

ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ АКАДЕМИИ НАУК СССР

---

*На правах рукописи*

**Н. А. ВИНОГРАДОВА**

**РАСПРЕДЕЛЕНИЕ САХАРОВ  
МЕЖДУ ПОРТНЯЖНЫМИ МЫШЦАМИ  
ЛЯГУШКИ И СРЕДОЙ**

104. ЦИТОЛОГИЯ

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

ЛЕНИНГРАД

1968

Н. А. ВИНОГРАДОВА

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ САХАРОВ  
МЕЖДУ ПОРТНЯЖНЫМИ МЫШЦАМИ  
ЛЯГУШКИ И СРЕДОЙ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель —  
член-корреспондент АН СССР,  
профессор А. С. ТРОШИН

ЛЕНИНГРАД  
1968



Работа выполнена в лаборатории физиологии клетки Института цитологии АН СССР (директор член-корр. АН СССР, проф. А. С. Трошин).

Диссертация изложена на 152 страницах машинописи с 13 таблицами и 24 рисунками.

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

член-корреспондент АН СССР, доктор медицинских наук,  
профессор А. М. Уголев,

кандидат биологических наук Г. А. Наследов

Защита диссертации состоится « 14 » *февраля* 1969 г.  
в Институте цитологии АН СССР.

Отзыв дан Ленинградским Государственным Университетом  
имени А. А. Жданова

Отзывы просим присылать по адресу:  
Ленинград, Ф-121, пр. Маклина, д. 32, Институт цитологии АН СССР,  
Ученому секретарю

Автореферат разослан « 10 » *января* 1969 г.

Ученый секретарь — кандидат биологических наук Г. П. Пинаев

Исследование характера распределения сахаров между клеткой и средой является составной частью проблемы клеточной проницаемости. Эта проблема включает в себя изучение механизмов транспорта веществ через поверхностную мембрану и закономерностей стационарного распределения веществ между клеткой и средой.

В настоящее время большинство авторов придерживается гипотезы о транспорте сахаров в клетки при помощи системы переносчиков, локализованной в поверхностной мембране клеток (см. Трошин, 1956, Никольский, 1965). Стационарное распределение сахаров между клеткой и средой зависит от таких факторов, как наличие системы активного транспорта, свойства внутриклеточной воды, адсорбционное и химическое связывание вещества компонентами протоплазмы и участие проникающего в клетки вещества в метаболических процессах.

Имеющиеся в литературе данные свидетельствуют о том, что характер транспорта и распределения не одинаков для различных сахаров. Относительно причин этого явления не существует единого мнения.

В ряде работ были получены факты, показывающие, что большинство сахаров в течение опыта либо практически не проникает в мышечные волокна (Park et al., 1957, Sacks, 1960), либо проникает чрезвычайно медленно (Narahara and Özand, 1963). Инсулин и другие агенты ускоряют этот процесс. Состояние равновесия характеризуется выравниванием концентраций сахаров в клетке и в среде. Имеются также работы (Norman et al., 1961, Carlin and Hechter, 1961), авторы которых считают, что в норме все сахара могут проникать в мышечные волокна, но для их распределения доступна лишь небольшая часть внутриклеточной воды. Причиной ограниченного распределения сахаров авторы считают не только специфичность транспорта, но и наличие внутриклеточных барьеров, препятствующих диффузии сахаров. В условиях стимуляции транспорта проницаемость таких внутриклеточных барьеров увеличивается, но в разной степени по отношению к различным сахарам. Высказывалось также предполо-

жение, что уровень поглощения сахаров мышцами определяется сниженной их растворимостью во внутриклеточной воде (Камнев, 1938, Трошин, 1951, 1956, Ling, 1965, 1966).

Во всех работах, посвященных изучению механизмов распределения веществ между мышцей и средой, при расчетах внутриклеточной концентрации проникающего в волокна вещества необходимым условием является точное знание величины внеклеточного пространства. Хотя априори кажется, что определение межклеточного пространства не представляет особых трудностей, в литературе приводятся противоречивые данные о размерах внеклеточного пространства портняжных мышц лягушки: от 6—9% до 16—22% от сырого веса. Такой разброс величин межклеточного пространства во многом зависит от способа его определения.

Для понимания характера распределения веществ между мышцей и средой большое значение имеют данные о наличии в скелетных мышечных волокнах двух ограниченных мембранами структур: сложно-организованной системы саркоплазматического ретикулума и *T*-системы, представляющей собой глубокие узкие впячивания поверхностной мембраны (см. Birks, 1964, Peachey, 1965).

Задача настоящей работы состояла в том, чтобы исследовать характер стационарного распределения различных сахаров между портняжными мышцами лягушки и средой. Для этой цели исследовалось поступление в мышцы в норме и при действии инсулина следующих сахаров: *d*-галактозы, *d*-фруктозы, *l*- и *d*-арабинозы и *d*-ксилозы. Такой выбор сахаров позволял изучить зависимость характера их распределения от размера и строения молекулы, а также проверить стереоспецифичность стимулирующего влияния инсулина на примере стереоизомеров арабинозы. В задачу работы также входило исследование изменений величины доступного для сахаров пространства при набухании и отбухании мышц, когда, согласно морфологическим исследованиям, изменяется объем *T*-системы и элементов саркоплазматического ретикулума. Для решения поставленной задачи было необходимо уделить особое внимание характеристике межклеточного пространства портняжных мышц лягушки в норме и изменению его величины в различных экспериментальных условиях.

## МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования служили портняжные мышцы травяной лягушки (*Rana temporaria*). Мышцы, отпрепарованные без косточки, выдерживались 1—2 часа в растворе Рингера комнатной температуры и затем переносились в раствор, содержащий исследуемое вещество, сроком на 2 часа при тем-

температуре 18—20° и на 18—20 часов при температуре 16°. После инкубации мышцы обсушивались и взвешивались. В тех случаях, когда необходимо было учитывать изменение веса, мышцы взвешивались до и после инкубации. Для определения количества вещества, вошедшего в мышцу за период инкубации, мышцы помещались в 3 мл раствора Рингера на 12—18 часов при температуре 2—4°. В течение этого срока происходит полное вымывание инулина и сахаров из мышц.

Для характеристики изменений величины пространства, доступного для сахаров и инулина в вакуолизованных мышцах, последние выдерживались в течение 2 часов в растворе Рингера, содержащем 220 мМ глицерина, а затем переносились в нормальный раствор Рингера. При выходе глицерина из мышц развивается вакуолизация мышечных волокон (Кроленко, 1968).

Для изучения кинетики выхода сахаров из мышц проводилось дробное вымывание исследуемых веществ из мышц, для чего последние переносились через определенные промежутки времени из одной порции отмывающего раствора (2 мл) в другую.

В работе использовались 0,5% растворы сахаров и инулина, за исключением тех случаев, когда исследовалась зависимость содержания веществ в мышце от наружной концентрации.

В опытах с влиянием инсулина растворы готовились на 20 мМ трис-НСI буфере, рН — 7,2. Для сохранения тоничности из раствора удалялось соответствующее количество NaCl.

Определение сахаров и инулина в отмывающей жидкости проводилось после предварительного осаждения белков. Фруктоза, сахароза, раффиноза и инулин определялись по реакции с дифениламином, галактоза — антроновым методом, арабиноза и ксилоза — по реакции с *n*-броманилином. Для определения сахарозы —  $C^{14}$  0,1—0,2 мл отмывающего раствора наносились на латунную тарелочку и выпаривались. Активность определялась с помощью торцового счетчика Гейгера—Мюллера.

Содержание вещества в мышце характеризовалось количеством его, приходящимся на 100 г сырого веса ткани. Все расчеты проводились на первоначальный вес мышц, что позволяло оценить изменения абсолютной величины доступного пространства при изменении веса мышц. Величина пространства, доступного для данного вещества в мышце, равна процентному отношению содержания этого вещества в мышце к его концентрации в среде.

В опытах, где исследовалась кинетика выхода вещества, количество вещества, относящееся к данной фракции, и кон-

станта скорости рассчитывались по схеме, описанной Трошиным (1957) и Хиллом и Макферсоном (Hill and Macpherson, 1954) для диффузии веществ из плоско-параллельной пластинки.

Все данные были подвергнуты статистической обработке.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Межклеточное пространство портняжных мышц лягушки

Величина межклеточного пространства определялась по распределению инулина между мышцей и средой. Инулин представляет собой состоящий из молекул фруктозы полисахарид с молекулярным весом порядка 6000 и радиусом молекулы около 12 Å.

Величина инулинового пространства может служить характеристикой межклеточного пространства только в условиях диффузионного равновесия. Исследование зависимости величины инулинового пространства от времени инкубации мышц в растворе Рингера, содержащем инулин, показало, что диффузионное равновесие устанавливается к 2 часам инкубации; и в течение последующих 6 часов величина инулинового пространства не увеличивается. Это последнее обстоятельство может свидетельствовать, во-первых, о том, что инулин не проникает в мышечные волокна, а находится в межклеточном пространстве, и, во-вторых, что за время инкубации не происходит повреждения мышечных волокон, так как повреждение мышц сопровождается увеличением инулинового пространства (Васянин и др., 1967).

Исследование зависимости содержания инулина в мышцах от его наружной концентрации показало, что в пределах исследованных концентраций (от 250 до 1000 мг%) содержание инулина в мышцах линейно зависит от его наружной концентрации. Такой характер концентрационной кривой свидетельствует об отсутствии в данных условиях заметной адсорбции или связывания инулина (Трошин, 1956).

Для характеристики локализации инулина в мышцах изучалась кинетика выхода инулина из мышц. Если рассматривать мышцу как плоско-параллельную пластинку и предположить, что инулин находится в межклеточном пространстве, то выход его из мышц должен подчиняться диффузионной кинетике (Hill and Macpherson, 1954, Трошин, 1957). Экстраполяция прямолинейного участка кривой выхода к нулевому времени позволяет определить величину пространства, занимаемого каждой фракцией. По наклону прямолинейных участков кривых можно рассчитать величину константы скорости ( $k$ ) для каждой фракции.

Кривая выхода инулина может быть разложена на две экспоненты, соответствующие двум фракциям инулина. Это свидетельствует о том, что выход инулина происходит из неомогенного объема. Пространство, занимаемое медленной фракцией инулина, равно 12% от сырого веса мышцы, и  $k$  равно  $5,9 \cdot 10^{-4} \text{ сек}^{-1}$ . Быстрой фракции соответствует пространство, равное 8% и  $k$  равно  $45,5 \cdot 10^{-4} \text{ сек}^{-1}$ . (Общее инулиновое пространство мышц этой серии опытов было равно  $20,0 \pm 1,6\%$  от сырого веса мышцы). Можно предположить, что быстрая фракция представляет собой инулин, диффундирующий не из межклеточного пространства, а с поверхности мышц и из остатков сухожилий. Для проверки этого предположения была поставлена специальная серия опытов, в которой мышцы не просто обсушивались, но из них отжималось дополнительное количество воды. После такой процедуры инулиновое пространство уменьшалось, и быстрая фракция полностью отсутствовала.

Для решения вопроса о локализации вещества в ткани может быть использована величина коэффициента диффузии. Коэффициент диффузии рассчитывался по формуле:

$$D = \frac{k(2b)^2}{\pi^2},$$

где  $D$  — коэффициент диффузии,  $k$  — константа скорости выхода вещества,  $b$  — половина толщины мышцы. Во всех расчетах толщина мышцы принималась равной 0,7 мм. Для поверхностной фракции коэффициент диффузии не может быть рассчитан, так как неизвестен путь диффузии. Для межклеточной фракции величина коэффициента диффузии инулина равна  $0,030 \cdot 10^{-5} \text{ см}^2/\text{сек}$ . Коэффициент диффузии инулина в воде при  $20^\circ$  равен  $0,130 \cdot 10^{-5} \text{ см}^2/\text{сек}$  (Phelps, 1965). Аналогичное замедление в 4 раза было получено в работе Хилла и Макферсона (Hill and Macpherson, 1954) для ионов  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{J}^-$  и  $\text{Br}^-$ . Авторы рассчитали, что такое замедление диффузии является кажущимся, оно не связано с диффузией веществ в мышечных волокнах, а является результатом удлинения пути из-за обтекания диффундирующим веществом волокон.

Таким образом, весь приведенный материал свидетельствует о том, что инулиновое пространство действительно характеризует внеклеточное пространство портняжных мышц лягушки. Это пространство состоит из истинного межклеточного объема, т. е. пространства между волокнами, а также некоторого объема, локализованного, очевидно, непосредственно на поверхности мышц и в остатках сухожилий. Величина истинного межклеточного пространства, определенного по медленной фракции инулина, практически совпадает с величиной межклеточного пространства, определенного на порт-



ных мышц лягушки геометрическим способом (Кроленко и др., 1965).

При определении инулинового пространства портняжных мышц лягушки были замечены значительные колебания величины инулинового пространства от серии к серии. Для оценки индивидуальных колебаний была поставлена специальная серия из 169 опытов на одной партии лягушек. Величина инулинового пространства для этой серии опытов лежит в пределах от 9 до 28%, при среднем значении, равном  $19,0 \pm 0,2\%$ . По результатам этой серии была построена вариационная кривая, и было получено, что распределение данного признака является нормальным (Плохинский, 1961). Можно предположить, что случайными факторами, влияющими на величину межклеточного пространства, являются вес и содержание воды в мышцах. В наших опытах корреляция величины инулинового пространства и веса мышц отсутствует, в то время как наблюдается статистически достоверное увеличение инулинового пространства при возрастании содержания воды в мышцах. Наблюдаемая корреляция скорее всего является результатом погрешности обсушивания мышц, и, как будет показано, едва ли может быть связана с различным содержанием воды в мышечных волокнах.

Значительные изменения величины инулинового пространства портняжных мышц были получены при изменении тоничности окружающего раствора. Уменьшение тоничности раствора Рингера за счет уменьшения концентрации NaCl вызывало набухание мышц и уменьшение инулинового пространства от  $22,0 \pm 0,6\%$  в норме до  $17,0 \pm 0,6\%$ . Увеличение тоничности раствора Рингера за счет увеличения концентрации NaCl вдвое вызывало потерю воды мышцами и увеличение инулинового пространства от  $23,0 \pm 0,6\%$  в норме до  $26,0 \pm 0,8\%$ . Наблюдаемые изменения величины инулинового пространства обратимы.

Особый интерес представляют опыты, в которых тоничность раствора увеличивалась за счет добавления к раствору Рингера 220 мМ глицерина. В этих условиях уменьшение веса мышц сопровождалось одновременным уменьшением инулинового пространства от  $18,0 \pm 0,6$  в норме до  $14,0 \pm 0,5\%$ . При перенесении мышц в нормальный раствор Рингера, когда по данным Кроленко и Адамян (1967) наблюдается вакуолизация мышечных волокон, одновременно с увеличением веса мышц инулиновое пространство возрастает до  $21,0 \pm 0,8\%$ . Повторная инкубация в растворе Рингера с глицерином снимает вакуолизацию волокон и приводит к уменьшению веса мышц и снижению величины инулинового пространства, что свидетельствует об отсутствии повреждения волокон в процессе вакуолизации. Наиболее вероятно, что изменение вели-

чины межклеточного пространства, связанные с изменением объема мышц, обусловлены изменением «упаковки» волокон в мышце. В работах Кроленко и др. (1965) и Блинкса (Blinks, 1965) было показано, что при изменении объема волокна меняется форма его поперечного сечения, и, следовательно, конфигурация и объем межклеточного пространства.

Полученные данные о значительных индивидуальных колебаниях величины инулинового пространства, о сезонных его изменениях, и об изменении его величины в различных экспериментальных условиях привели к выводу о необходимости определения величины межклеточного пространства в каждом опыте параллельно определению других параметров.

### Распределение сахаров между портняжными мышцами и средой

Инкубация мышц в растворах сахаров в течение 2 часов при температуре 18—20° не дает возможности выявить достоверные различия величины пространства, занимаемого в мышцах *l*- и *d*-арабинозой, *d*-галактозой и фруктозой. Величина занимаемого этими сахарами пространства лежит в пределах 24—26%.

Постановка опытов с более длительными сроками инкубации (18—20 часов), а также изучение стимулирующего влияния инсулина на поступление сахаров позволили обнаружить существенные различия в характере распределения изученных сахаров. Несмотря на значительные индивидуальные колебания, наблюдается медленное увеличение содержания в мышцах *l*-арабинозы и *d*-галактозы. Пространство, занимаемое ими в мышцах после 20 часов инкубации достигало  $45,0 \pm 1,8\%$  и  $38,0 \pm 1,5\%$ , соответственно. Пространство, занимаемое в мышцах *d*-арабинозой и фруктозой практически не менялось.

Влияние инсулина исследовалось в опытах с *d*-галактозой, *d*-ксилозой, *l*- и *d*-арабинозой, фруктозой и сахарозой. Инкубация мышц продолжалась 12—18 часов при температуре 16—18°. В присутствии инсулина (0,5 ед/мл) пространство, занимаемое *l*-арабинозой увеличивалось от  $34,0 \pm 1,7\%$  в норме до  $65,0 \pm 1,8\%$ , *d*-ксилозой — от  $32,0 \pm 2,0\%$  до  $43,0 \pm 2,0\%$  и *d*-галактозой — от  $25,0 \pm 2,4\%$  до  $56,0 \pm 3,2\%$ . Пространство, занимаемое *d*-арабинозой, фруктозой и сахарозой было равно  $23,0 \pm 1,5\%$ ,  $21,0 \pm 1,0\%$  и  $19,0 \pm 0,8\%$ , соответственно как в присутствии инсулина, так и без него. Опыты с влиянием инсулина на распределение *l*-арабинозы при двух концентрациях ее в среде показали, что в условиях равновесия пространство, занимаемое *l*-арабинозой в мышце, равно 73% для обеих концентраций. Совпадение величин указывает на от-

сутствие существенной адсорбции, химического связывания или системы активного аккумулярования *l*-арабинозы внутри мышечных волокон. При содержании воды в мышцах, равном 80%, около 90% тканевой воды оказывается доступным для *l*-арабинозы, т. е. около 10% воды мышц не является растворителем. Аналогичные данные о доступности 90% внутриклеточной воды волокон портняжных мышц лягушки были получены для 3-0-метилглюкозы (Narahara and Özand, 1963).

Для оценки возможных причин недоступности части внутриклеточной воды для сахаров были поставлены опыты на мышцах, убитых 18%-ным этиловым спиртом, измельченных мышцах, приготовленных разрезанием мышц на кусочки шириной 1 мм, а также на глицеринизированных моделях. Результаты опытов показали, что для инулина и фруктозы количество недоступной воды было равно: на глицеринизированных моделях — 40 и 16%, соответственно, на измельченных мышцах — 33 и 14,5%. На убитых спиртом мышцах для инулина недоступными были 28% тканевой воды, а для фруктозы практически вся вода оказалась доступной. Таким образом, степень доступности воды зависит от молекулярного радиуса вещества. Полученный материал, а также данные Лоу и Фелпса (Law and Phelps, 1966) о характере распределения ряда веществ между телом гиалуроновой кислоты и буфером позволяют придти к заключению, что причиной недоступности части внутриклеточной воды для растворения в ней сахаров может быть как стерическое ограничение диффузии, так и структурированность части внутриклеточной воды, практически не являющейся растворителем для сахаров.

Таким образом, все изученные нами сахара могут быть разделены на две группы. Первая группа: *l*-арабиноза, *d*-ксилоза и *d*-галактоза. Содержание этих сахаров в мышцах увеличивается при удлинении срока инкубации и в присутствии инсулина. Для этих сахаров практически может быть доступно 90% воды волокон. Ко второй группе сахаров могут быть отнесены: *d*-арабиноза, фруктоза, сахароза и раффиноза. Пространство, занимаемое ими в мышцах, не превышает 30% от сырого веса, однако оно всегда больше межклеточного пространства. Это позволяет предположить, что сахара этой группы распределены не только в межклеточном пространстве, но проникают в какой-то ограниченный объем волокна, в то время как основная масса внутриклеточной воды остается недоступной для их растворения.

Обнаруженные различия в характере распределения сахаров также проявляются под влиянием ингибиторов обмена, электрического раздражения и флоридина. Как показано в наших опытах, а также в работах Нарахары с сотр. (Narahara et al., 1960, Narahara and Özand, 1963), Васянина и Се-

ребрякова (1968), Дорошенко (1968) поступление в мышцы *d*-глюкозы, 3—0-метилглюкозы, *d*-галактозы, *l*-арабинозы, *d*-ксилозы и *d*-рибозы значительно увеличивается при действии инсулина, ингибиторов обмена и электрического раздражения. С другой стороны, ингибитор транспорта — флоридин практически полностью подавляет поступление в мышцы перечисленных выше сахаров. В то же время, пространство, доступное для сахарозы, фруктозы и *d*-арабинозы, не увеличивается в присутствии стимуляторов транспорта (инсулина, ингибиторов обмена и электрического раздражения) и не уменьшается при действии флоридина.

Таким образом, стереоспецифичность транспорта, обнаруженная в большинстве работ на теплокровных животных, проявляется также и на мышцах лягушки, и особенно отчетливо на примере *l*- и *d*-арабинозы. Различие проницаемости мышечных волокон для стереоизомеров арабинозы и близких по своему строению сахаров (галактозы и фруктозы) может быть понято на основе широко распространенной гипотезы о транспорте сахаров в клетки посредством переносчиков, сродство к которым зависит от конфигурации молекулы сахара. Такие сахара как *d*-глюкоза, 3—0-метилглюкоза, *d*-галактоза, *l*-арабиноза, *d*-ксилоза и *d*-рибоза транспортируются в мышечные волокна при помощи переносчиков, локализованных в мембране. Эти сахара могут быть названы проникающими сахарами, в отличие от сахарозы, *d*-фруктозы, *d*-арабинозы и раффинозы, которые практически не транспортируются в мышечные волокна, и, следовательно, являются непроникающими сахарами. Стимуляторы и ингибиторы, влияющие на поступление сахаров в клетки, воздействуют, очевидно, на транспортную систему. Поэтому присутствие их в среде вызывает изменение характера распределения только проникающих сахаров, не оказывая влияния на характер распределения непроникающих сахаров. В норме, без стимуляции транспорта, поступление проникающих сахаров в мышечные волокна идет очень медленно, так что за 2 часа инкубации пространство, занимаемое ими в мышцах, практически не отличается от пространства, доступного для непроникающих сахаров.

### Исследование кинетики выхода из мышц сахаров

Для исследования свойств пространства, занимаемого в мышцах непроникающими сахарами, была изучена кинетика выхода сахаров из мышц. Как уже отмечалось, анализ выхода веществ из мышц часто применяется для характеристики локализации вещества в мышце. Нами был проведен анализ кривых выхода из мышц сахарозы, фруктозы и *l*-арабинозы.

Кривая выхода сахарозы может быть разложена на три экспоненты, соответствующие трем фракциям сахарозы. Сравнивая полученные данные с результатами анализа кривой выхода инулина, можно быструю фракцию сахарозы рассматривать как поверхностную. Величина этой фракции равна 5—8% от сырого веса мышц. Средняя фракция сахарозы может быть сравнима с медленной фракцией инулина, т. е. представляет собой фракцию сахарозы, локализованную в межклеточном пространстве, величина которого, определенная по средней фракции сахарозы, равна 15—16%. Константа скорости выхода ( $k$ ) этой фракции сахарозы равна  $14 \cdot 10^{-4}$ — $17 \cdot 10^{-4}$  сек<sup>-1</sup>. Кроме того, имеется медленная фракция сахарозы. Пространство, занимаемое ею, не доступно для инулина. Величина его равна 2—4%, и  $k = 1,6 \cdot 10^{-4}$ — $1,9 \cdot 10^{-4}$  сек<sup>-1</sup>. Скорость диффузии сахарозы из этого пространства в 6—10 раз медленнее, чем из межклеточного пространства. Можно предположить, что эта фракция представляет собой сахарозу, выходящую из какого-то внутриклеточного объема.

При анализе кривых выхода фруктозы из мышц оказалось, что наклоны прямолинейных участков кривых выхода неодинаковы в разных сериях опытов. В ряде опытов кривая выхода фруктозы состоит из трех экспонент, соответствующих трем фракциям фруктозы, аналогичным таковым сахарозы. Медленная фракция с  $k$ , равной  $4,8 \cdot 10^{-4}$  сек<sup>-1</sup>, соответствует пространству, равному 4—8%, и может рассматриваться как внутриволоконная фракция. Средняя фракция с  $k$ , равной  $19 \cdot 10^{-4}$ — $23 \cdot 10^{-4}$  сек<sup>-1</sup>, занимающая пространство, равное 16—18%, соответствует межклеточной фракции. На долю поверхностной фракции приходится 5%.

В ряде серий опытов медленная фракция фруктозы не была обнаружена. Это могло быть следствием того, что величина ее становилась меньше 2% и не могла быть определена из-за влияния фона. Отсутствие в ряде серий медленной фракции фруктозы может свидетельствовать о вариабельности величины пространства, доступного для сахарозы и фруктозы внутри волокна.

Определение коэффициента диффузии для межклеточных и внутриволоконных фракций сахарозы и фруктозы показало, что для межклеточных фракций сахарозы и фруктозы, так же, как и для инулина, величина коэффициента диффузии в 4—6 раз меньше его величины в воде. Для внутриволоконных фракций диффузия из мышц оказалась в 50 и 20 раз медленнее, чем в воде. Это может быть результатом того, что, проникая в мышечные волокна, сахара встречают на своем пути дополнительное диффузионное препятствие.

Для выяснения локализации в мышцах медленных фракций сахарозы и фруктозы представлялось интересным провести анализ кривой выхода из мышц *l*-арабинозы, сахара, который, как уже отмечалось, относится к группе проникающих сахаров. В этой серии опытов пространство, занимаемое *l*-арабинозой в мышцах, было равно 35,0%. Фруктозное пространство, определенное на тех же мышцах, равнялось 17,0%. Анализ кривой выхода *l*-арабинозы показывает, что превышение пространства, доступного для *l*-арабинозы, над фруктозным совпадает с величиной медленной фракции *l*-арабинозы, равной 18% от сырого веса мышц. Константа *k* этой фракции равна  $0,45 \cdot 10^{-4}$  сек<sup>-1</sup>, т. е. скорость выхода *l*-арабинозы в 4—10 раз медленнее, чем скорость выхода медленных фракций сахарозы и фруктозы.

Поэтому, хотя медленные фракции сахарозы и фруктозы названы внутриволоконными фракциями, они отличаются от внутриклеточной фракции *l*-арабинозы, так как последняя локализована в пространстве, недоступном для фруктозы. Как было показано выше, *l*-арабиноза может распределяться практически в 90% внутриклеточной воды, в то время как для сахарозы и фруктозы доступен лишь ограниченный объем волокна (2—8% от сырого веса мышц).

Можно предположить, что таким объемом является *T*-система и саркоплазматический ретикулум волокна, которые, согласно электронномикроскопическим исследованиям, представляют собой структуру, ограниченную мембранами от основной массы протоплазмы. Величина этого объема может достигать 13% от объема мышцы (Peachey, 1965). Поскольку в ряде работ показано, что в *T*-систему мышечных волокон могут проникать такие крупномолекулярные вещества, как альбумин, лизамин, родамин В200 и ферритин (Endo, 1964, 1966, Hill, 1964, 1965, Huxley, 1964, 1965, Кроленко, 1968), она должна быть доступна и для инулина. Поэтому объемом, доступным внутри волокна для непроникающих сахаров, но недоступным для инулина, может быть лишь саркоплазматический ретикулум волокна.

Доступность *T*-системы для инулина не вносит существенной погрешности в определение величины межклеточного пространства, так как объем *T*-системы равен 0,2—1,0% от объема волокна (1965).

### Изменение фруктозного пространства портняжных мышц лягушки в условиях гипо- и гипертонии

Для проверки высказанного предположения о локализации непроникающих сахаров в элементах саркоплазматического ретикулама представлялось интересным исследовать

изменение фруктозного пространства, и особенно той его части, которая недоступна для инулина и названа внутриволоконной, в условиях, когда, согласно морфологическим данным, наблюдается изменение объема  $T$ -системы и саркоплазматического ретикулума. Разность между фруктозным и инулиновым пространством служила характеристикой пространства, доступного для фруктозы внутри волокна.

По данным электронномикроскопических исследований (Girardier et al., 1963, Адамян и Кроленко, 1966) набухание мышц в гипотонических растворах сопровождается увеличением объема элементов саркоплазматического ретикулума, в частности увеличением объема терминальных цистерн триад, в то время как  $T$ -система остается без изменения. Согласно нашим данным, фруктозное и инулиновое пространство в этих условиях уменьшаются, и разность между ними, в норме равная  $3,0 \pm 1,0\%$ , практически исчезает ( $0,0 \pm 0,7\%$ ). Инкубация мышц в гипертоническом растворе (увеличение концентрации  $\text{NaCl}$  в растворе Рингера вдвое) сопровождается значительным увеличением  $T$ -системы, в то время как элементы саркоплазматического ретикулума остаются без изменения (Freysgang et al., 1964, 1965, Endo, 1966, Адамян и Кроленко, 1966). Фруктозное и инулиновое пространство при этом увеличивается, и разность между ними, в норме равная  $1,0 \pm 0,4\%$  увеличивается до  $6,0 \pm 1,0\%$ . Изменения, вызванные инкубацией мышц в гипо- и гипертонических растворах, обратимы.

Особый интерес представляет изменение фруктозного и инулинового пространства в процессе вакуолизации мышц. Мышцы, помещенные в раствор Рингера с 220 мМ глицерина, отбухают. Фруктозное и инулиновое пространство таких мышц уменьшается, так что разность между ними падает от  $4,0 \pm 0,8$  до  $2,0 \pm 0,9\%$ . Последующая инкубация таких мышц в нормальном растворе Рингера приводит к набуханию мышц и вакуолизации волокон (Кроленко, 1968). Фруктозное и инулиновое пространство увеличиваются, и разность между ними возрастает до  $7,0 \pm 1,2\%$ . Такое увеличение фруктозного и инулинового пространства не связано с повреждением волокон, так как, во-первых, величина фруктозного пространства не меняется в течение 4 часов инкубации мышц в растворе Рингера, а во-вторых, при повторной инкубации в растворе Рингера с глицерином мышцы вновь отбухают, и фруктозное и инулиновое пространство уменьшается.

Анализ кривой выхода фруктозы из вакуолизированных мышц показывает, что увеличение разности между фруктозным и инулиновым пространством соответствует увеличению медленной фракции фруктозы, т. е. той фракции фруктозы,

которая, согласно нашим предположениям, может быть локализована в саркоплазматическом ретикулуме волокна.

Как видно из сравнения наших данных с данными электронно-микроскопических исследований мышечного волокна увеличение фруктозного пространства внутри волокна совпадает с увеличением  $T$ -системы, а не элементов саркоплазматического ретикулума. Поэтому можно предположить, что увеличение фруктозного пространства связано не с увеличением объема саркоплазматического ретикулума, а с увеличением степени доступности этого объема для молекул фруктозы. Действительно, если объем саркоплазматического ретикулума равен 4—8% от объема мышцы (Page, 1964, Peachey, 1965) и в условиях гипертонии и вакуолизации становится доступным для фруктозы, то этого объема вполне достаточно, чтобы объяснить увеличение фруктозного пространства, локализованного в мышечном волокне. Степень доступности элементов саркоплазматического ретикулума для фруктозы, очевидно, определяется характером проницаемости мембран на границе  $T$ -система — терминальные цистерны. Возможно, что их проницаемость возрастает при увеличении объема  $T$ -системы.

Вероятно, в норме в мышечном волокне часть мембран на границе  $T$ -система — терминальные цистерны проницаема для молекул сахаров, в то время как другая часть является непроницаемой для этих молекул. Тогда величина пространства, доступного для непроницающих сахаров внутри волокна будет определяться количественным соотношением проницаемых и непроницаемых мембран.

На основании высказанного предположения о доступности элементов саркоплазматического ретикулума для молекул сахаров, может быть дано объяснение тому факту, что величина межклеточного пространства, определенная по распределению различных веществ, оказывается неодинаковой. Величина межклеточного пространства, определенная по распределению сахарозы или шестиатомных спиртов — маннита и сорбита — будет больше величины межклеточного пространства, определенной по распределению инулина или альбумина, благодаря тому, что сахара, маннит и сорбит, могут распределяться в элементах саркоплазматического ретикулума волокна. Поэтому пространство, определенное по распределению низкомолекулярных веществ будет больше истинного межклеточного пространства.

Вопрос о том, что является наиболее адекватным для характеристики внеклеточного объема: истинное межклеточное пространство или объем, доступный для непроницающих сахаров, очевидно, должен решаться в зависимости от задачи исследования. Например, при изучении механизма транспор-



та сахаров в мышечные волокна, когда необходимо точное знание внутриклеточной концентрации проникающего сахара, необходимым условием является определение пространства, доступного для непроникающих сахаров.

## ВЫВОДЫ

1. В работе изучалось распределение инулина, раффинозы, сахарозы, *d*-галактозы, *d*-фруктозы, *l*- и *d*-арабинозы и *d*-ксилозы между портняжными мышцами лягушки и средой.

2. Исследование зависимости величины инулинового пространства мышц от времени инкубации, от наружной концентрации инулина, а также анализ кривой выхода из мышц инулина показали, что инулиновое пространство является адекватным для характеристики межклеточного пространства. Величина инулинового пространства колеблется в пределах от 9 до 28% от сырого веса мышцы, при среднем значении, равном  $19,0 \pm 0,2\%$ .

3. Обнаружена положительная корреляция величины межклеточного пространства и содержания воды в мышцах, которая может рассматриваться как результат неодинакового обсушивания мышц, и не связана с различным содержанием воды в мышечных волокнах. Отсутствует корреляция величины межклеточного пространства и веса мышц. Величина межклеточного пространства увеличивается при инкубации мышц в гипертоническом растворе и в вакуолизированных мышцах и уменьшается при инкубации мышц в гипотоническом растворе.

Полученные экспериментальные данные позволили сделать вывод, что величина межклеточного пространства не является постоянной, и что необходимо измерение величины межклеточного пространства в каждом отдельном случае.

4. В результате изучения поступления сахаров в портняжные мышцы лягушки были обнаружены существенные различия в характере распределения исследованных сахаров между мышцами и средой. При длительной инкубации мышц и в условиях стимуляции транспорта инсулином поступление в мышцы *d*-галактозы, *l*-арабинозы и *d*-ксилозы увеличивается, и практически 90% внутриклеточной воды может быть доступно для распределения этих сахаров. Эта группа сахаров названа проникающими сахарами. На основании литературных данных сюда могут быть отнесены *d*-глюкоза, 3—0-метилглюкоза и *d*-рибоза.

5. Сахароза, раффиноза, *d*-фруктоза и *d*-арабиноза распределяются в мышце в пространстве, незначительно превышающем межклеточное пространство. Величина этого пространства не увеличивается при удлинении срока инкубации

мышц. Инсулин не влияет на характер распределения сахарозы, фруктозы и *d*-арабинозы. Эта группа сахаров названа непроникающими сахарами.

6. Деление сахаров на проникающие и непроникающие, а также стереоспецифичность влияния стимуляторов транспорта могут быть поняты на основе гипотезы о транспорте сахаров в клетки при помощи переносчиков, сродство к которым определяется строением молекулы сахара.

7. Тот факт, что пространство, занимаемое в мышцах непроникающими сахарами, больше межклеточного, а также результаты анализа кривых выхода сахарозы, фруктозы и *l*-арабинозы позволили высказать предположение о том, что непроникающие сахара могут быть локализованы в некотором ограниченном объеме волокна, внешнем по отношению к основной массе внутриклеточной воды. Величина этого объема колеблется от 2 до 8% от объема мышцы.

8. Величина пространства, доступного для непроникающих сахаров в мышечном волокне, увеличивается при инкубации мышц в условиях гипертонии и в вакуолизированных мышцах и уменьшается при инкубации мышц в гипотоническом растворе Рингера.

9. Сопоставление полученного экспериментального материала с литературными данными электронномикроскопического строения мышечных волокон дает возможность прийти к заключению, что элементы саркоплазматического ретикулума волокна являются тем объемом, в котором могут быть локализованы непроникающие сахара.

*По материалам диссертации опубликованы следующие работы:*

1. Влияние инсулина на распределение *l*- и *d*-арабинозы между портняжными мышцами лягушки и средой. Материалы науч. конф. молодых спец. Ин-та цитологии АН СССР, 9, 1966.

2. О доступности воды мышечных волокон для веществ с различным размером молекул. Цитология, 9, 1: 53—60, 1967 (совместно с С. И. Васяниным, С. А. Кроленко и Н. Н. Никольским).

3. Распределение сахаров между портняжными мышцами лягушки и средой. Цитология, 9, 6: 659—665, 1967 (совместно с Н. Н. Никольским и А. С. Трошиным).

4. Распределение инулина, сахарозы и фруктозы в портняжных мышцах лягушки. Цитология, 9, 7: 781—790, 1967.

5. Характеристика внеклеточного пространства портняжных мышц лягушки. Материалы науч. конф. Ин-та цитологии АН СССР, посвящ. 50-летию Великой Октябрьской социалистической революции, 28, 1967.

6. Межклеточное пространство портняжных мышц лягушки. Цитология, 10, 7: 822—830, 1968 (совместно с Н. Н. Никольским и А. С. Трошиным).

7. Распределение непроникающих сахаров в портняжных мышцах лягушки в условиях гипо- и гипертонии. Цитология, 10, 7: 831—838, 1968.

8. Регуляция транспорта сахаров в мышечных волокнах. Биофизика, 13, 2: 365—368, 1968. Совместно с Н. В. Дорошенко, Н. Н. Никольским и А. С. Трошным).

Материалы диссертации доложены на Научной конференции Института цитологии АН СССР в 1967 г. и на Симпозиуме по структуре и функции мембран в Пущино-на-Оке в 1967 году.

Подп. к печ. 9/XII-68 г.

М-40417 Зак. 2423

Тир. 200

Объем 1 п. л.

Бумага 60×90<sup>1</sup>/<sub>16</sub>

Бесплатно

Типография № 6 Управления печати Ленгорисполкома  
Ленинград. К-18, Институтский пер., 5,