NS	0,01	0,002	NS	0,003	NS	0,001	0,001			