

УДК 612.8.015:616.001.31

РЕГУЛЯЦИЯ ОБМЕНА ГЛИКОГЕНА МОЗГА ПРИ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЕ

ПРОМЫСЛОВ М. Ш., СМИРНОВ А. В., АКОПЯН А. С.

Показано накопление гликогена в мозгу при черепно-мозговой травме и заметное снижение активности γ -амилазы мозга.

При стимуляции нервной деятельности травмированных животных восстанавливается активность γ -амилазы мозга до исходного уровня, в то время как при торможении ЦНС у подопытных животных активность этого фермента полностью подавляется, что приводит к еще более значительному увеличению содержания гликогена в ткани мозга.

Нарушение биохимических процессов часто может явиться первичным в развитии различных патологических состояний.

Направленная регуляция обменных процессов в мозгу в условиях патологии, а также установление молекулярного субстрата поражения должны явиться основой рациональной терапии.

Использование стимуляторов или ингибиторов ферментных систем мозга для воздействия на определенное звено обмена в условиях патологии ЦНС не всегда приемлемо из-за наличия ГЭБ. В этих условиях существенным фактором, влияющим на метаболизм мозга, может стать регуляция функционального состояния ЦНС.

Известно, что мозг позвоночных животных использует углеводы, главным образом глюкозу [1, 2], поступающую из крови, а также образующуюся из имеющегося гликогена. Содержание гликогена в мозгу колеблется в широких пределах, от 20 до 120 мг% [3, 4], причем в условиях нормы он не накапливается в мозговой ткани, по-видимому, вследствие интенсивного обмена [5]. При различных патологических состояниях (облучение, длительная анестезия, выздоровление после различных гипоксий) у млекопитающих отмечается увеличение количества гликогена мозга [6—8]. Потребность мозга в глюкозе при черепно-мозговой травме резко возрастает в связи с тем, что значительная ее часть используется по пути анаэробного гликолиза. Это обусловлено нарушениями в цепи окислительного фосфорилирования [9] и повреждением ультраструктуры митохондрий [10]. Это положение ставит вопрос о роли гликогена мозга в общем процессе обмена глюкозы.

Нам представлялось важным выяснить, как изменяется содержа-

ние гликогена в клетках мозга под влиянием черепно-мозговой травмы. Содержание гликогена исследовали электронномикроскопическим методом, что позволило вместе с определением количества его частиц получить данные о характере их распределения в различных участках мозга и отдельных клетках. Была исследована также активность ферментов его распада (γ -амилазы и фосфорилазы) и влияние изменения функционального состояния ЦНС травмированных животных на обмен гликогена в мозгу.

Материалы и методы

Опыты проводили на кроликах-самцах породы шиншилла массой 2,2—2,8 кг. Закрытую дозированную черепно-мозговую травму наносили ударом свободно падающего груза массой 500 г с высоты 2,2 м на голову фиксированного в станке животного. Животных забивали воздушной эмболией. Мозг быстро извлекали, взвешивали и гомогенизировали с 3-мя объемами 0,1 N ацетатного буфера (рН 4,55), содержащего 0,001 M ЭДТА.

Гомогенат прогревали при 55° в течение 30 мин. Образовавшийся осадок удаляли центрифугированием. Надосадочную жидкость, представляющую собой ферментный препарат γ -амилазы, не содержащей примеси α -амилазы, инкубировали с гликогеном. Об активности γ -амилазы судили по количеству образовавшейся глюкозы. В качестве субстрата γ -амилазы использовали гликоген печени кролика. Удельную активность γ -амилазы выражали в ммоль глюкозы/мг белка/мин.

Активность фосфорилазы в головном мозгу определяли по методу Herg [11], измеряя количество P_i по методу Fiske и Subarow [12]. Активность фосфорилазы, определяемую в присутствии АМР, обозначали как общую фосфорилазу, а отсутствие АМР—как фосфорилазу А. Удельную активность фосфорилазы выражали в ммоль P_i /мг белка/мин $\times 100$. Содержание белка в пробах определяли [по методу Lowry и соавт. [13].

Для электронномикроскопического выявления гликогена исследовали кусочки коры, белого вещества и ствола мозга экспериментальных животных при помощи трех методов. Два из них основывались на обработке срезов: первый—контрастирование 3% раствором йодной кислоты по Perry [14], второй—обработка срезов раствором висмута по Shinji и соавт. [15]. Кроме того, применяли инкубацию тканей в растворе кармина по Themann [16]. Применение комплекса методик увеличивало достоверность полученных данных. Отметим, что все они дали сходные результаты в каждом опыте. Ткань заливали в аралдит, ультратонкие срезы получали на ультратоме LKB и изучали в электронном микроскопе JEM-100 В. В качестве контроля служил мозг интактных животных.

Стимуляцию ЦНС вызывали введением животным фенамина (0,6 мг на 1 кг) или стрихнина (0,2 мг на 1 кг) подкожно в виде 0,1% ра-

створа азотнокислого стрихнина. Торможение ЦНС вызывали введением смеси уретана с вероналом из расчета 400 мг уретана и 30 мг веронала на 1 кг массы животного.

Результаты и обсуждение

Проведенные исследования показали, что удельная активность общей фосфорилазы мозга не меняется, а удельная активность фосфорилазы А незначительно снижается через 10 мин и 24 ч после нанесения черепно-мозговой травмы (табл. 1). Эти данные полностью подтвердили наблюдения других авторов [6, 7], установивших, что активность фосфорилаз практически не изменяется и, таким образом, не может влиять на интенсивность распада гликогена.

Таблица 1

Активность γ -амилазы (нмоль глюкозы/мг белка/мин) и фосфорилаз (мкмоль P_i /мг белка/мин $\times 100$) в мозгу травмированных животных

Условия опыта	γ -Амилаза	Фосфорилаза	
		Общая	А
Норма	4,41 \pm 0,51 (7)	10,1 \pm 0,5 (7)	6,1 \pm 0,5 (7)
Через 10 мин после травмы	5,76 \pm 0,36 (6)	9,1 \pm 0,5 (8)	4,3 \pm 0,4 (8)
Через 24 ч после травмы	<0,05 2,53 \pm 0,19 (5) <0,01	>0,1 9,3 \pm 1,6 (6) >0,1	<0,001 4,8 \pm 0,4 (6) <0,01

Примечание. В табл. 1—3 в скобках—число опытов

Активность кислой γ -амилазы мозга кроликов исследовали в динамике патологического процесса: через 10 мин, 1 ч, 1 сутки и 3-е суток после травмы.

Оказалось, что активность этого фермента менялась в различные сроки после нанесения черепно-мозговой травмы, а именно: через 10 мин глюкоамилазная активность фермента несколько повышалась, через 1 ч замечена тенденция к понижению ее активности, а через 24 ч после нанесения травмы активность фермента оказывалась наименьшей. На 3-и сутки активность γ -амилазы нормализовалась.

В дальнейшем у подопытных животных определение активности фермента проводили в период ее повышения и максимального снижения, то есть через 10 мин и 24 ч с момента нанесения травмы (табл. 1).

Как следует из данных таблицы, во всех опытах активность γ -амилазы через 1 сутки после нанесения травмы резко уменьшалась.

Сопоставление активностей γ -амилазы и фосфорилаз помогло нам выяснить значение каждого из этих факторов в расщеплении гликогена мозга и установить, что решающую роль играет γ -амилаза. О важной

роли γ -амилазы в обмене гликогена свидетельствуют и литературные данные. Так, отсутствие этого фермента в печени, сердечной и скелетных мышцах приводит к значительному повышению количества гликогена в этих органах [17].

Электронномикроскопическое исследование содержания гликогена через 24 ч после травмы выявило значительное увеличение его количества во всех изученных отделах мозга.

В нейронах коры (рис. 1) гранулы гликогена лежали в цитоплазме в виде осmioфильных частиц размером 50—70 нм или группировались в более крупные агрегаты 180—400 нм. Иногда гранулы гликогена обмярживали в матриксе или на мембранах митохондрий. В синапсах частицы гликогена располагались между синаптическими пузырьками как у синаптических мембран, так и по всей площади синаптической терминали.

Накопление гликогена в митохондриях и синапсах свидетельствует не только о нарушении углеводного обмена, но и оказывает негативное воздействие на функцию этих образований, усугубляя повреждение ультраструктуры синапсов и митохондрий вследствие воздействия черепно-мозговой травмы.



Рис. 1. Скопление частиц гликогена в цитоплазме нервной клетки коры: ГГ—гранулы гликогена, М—митохондрия, МТ—микротрубочки; $\times 42\ 000$



Рис. 2. Гранулы гликогена в цитоплазме периваскулярного отростка астроцита: АО—астроцитарный отросток, БМ—базальная мембрана, ПК—просвет капилляра; $\times 30\ 000$

Наибольшее увеличение количества гликогена найдено в глиальных отростках, окружающих нейроны, синапсы, и особенно в отростках, окружающих капилляры (рис. 2). Здесь интенсивное накопление гранул гликогена мы находили постоянно, даже в тех случаях, когда в других клетках мозга количество гликогена возрастало умеренно. Специфика такой локализации гликогена связывается с трофической функцией астроцитов, что находит подтверждение в биохимических исследованиях авторов, считающих, что астроглия включается в фосфорилирование глюкозы, перенося в нейроны глюкозо-6-фосфат. Если в результате патологического воздействия нейроны перестают его усваивать, в астроцитах накапливается гликоген [18].

В белом веществе мозга травмированных животных количество гликогена также увеличено. Особенности в его распределении по сравнению с корой мы не выявили, отметим только, что в цитоплазме немиелинизированных аксонов накопление гранул гликогена мы находили постоянно (рис. 3), а в аксоплазме миелинизированных отростков — очень редко.

Существенно увеличивалось количество гликогена в стволе мозга экспериментальных животных. Здесь повышенное содержание гликогена обнаруживали во всех компонентах мозговой ткани: в нейронах и их отростках, синапсах, глиальных клетках. Полагают, что это связано с большим значением гликогена для эволюционно более старых отделов мозга из-за большей их зависимости от анаэробного углеводного метаболизма при менее выраженном окислительном фосфорилировании [19].

Установив, что закрытая черепно-мозговая травма сопровождается значительным снижением активности γ -амилазы и повышением содержания гликогена в клетках мозга, мы стремились найти пути к устранению этих нарушений.

Показано, что стимуляция ЦНС травмированных животных нормализует нарушенный энергетический обмен мозга [9, 20, 21].

Важно было выяснить, можно ли регулировать активность γ -амилазы в этих условиях опыта путем изменения функционального состояния ЦНС.

Таблица 2

Активность γ -амилазы (нмоль глюкозы/мг белка/мин) и фосфорилаз (мкмоль P_i /мг белка/мин $\times 100$) мозга контрольных животных при различных функциональных состояниях ЦНС

Фермент	Норма	Возбуждение		Торможение (сон)
		фенамин	стрихнин	уретан + веронал
γ -Амилаза	$4,41 \pm 0,51$ (7)	$5,82 \pm 0,41$ (7)	$6,91 \pm 0,24$ (7)	$2,72 \pm 0,11$ (7)
Фосфорилаза Р общая	$10,1 \pm 0,5$ (7)	$10,1 \pm 0,2$ (7)	$11,8 \pm 1,2$ (7)	$11,5 \pm 0,6$ (7)
Фосфорилаза Р А (в отсутствие АМР) Р	$6,1 \pm 0,5$ (7)	$3,6 \pm 0,5$ (7)	$1,5 \pm 0,4$ (7)	$6,6 \pm 0,3$ (7)
		$< 0,05$	$< 0,001$	$< 0,01$
		$\geq 0,10$	$< 0,001$	$> 0,10$
		$< 0,01$		$< 0,1$

При введении фенамина и стрихнина контрольным животным удельная активность γ -амилазы повышается, а активность фосфорилазы А резко падает. Введение же смеси уретана с вероналом приводит к резкому снижению активности γ -амилазы, не оказывая влияния на активность фосфорилазы А. Воздействие этих фармакологических веществ практически не изменяло активности общей фосфорилазы (табл. 2).

Чтобы выяснить, является ли отмеченное выше действие фенаммина и уретана с вероналом на активность γ -амилазы результатом непосредственного воздействия препаратов на мозговую ткань или же указанный эффект является следствием изменения функционального состояния ЦНС под воздействием этих веществ, мы исследовали влияние названных фармакологических агентов на активность γ -амилазы в опытах *in vitro*. Оказалось, что добавление к гомогенату мозга фенаммина и уретана совместно с вероналом не оказывает никакого влияния на активность γ -амилазы, из чего можно сделать вывод, что изменение ее активности связано с функциональным состоянием ЦНС.

Особый интерес представлял вопрос: изменяется ли под воздействием тормозных и активирующих влияний на ЦНС активность γ -амилазы и фосфорилаз, а также содержание гликогена мозга у животных с черепно-мозговой травмой. С этой целью кроликам на 5-й мин после нанесения закрытой черепно-мозговой травмы вводили фенаммин или смесь уретана с вероналом, а активность ферментов γ -амилазы и фосфорилаз исследовали через 1 сутки после травмы.

Таблица 3

Активность γ -амилазы (нмоль глюкозы/мг белка/мин) и фосфорилаз (мкмоль Р /мг белка/мин \times 100) мозга травмированных животных при введении им фенаммина и смеси уретана с вероналом

Фермент	Норма	Через 24 ч после травмы	Травма, фенаммин	Травма, уретан + ве- ронал
γ -Амилаза	4,41 \pm 0,51 (7)	2,53 \pm 0,10 (5)	5,00 \pm 0,21 (7)	0,79 \pm 0,39 (7)
р		<0,01	>0,1	<0,01
Фосфорилаза общая	10,1 \pm 0,5 (7)	9,3 \pm 1,6 (6)	16,9 \pm 6,8 (7)	0,9 \pm 0,3 (7)
р		>0,10	<0,001	>0,10
Фосфорилаза А	6,1 \pm 0,5 (7)	4,0 \pm 0,4 (5)	9,4 \pm 0,3 (3)	6,7 \pm 0,3 (7)
р		<0,01	<0,001	>0,1

Как видно из табл. 3, стимуляция ЦНС у подопытных животных через сутки после травмы приводит к увеличению активности γ -амилазы до контрольных величин, в то время как у животных без стимуляции активность γ -амилазы в этот период оказывается наименьшей. При торможении ЦНС активность этого фермента значительно подавляется, в некоторых случаях полностью.

Снижение активности γ -амилазы должно было привести к увеличению количества гликогена в ткани мозга. Действительно, при электронномикроскопическом изучении через сутки после травмы выявлялось выраженное по сравнению с нормой скопление гранул гликогена в различных отделах мозга, причем преимущественно в глиальных клетках и их отростках, а не в нейронах (рис. 4). Интересно отметить, что такое же избирательное накопление гликогена в глиальных элементах ЦНС обнаруживали у обезьян, перенесших суточный сон, вызванный фенобарбиталом, что связывали с трофической функцией астроци-

тов при репаративных процессах. Показано, что репаративная активность глики в период покоя после различных воздействий на ЦНС выше, чем у нейронов [22].

Что касается фосфорилазы, то под влиянием стимуляции (табл. 3) активность общей фосфорилазы и фосфорилазы А возрастает в 1,5 раза по сравнению с нормой. Торможение не меняет активности общей фосфорилазы, а активность фосфорилазы А возвращается при этом к норме.

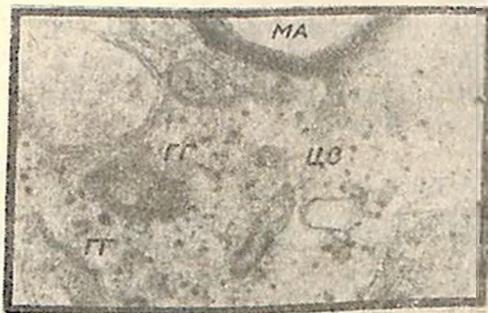


Рис. 3. Гликоген в цитоплазме олигодендроглиозита белого вещества мозга: ГГ—гранулы гликогена, МА—миелинизированный аксон, ЦО—цитоплазматический органоид олигодендроглиозита; $\times 36\ 000$



Рис. 4. Гранулы гликогена в астроците мозга животного после введения урестана с вероналом: ГГ—гранулы гликогена, А—астроцит; $\times 28\ 000$

Некоторые исследователи, отмечая, что гликогенсинтетаза не вовлечена в параллельные изменения гликогена и фосфорилазы, затрудняются объяснить начальное (10 мин) падение активности фосфорилазы А [7].

Приведенные данные по определению активностей γ -амилазы и фосфорилазы в норме и при черепно-мозговой травме подтверждают уже высказанную мысль о том, что изменение содержания гликогена в ткани мозга животных зависит в большей степени от активности γ -амилазы, чем фосфорилазы, так как, если накопление гликогена в ткани мозга животных через 24 ч можно объяснить одновременным понижением активности γ -амилазы и фосфорилазы А, то уменьшение содержания гликогена через 10 мин, вероятно, обусловлено повышением активности γ -амилазы, но никак не пониженным фосфорилизмом.

Анализ полученных данных в известной мере объясняет механизм накопления гликогена в мозгу при черепно-мозговой травме.

Ранее нами было показано, что активация нервной деятельности животных, перенесших черепно-мозговую травму, приводит к нормализации имеющихся при этом нарушений сопряженности процессов дыхания и окислительного фосфорилирования [23], способствует восстановлению энергетических ресурсов мозга, нормализует ультраструктуру митохондрий мозга при травме [10] и выравнивает резко подавленную активность митохондриальной МАО [24].

Суммируя указанные данные, можно полагать, что стимуляторы НС оказывают благоприятное воздействие на ряд метаболических процессов мозга на некоторых этапах течения травматической болезни.

CRANIOCEREBRAL INJURY AND BRAIN GLYCOGEN METABOLISM

PROMYSLOV M. Sh., SMIRNOV A. V., AKOPYAN A. S.

Institute of Neurosurgery, USSR Academy of Medical Sciences, Moscow

Elevated brain glycogen and drastic loss of brain γ -amylase activity have been detected in the case of craniocerebral injury. The enzyme activity can be restored by stimulation of CNS of injured animals. On the contrary, inhibitory agents completely abolish its activity and thus lead to a further increase in brain glycogen content.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Coxon R.*—In: Metabolism and function in nervous tissue. Cambridge: Univ. Press, 8, 3—15, 1952.
2. *Cerretelli P., Spinelli D.* Biol. Soc. Ita. Biol. Sperim., 33, 10—12, 1644—1651, 1957.
3. *Holmes E., Holmes B.* Biochem. J., 20, 1196—1203, 1926.
4. *Jakoubec B., Svorad D.* Pflüg. Arch. ges. Physiol., 268, 5, 444—448, 1959.
5. Палладин А. В. Изв. АН СССР, Сер. биол., 5, 11—22, 1956.
6. *Watanabe H., Passonneau J. V.* Brain. Res., 66, 147—159, 1974.
7. *Ibrahim M. L. M., Paskoe E., Alam S., Miguel J.* Am. J. Pathol., 60, 403—415, 1970.
8. *Nelson S. R., Schulltz P. W., Passonneau J. V., Sowry O. H.* J. Neurochem., 15, 1271—1273, 1968.
9. Промыслов М. Ш., Тигранян Р. А. Вопросы мед. химии, 10, 611—614, 1964.
10. Тигранян Р. А., Смирнов А. В. Ж. exper. и клин. мед., 9, 20—24, 1969.
11. *Hers H. J.* Advances in metabolic. Ed Levin.—N. Y.: Acad. Press, 1, 1—44, 1964.
12. *Fiske C. H., Subarrow J. J.* Biol. Chem., 66, 375, 1925.
13. *Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* J. Biol. Chem., 193, 1, 265—275, 1951.
14. *Perry M. M.* J. Cell. Sci., 2, 257—264, 1967.
15. *Shinji Y., Shinji E., Mizuhira Y.* In: Acta Histochem. Cytochem., 8, 2, 139—149, 1975.
16. *Themann H. J.* Ultrastr. Res., 4, 401—412, 1960.
17. *Hers H. A.* Biochem. J., 86, 11—16, 1963.
18. *Lundgren P. R., Miquel J. J.* Neurochem, 17, 1383—1386, 1970.
19. *Zivkovic R. V., Mrsulja B. B., Djuricic B. M.* Experientia, 31, 404—406, 1975.
20. Промыслов М. Ш., Тигранян Р. А. Вопросы биохимии мозга, 3, 163—175, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 1967.
21. Промыслов М. Ш., Тигранян Р. А. Ж. exper. и клин. мед., 5, 3, 20—22, 1965.
22. Манина А. А. Ультраструктурные изменения и репаративные процессы в центральной нервной системе при различных воздействиях, Л., Медицина, 126 с. 1971.
23. Промыслов М. Ш., Баскаева Т. С. Бюл. exper. биол. и мед., 2, 38—39, 1975.
24. Промыслов М. Ш., Тигранян Р. А.—В кн.: Тяжелая черепно-мозговая травма, М., с. 51—59, 1969.

Институт нейрохирургии им. Н. Н. Бурденко
АМН СССР, Москва

Поступила 24.11 1982