Доклады Академии наук СССР
1972. Том 203, № 6

УДК 612.015.32+576.314

ФИЗИОЛОГИЯ

Н. В. КУДРЯВЦЕВА, Н. Н. НИКОЛЬСКИЙ, В. И. СКОПИЧЕВА,
член-корреспондент АН СССР А. С. ТРОШИН

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ КАЛИЯ НА ТРАНСПОРТ И УТИЛИЗАЦИЮ ГЛЮКОЗЫ В СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦАХ ЛЯГУШКИ

Выяснение механизма регуляции потребления глюкозы составляет одну из актуальных задач при исследовании углеводного обмена в мышечной ткани. В настоящее время еще недостаточно изучена взаимосвязь между транспортом сахаров и изменением углеводного обмена при мышечной деятельности. С одной стороны, работами многих авторов убедительно показано ускорение транспорта неметаболизируемых сахаров при мышечном сокращении, вызываемом как электрическим раздражением, так и калиевой деполяризацией ([1–4]). С другой стороны, данные по потреблению глюкозы при калиевой деполяризации противоречивы. Так, на изолированной диафрагме крысы при замене ионов Na в среде на K^+ было получено уменьшение потребления глюкозы ([5]), тогда как перфузия мышц кошки раствором с увеличенной концентрацией K^+ приводила к значительному росту потребления глюкозы ([6]).

В настоящей работе исследовалось влияние повышенной концентрации ионов калия на транспорт и утилизацию глюкозы в скелетных мышцах лягушки.

Опыты проводились на изолированных портняжных мышцах лягушки, выдержанных после изоляции 16—20 час. в растворе Рингера при 2—4°. Исследовалось действие подпороговой концентрации KCl (20 ммол/л) и сверхпороговой (75 ммол/л), вызывающей контрактуру. Действию 75 м*M* KCl мышцы подвергались дважды в течение пяти минут с 15-минутным интервалом. В опытах с 20 м*M* KCl повышенная концентрация K^+ сохранялась в течение всего опыта. После окончания контрактуры мышцы инкубировались в растворе Рингера в течение 30 мин. Для исследования потребления глюкозы мышцы инкубировались при 24° в течение 1—4 час. в 0,3—0,5 мл раствора Рингера с глюкозой (100 мг-%), приготовленного на трис-HCl-буфере с pH 7,2. После окончания опыта мышцы быстро взвешивались, замораживались в жидком азоте и растирались. Белки осаждались $Ba(OH)_2$ и $ZnSO_4$. Содержание глюкозы определяли в инкубационной среде и мышечном экстракте с помощью гликозооксидазы по методу Мальштадта в модификации Гулого с соавторами ([7]). В ряде опытов измеряли содержание в мышцах глюкозо-6-фосфата при инкубации их в тех же условиях, но в растворе Рингера без глюкозы. Глюкозо-6-фосфат определяли энзиматическим методом по восстановлению НАДФ в присутствии глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы ([8]). Концентрацию глюкозо-6-фосфата рассчитывали в микромолях на 1 мл внутриклеточной воды, количество которой принималось равным 0,6 мл/г сырого веса ([9]). Концентрацию глюкозы выражали в микрограммах на 100 мг сырого веса ткани. Величину утилизации глюкозы рассчитывали по разности потребления (убыль глюкозы из среды) и концентрации глюкозы в мышцах.

Результаты опытов обрабатывались статистически.

Изменение во времени потребления и концентрации глюкозы в мышцах в норме и после двойной калиевой контрактуры изображено графически на рис. 1. Соотношение потребления глюкозы между опытными и контрольными мышцами существенно зависит от времени измерения. При 1-часовой

инкубации мышц в растворе глюкозы поступление ее в опытные мышцы выше, чем в контрольные, а при 3—4-часовой инкубации потребление глюкозы мышцами, подвергнутыми действию KCl, оказывается значительно ниже, чем в норме. Концентрация глюкозы в опытных мышцах в течение первого часа инкубации быстро растет и значительно превышает уровень контроля. Утилизация глюкозы (рис. 2) в норме линейно увеличивается во времени, т. е. идет с постоянной скоростью. В мышцах, перенесших контрактуру, утилизация глюкозы подавлена и, как показано на рис. 2, глюкоза может поступать в мышцы как неметаболизируемый сахар. Следует подчеркнуть, что в ряде опытов в первые часы после калиевой контрактуры

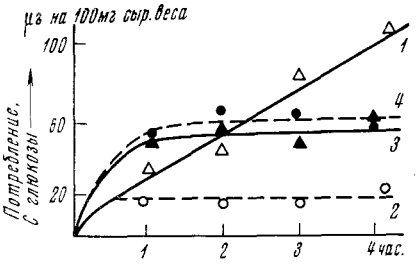

Рис. 1. Влияние калиевой контрактуры на потребление и концентрацию глюкозы в портняжных мышцах лягушки. Потребление (*1*) и концентрация (*2*) глюкозы мышцами в контроле; потребление (*3*) и концентрация (*4*) глюкозы после калиевой контрактуры мышцами. Каждая точка — среднее из 4—5 опытов

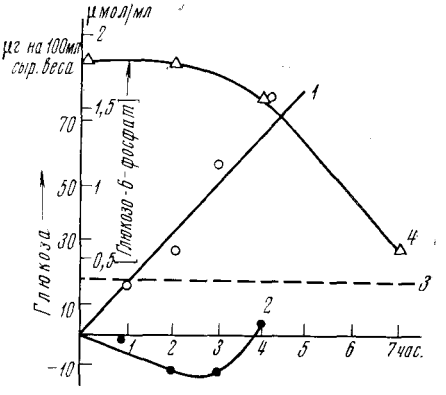

Рис. 2. Влияние калиевой контрактуры на утилизацию глюкозы и концентрацию глюкозо-6-фосфата. Утилизация глюкозы в контроле (*1*), после калиевой контрактуры (*2*), уровень глюкозо-6-фосфата в контроле (*3*), концентрация глюкозо-6-фосфата после калиевой контрактуры (*4*). Каждая точка — среднее из 4—5 опытов

наблюдается отрицательная величина утилизации, т. е. происходит эндогенное образование глюкозы. Этот факт подтверждается и прямыми опытами по измерению содержания свободной глюкозы в мышцах, непосредственно после контрактуры без инкубации в растворе глюкозы. Содержание свободной глюкозы в опытных мышцах составляло 6 μг на 100 мг сырого веса при 0,9 μг в контроле. Аналогичное явление образования глюкозы в условиях интенсивного гликогенолиза описано при действии на портняжные мышцы лягушки адреналина ([10]). Таким образом, снижение потребления глюкозы мышцами, перенесшими калиевую контрактуру, объясняется торможением утилизации глюкозы, а более быстрое поступление ее в мышцы в первый час инкубации обусловлено ускорением транспорта.

Для выяснения причины, вызывающей торможение утилизации глюкозы, было измерено содержание глюкозо-6-фосфата в норме и после калиевой контрактуры в мышцах, инкубированных в растворе Рингера без глюкозы. Оказалось, что концентрация глюкозо-6-фосфата резко возрастает в результате контрактуры и мало изменяется в течение последующих 4 час. инкубации при 20° (рис. 2). Поэтому можно предположить, что причина резкого снижения утилизации глюкозы вследствие калиевой контрактуры заключается в торможении гексокиназной реакции за счет увеличения концентрации глюкозо-6-фосфата.

Поскольку ранее было показано, что стимуляция транспорта сахаров после мышечного сокращения сохраняется длительное время ([4, 11]), были проведены опыты с инкубацией мышц в течение 18 час. после окончания калиевой контрактуры в растворе Рингера при 7°. Через 18 час. уровень

глюкозо-6-фосфата в мышцах, подвергнутых контрактуре, возвращается к норме, а потребление и утилизация глюкозы возрастают. В данном случае увеличение потребления и утилизации глюкозы обусловлено ускорением транспорта глюкозы.

		Контроль	Опыт
Величина потребления глюкозы (μг на 100 мг сыр. веса)		58±6	114±6
Концентрация глюкозы в мышцах	То же	15±2	17±1
Количество утилизированной глюкозы	» »	43±5	97±5
Концентрация глюкозо-6-фосфата	(μ мол/мл)	0,36±0,06	0,20±0,01

Известно, что уровень торможения гексокиназной реакции глюкозо-6-фосфатом зависит от концентрации неорганического фосфата. В выше приведенных опытах инкубация мышц проводилась в бикарбонатном растворе Рингера, поэтому были поставлены проверочные опыты по влиянию фосфата. Было установлено, что присутствие в среде 3 м*M* фосфата не снимает торможения утилизации глюкозы мышцами, перенесшими контрактуру.

Таким образом можно прийти к заключению, что если при мышечном сокращении происходит интенсивный распад гликогена и образуется избыточное количество глюкозо-6-фосфата, то несмотря на активацию транспортной системы, потребление экзогенной глюкозы может снижаться за счет торможения ее утилизации. По мере расходования эндогенного глюкозо-6-фосфата потребление и утилизация глюкозы увеличиваются и становятся выше нормы вследствие того, что транспорт глюкозы продолжает оставаться в активированном состоянии.

Двойная калиевая контрактура безусловно является очень сильным воздействием. Поэтому была поставлена серия опытов с влиянием на потребление глюкозы подпороговой концентрации KCl 20 ммол/л, которая также вызывает ускорение транспорта сахаров ([4]).

		Контроль	Опыт
Величина потребления глюкозы (μг на 100 мг сыр. веса)		50±1	68±6
Концентрация глюкозы в мышцах	То же	15±3	22±4
Количество утилизированной глюкозы	» »	35±3	46±2
Концентрация глюкозо-6-фосфата	(μ мол/мл)	0,40±0,02	1,10±0,1

Из результатов опытов следует, что под влиянием 20 м*M* KCl происходит увеличение и потребления, и утилизации глюкозы, что обусловлено ускорением транспорта. Наблюдаемое возрастание концентрации глюкозо-6-фосфата значительно ниже, чем при контрактуре, и, вероятно, недостаточно, чтобы вызвать торможение утилизации глюкозы.

Согласно современным представлениям, влияние ионов K^+ на углеводный обмен мышечной ткани опосредуется через деполяризацию, вызывающую, в свою очередь, увеличение концентрации ионизированного Ca^{2+} в миоплазме. Ионы Ca^{2+} активируют фосфорилазу-*b*-киназу и таким путем запускается процесс гликогенолиза ([12]). Увеличение концентрации Ca^{2+} является, вероятно, и непосредственной причиной, вызывающей процесс стимуляции транспорта сахаров, который в отличие от гликогенолиза развивается во времени значительно медленнее. Если происходит сильное и сравнительно длительное возрастание уровня ионизированного Ca^{2+}, как это имеет место при действии высоких концентраций KCl ([13]), то развивается контрактура (обратимая) и наблюдается значительный распад гликогена. В этом случае образуется избыточное количество глюкозо-6-фосфата, и ускорение транспорта глюкозы практически реализуется в виде увеличения ее утилизации только через длительный период после окончания контрактуры. При действии 20 м*M* KCl содержание глюкозо-6-фосфата возрастает умеренно и ускорение транспорта обеспечивает увеличение утилизации экзогенной глюкозы.

Можно думать, что при мышечной работе в зависимости от ее интенсивности должны наблюдаться такие же изменения в потреблении глюкозы, как и при действии KCl. Во всяком случае в опытах на мышцах ноги собаки было показано, что при сильном тетанусе в первые минуты происходит резкое увеличение концентрации глюкозо-6-фосфата, снижение потребления глюкозы и выход в кровь эндогенной глюкозы и только в последующий период, характеризующийся некоторым снижением концентрации глюкозо-6-фосфата, потребление глюкозы начинает возрастать и превышает уровень покоя.

Институт цитологии
Академии наук СССР
Ленинград

Поступило
6 XII 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] J. O. Holloszy, H. T. Narahara, J. Biol. Chem., **240**, 9, 3493 (1965). [2] J. O. Holloszy, H. T. Narahara, J. Gen. Physiol., **50**, 3, 551 (1967). [3] С. И. Васянин, В. Ш. Серебряков, Биофизика, **13**, 2, 368 (1968). [4] Н. Н. Никольский, В. И. Скопичева, Э. А. Чухлова, Цитология, **13**, 7, 879 (1971). [5] T. Clausen, Biochim. et biophys. acta, **150**, 56 (1968). [6] C. Crone, Acta physiol. scand., 68, 105 (1966). [7] М. Ф. Гулый, В. И. Билай и др., Фермент глюкозооксидаза и его применение, Киев, 1964. [8] W. Lamprecht, I. Trautschold, Methods of Enzymatic Analysis, N. Y.— London, 1963, p. 543. [9] Н. А. Виноградова, Н. Н. Никольский, А. С. Трошин, Цитология, **9**, 6, 658 (1968). [10] J. Saha, R. Lopez-Mondragon, H. T. Narahara, J. Biol. Chem., **243**, 3, 521 (1968). [11] В. Ш. Серебряков, Цитология, **13**, 12, 1468 (1971). [12] E. H. Fischer, A. Pocker, J. C. Saari, Essays in Biochemistry, **6**, 23 (1970). [13] E. B. Ridgway, C. C. Ashley, G. Hoyle, Federat. Proc., **27**, 2, 375 (1968). [14] A. Corsi, M. Midrio, A. L. Granata, Am. J. Physiol., **216**, 6, 1534 (1969).