

## Влияние внутриутробного действия этанола на созревание оксидантных и антиоксидантных систем в развивающемся мозге крыс\*

ШАБАНОВ П.Д.

д.м.н., профессор, зав. кафедрой фармакологии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова  
Санкт-Петербург, 194044, ул. акад. Лебедева, 6; e-mail: pdshabanov@mail.ru

БУРМИСТРОВ С.О.

к.б.н., научный сотрудник кафедры фармакологии  
Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

На беременных крысах-самках, эмбрионах и крысятах Вистар изучали развитие системы перекисного окисления липидов (ПОЛ) мембран и антиоксидантной защиты мозга в пренатальный и постнатальный периоды. Было найдено, что система ПОЛ (содержание малонового диальдегида — МДА) формируется в последний триместр беременности (наиболее ярко с 16-го дня беременности) и стабилизируется до 21-го дня постнатального развития, в дальнейшем умеренно снижаясь к половозрелому возрасту. Аналогичную динамику претерпевают показатели активности антиокислительных систем — практически повторяют динамику изменений ПОЛ восстановленный глутатион и супероксиддисмутаза (СОД). При этом в постнатальный период содержание восстановленного глутатиона в мозге продолжает оставаться высоким, не уменьшаясь к половозрелости, как показатели СОД и малонового диальдегида. Активность каталазы претерпевает динамику, прямо противоположную описанной: в третий триместр беременности активность каталазы максимальна, а после рождения она снижается практически в 5—10 раз, оставаясь пониженной (в сравнении с эмбриональной) у взрослых животных. Таким образом, в раннем постнатальном периоде (7—21-й дни) у крыс складывается стабильный статус антиоксидантной системы и уровня ПОЛ. Алкоголизация беременных самок активирует процессы ПОЛ (содержание МДА повышается) и системы антиоксидантной защиты (активность СОД и каталазы повышается) в мозге эмбрионов в третий триместр беременности. Кроме того, алкоголизация беременных самок снижает число родившихся крысят в помете, а также их массу тела и мозга, которые остаются пониженными вплоть до 7 недель постнатального развития. Отмена алкоголизации в конце беременности не полностью восстанавливает показатели ПОЛ и активность антиоксидантных систем в ранний постнатальный период (7—21—49-й дни жизни): активность СОД при этом остается значительно повышенной вплоть до 7 недель. Сходная закономерность наблюдается и при отмене алкоголизации на 21-й день постнатального развития.

**Ключевые слова:** онтогенез, перекисное окисление липидов, антиоксидантные системы, малоновый диальдегид, восстановленный глутатион, каталаза, супероксиддисмутаза, мозг, этанол, алкоголизация, беременность, крысы

### Введение

Ранние периоды онтогенеза (эмбриональный и ранний постэмбриональный) играют исключительно важную роль в развитии головного мозга. Нормальное развитие мозга может нарушаться в этот период под влиянием многих факторов. Это определяется как высокой чувствительностью мозга в критические периоды развития, так и необратимостью некоторых из последствий таких воздействий. При этом автоматически отклоняется от нормального процесса формирования связей между нейронами — образование синапсов, меняется пространственная организация межнейронных взаимодействий. Кроме того, некоторые свойства нейронов, определяющие их функциональные особенности после рождения (например, наличие тех или иных рецепторов), также могут необратимо программироваться в эмбриогенезе

[1, 3, 9]. Во взрослом организме медиаторы осуществляют передачу сигналов между клетками, однако в развивающейся нервной системе те же медиаторы могут образовывать морфогенетические градиенты, важные для формирования и дифференцировки различных областей нервной системы и нейромедиаторных систем соответственно [2, 9].

Менее изучено развитие в онтогенезе общебиологических внутриклеточных процессов, таких, как ПОЛ мембран и антиоксидантные системы [4, 10]. Вместе с тем, именно эти процессы осуществляют важнейшие функции поддержания гомеостаза нервных клеток. Еще менее изучены механизмы, посредством которых процессы ПОЛ и антиоксидантные системы вовлекаются в ответ на воздействие различных токсических и психогенных факторов в раннем онтогенезе [4]. Среди токсических факторов, до-

\* Работа поддержана грантами РФФИ 07-04-00549а и РГНФ 06-04-00346а

статочно часто воздействующих на развивающийся организм, в частности при беременности, следует выделить этанол и никотин, которые будущие матери употребляют как бытовые стимуляторы. Однако именно эти токсические воздействия в раннем онтогенезе могут привести к последующим поведенческим девиациям в подростковом и пубертатном периодах [12, 13].

Целью настоящей работы было изучение процессов ПОЛ и системы антиоксидантной защиты мозга эмбрионов и потомства после внутриутробного действия этанола у крыс.

### Объект и методы исследования

Объектом исследования служили 74 половозрелые крысы самки Вистар массой 200—250 г и 624 эмбрионов и крысят, самцов и самок разного возраста (эмбрионы 13—17-го дня беременности, крысята в возрасте 1, 3, 7 и 14 недель). Самки в течение всего периода беременности содержались на специальной диете, включавшей в себя сухой брикетированный корм и 20%-ный раствор этанола в качестве единственного источника жидкости. Часть животных (23 крысы) брали в опыт на 13—17-й дни беременности, другую часть (29 крыс) переводили на обычный питьевой режим на 20-й день беременности; в 3-й группе (22 крысы) животные потребляли этанол до конца лактации и вскармливания потомства (период включал в себя 21 день постнатального развития); в 4-й группе крысят алкоголизировали 20%-ным раствором этанола с 21-го дня жизни до половозрелого возраста (до возраста 95—100 дней). Помет каждой самки составлял 8—12 крысят. В опытах оценивали массу мозга и тела эмбрионов и массу мозга и тела потомства. На 21-й день после рождения самок из 3-й группы отсаживали и крысят переводили на обычный рацион питания и потребления жидкости (воды). В опыт брали крысят-самцов на 7-, 21- и 49-й дни постнатального развития.

Потомство половозрелых самок (возраст 95—100 дней) после отмены этанола на 20-й день беременности (2-я группа) тестировали на предпочтение потребления этанола и воды. Тестирование проводили в течение 10 дней в индивидуальных клетках при добровольном выборе между водой и 10%-ным раствором этанола.

В биохимических исследованиях цельный мозг эмбрионов или мозг взрослых крыс промывали 50-ммолярным Na-фосфатным буфером (рН 7,4) и гомогенизировали в том же буфере в соотношении 1:4 или 1:6 (масса/объем). Гомогенат центрифугировали 25 мин при 4000 g. Осадок отбрасывали, и супернатант центрифугировали еще раз в течение 60 мин при 15000 g. Конечный супернатант отбирали и исполь-

зовали для определения активности СОД и уровня ПОЛ. Промежуточный осадок митохондриальной фракции промывали один раз вышеуказанным буфером и гомогенизировали в 1%-ном растворе детергента Тритон Х-100 в объеме, равном объему первоначально взятого гомогената. Гомогенат центрифугировали в течение 40 мин при 15000 g. Супернатант использовали для определения активности каталазы.

О состоянии антиоксидантной системы мозга судили по активности СОД и содержанию восстановленного глутатиона в 10%-ном гомогенате мозга в 25-ммолярном трис-НСl с 175-ммолярным КСl буфере (рН 7,4). Активность СОД оценивали методом Е.Е. Дубининой с соавторами [5] по степени ингибирования восстановления нитросинего тетразолия в присутствии феназинметасульфата и НАДН и относили к содержанию белка в пробах, которое определяли унифицированным методом О.Н. Lowry с соавторами [26]. Содержание восстановленного глутатиона измеряли по его реакции с избытком аллоксана [6]. Уровень ПОЛ ткани определяли методом содержания продуктов ПОЛ (МДА), реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой [8]. Диеновые конъюгаты экстрагировали из навески ткани мозга массой 100 мг смесью гептана и изопропанола в соотношении 1:1 в объеме 2 мл и оценивали по методу И.Д. Стальной [7].

Выборка для каждой группы животных составила не менее 10—12 крыс или эмбрионов. Результаты обрабатывали статистически с использованием t-критерия Стьюдента.

### Результаты исследования

#### Перекисное окисление липидов и активность системы антиоксидантной защиты мозга эмбрионов и потомства при нормальном онтогенезе

При изучении ПОЛ и антиоксидантной защиты мозга эмбрионов найдено (табл. 1), что уровень МДА на 13—16-й дни внутриутробного развития малы и составляют 0,22—0,44 мкмоль/г белка. С 17-го дня гестации содержание малонового диальдегида начинает резко возрастать. Максимальные значения этого показателя наблюдали на 7-й и 21-й дни постнатального развития (6,57—7,01 мкмоль/г белка) с дальнейшим снижением вдвое через 7 недель до уровня  $3,52 \pm 0,19$  мкмоль/г белка, который сохранялся на этом уровне у половозрелых крыс.

Активность антиоксидантных систем оценивали по уровню восстановленного глутатиона и активности ферментов — каталазы и СОД. Данные этих наблюдений представлены в табл. 2.

Таблица 1

## Динамика уровня малонового диальдегида в мозге эмбрионов и потомства крыс при нормальном онтогенезе

| Дни развития            | Содержание малонового диальдегида в мозге (мкмоль/г белка) |
|-------------------------|------------------------------------------------------------|
| Внутриутробное развитие |                                                            |
| 13-й день               | $0,22 \pm 0,05$                                            |
| 14-й день               | $0,25 \pm 0,06$                                            |
| 15-й день               | $0,31 \pm 0,06$                                            |
| 16-й день               | $0,44 \pm 0,09$                                            |
| 17-й день               | $1,73 \pm 0,21$                                            |
| Постнатальное развитие  |                                                            |
| 7-й день (1 неделя)     | $6,57 \pm 0,22$                                            |
| 21-й день (3 недели)    | $7,01 \pm 0,23$                                            |
| 49-й день (7 недель)    | $3,52 \pm 0,19$                                            |
| 98-й день (14 недель)   | $3,20 \pm 0,21$                                            |

Таблица 2

## Динамика уровня восстановленного глутатиона и активностей каталазы и супероксиддисмутазы в мозге эмбрионов и потомства крыс при нормальном онтогенезе

| Дни развития            | Восстановленный глутатион (мкмоль/г) | Каталаза (мкмоль $H_2O_2$ /мин · мг белка) | Супероксиддисмутаза (А/мг белка) |
|-------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------------|----------------------------------|
| Внутриутробное развитие |                                      |                                            |                                  |
| 13-й день               | $12,51 \pm 2,06$                     | $27,84 \pm 1,92$                           | $0,46 \pm 0,07$                  |
| 14-й день               | $14,07 \pm 2,91$                     | $38,17 \pm 2,19$                           | $0,56 \pm 0,09$                  |
| 15-й день               | $17,23 \pm 3,63$                     | $34,58 \pm 2,21$                           | $0,74 \pm 0,12$                  |
| 16-й день               | $19,02 \pm 3,06$                     | $33,13 \pm 1,89$                           | $1,37 \pm 0,22$                  |
| 17-й день               | $19,57 \pm 4,01$                     | $32,38 \pm 1,77$                           | $1,71 \pm 0,28$                  |
| Постнатальное развитие  |                                      |                                            |                                  |
| 7-й день (1 неделя)     | $21,52 \pm 4,83$                     | $10,24 \pm 1,37$                           | $2,52 \pm 0,36$                  |
| 21-й день (3 недели)    | $27,06 \pm 6,03$                     | $8,63 \pm 1,18$                            | $3,76 \pm 0,40$                  |
| 49-й день (7 недель)    | $24,11 \pm 5,08$                     | $5,44 \pm 1,11$                            | $2,78 \pm 0,36$                  |
| 98-й день (14 недель)   | $31,04 \pm 7,11$                     | $4,21 \pm 0,82$                            | $1,41 \pm 0,24$                  |

Динамика активности СОД в целом повторяет динамику изменений уровня МДА. С развитием мозга эмбриона активность СОД возрастает от  $0,46 \pm 0,07$  на 13-й день до  $1,71 \pm 0,28$  А/мг белка на 17-й день пренатального развития. После рождения активность СОД продолжает расти, достигая максимума ( $3,76 \pm 0,40$  А/мг белка) к концу 3-й недели постнатального развития. В дальнейшем активность СОД несколько снижается и составляет у половозрелых крыс  $1,41 \pm 0,24$  А/мг белка, т.е. близка к уровню новорожденных животных. Картину, аналогичную СОД, наблюдали и в отношении восстановленного глутатиона. Уровень восстановленного глутатиона равномерно возрастает в период пренатального развития эмбриона (с  $12,51 \pm 2,06$  мкмоль/г на 13-й день до  $19,57 \pm 4,01$  мкмоль/г на 17-й день беременности) и

продолжает расти после рождения, достигая максимума ( $31,04 \pm 7,11$  мкмоль/г) в период половозрелости.

Напротив, активность каталазы претерпевает динамику, прямо противоположную СОД и восстановленному глутатиону. На 13-й день беременности в мозге эмбрионов регистрируется активность, составляющая  $27,84 \pm 1,92$  мкмоль  $H_2O_2$ /мин · мг белка. В дальнейшем, на 14—17-й дни беременности, активность каталазы колеблется в пределах  $38,17—32,38$  мкмоль  $H_2O_2$ /мин · мг белка. После рождения активность фермента снижается почти в 4 раза, до  $10,24 \pm 1,37$  мкмоль  $H_2O_2$ /мин · мг белка на 7-й день постнатального развития и продолжает падать до  $4,21 \pm 0,82$  мкмоль  $H_2O_2$ /мин · мг белка у половозрелых крыс.

Обобщая приведенные данные, следует подчеркнуть, что в раннем постнатальном периоде (7—21-й дни) у крыс складывается стабильный статус антиоксидантной системы и уровня ПОЛ.

**Влияние внутриутробного действия этанола на развитие потомства и предпочтение алкоголя у крыс**

Содержание беременных самок крыс на диете, содержащей 20%-ный этанол, приводит к изменению ряда общих и биохимических показателей эмбрионов и потомства крыс. В наших исследованиях внутриутробное действие этанола задерживало развитие, о чем свидетельствует снижение массы тела и мозга (14—17-дневные эмбрионы) на 14—19% ( $p < 0,05$ ). Отставание развития наблюдается и у потомства. При этом масса мозга и тела потомства самок, находившихся в условиях алкоголизации, была достоверно ниже контрольных величин вплоть до 21-го дня постнатального развития (возраста 3 недели). Кроме того, наблюдали снижение числа крысят в потомствах крыс, получавших этанол во время беременности, до  $8 \pm 1$  против  $11 \pm 1$  в контроле, что указывает на увеличение внутриутробной гибели зародышей.

Тестирование на предпочтение воды и этанола потомства в возрасте 95—100 дней показало, что интактные крысы потребляют  $29 \pm 5\%$  раствора этанола от общего объема выпитой жидкости. Потомство алкоголизированных в период беременности крыс

этого же возраста потребляло  $45 \pm 6\%$  раствора этанола от общего объема выпитой жидкости ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, полученные данные подтверждают наличие эмбриотоксического действия этанола у крыс, находившихся в условиях полупринудительной алкоголизации в период беременности, отмеченное и в других исследованиях (Кругликов Р.И., Майзелис М.Я., 1987; Бичева Н.Н., 1996; Ганапольский В.П., 2004).

**Перекисное окисление липидов и активность системы антиоксидантной защиты мозга эмбрионов и потомства при алкоголизации матерей**

Содержание беременных крыс на диете, содержащей этанол, меняет показатели ПОЛ и антиоксидантных систем (табл. 3).

Начиная с 14-го дня эмбриогенеза, на 12—20% повышаются уровни МДА, которые сохраняются повышенными до 17-го дня беременности. При отмене этанола на 20-й день беременности содержание МДА возвращается к норме. При сохранении потребления этанола до конца лактации уровень МДА сохраняется повышенным на 16—21%.

Одновременно с возрастающей динамикой уровня МДА в мозге алкоголизированных эмбрионов на 14—17-е сутки развития на 14—29% повышалась активность каталазы, что указывает на вероятность повышенного образования перекиси водорода в мозге при алкоголизации. Перекись водорода является высокоток-

Таблица 3

**Динамика уровня малонового диальдегида и активностей каталазы и супероксиддисмутазы в мозге эмбрионов крыс при алкоголизации беременных самок**

| Дни развития                                       | Малоновый диальдегид (мкмоль/г белка) | Каталаза (мкмоль $H_2O_2$ /мин · мг белка) | Супероксиддисмутаза (А/мг белка) |
|----------------------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------------|----------------------------------|
| Нормальный онтогенез (контроль)                    |                                       |                                            |                                  |
| 13-й день                                          | $0,22 \pm 0,05$                       | $27,84 \pm 1,92$                           | $0,46 \pm 0,07$                  |
| 14-й день                                          | $0,25 \pm 0,06$                       | $38,17 \pm 2,19$                           | $0,56 \pm 0,09$                  |
| 15-й день                                          | $0,31 \pm 0,06$                       | $34,58 \pm 2,21$                           | $0,74 \pm 0,12$                  |
| 16-й день                                          | $0,44 \pm 0,09$                       | $33,13 \pm 1,89$                           | $1,37 \pm 0,22$                  |
| 17-й день                                          | $1,73 \pm 0,21$                       | $32,38 \pm 1,77$                           | $1,46 \pm 0,19$                  |
| Алкоголизация                                      |                                       |                                            |                                  |
| 13-й день                                          | $0,23 \pm 0,05$                       | $22,88 \pm 2,56$                           | $0,70 \pm 0,10$                  |
| 14-й день                                          | $0,32 \pm 0,05^*$                     | $44,81 \pm 2,89^*$                         | $0,90 \pm 0,07^*$                |
| 15-й день                                          | $0,40 \pm 0,06$                       | $38,38 \pm 2,43^*$                         | $0,72 \pm 0,11$                  |
| 16-й день                                          | $0,65 \pm 0,08^*$                     | $37,72 \pm 1,71^*$                         | $1,63 \pm 0,21^*$                |
| 17-й день                                          | $2,28 \pm 0,24$                       | $40,54 \pm 2,19^*$                         | $1,81 \pm 0,19^*$                |
| Примечание. * — $p < 0,05$ по отношению к контролю |                                       |                                            |                                  |

сичным промежуточным продуктом восстановления кислорода, запускающего и поддерживающего ПОЛ.

Внутриутробная алкоголизация также инициировала повышение активности СОД на 15—40%, что проявлялось на 14-, 16- и 17-й дни развития ( $p<0,05$ ). Интересно отметить, что повышенные значения СОД оставались и после отмены алкоголя на 7—21—49-й дни постнатального развития (табл. 4). При этом на 7-й и 21-й дни постнатального периода уровень активности СОД превышал соответствующие контроли на 32—36% ( $p<0,01$ ), что указывает на выраженную активацию супероксид-генерирующей системы мозга этанолом. По-видимому, данные изменения наименее подвержены компенсации после отмены алкоголизации.

Нельзя исключить, что одной из активации процессов ПОЛ в мозге эмбрионов является уменьшение содержания восстановленного глутатиона. На 15-й день эмбриогенеза мы регистрировали снижение уровня восстановленного глутатиона на 13% ( $p<0,05$ ). В мозге потомства, не потреблявшего этанол после рождения, содержание восстановленного глутатиона нормализовалось к 7-му дню постнатального развития, не подвергаясь в дальнейшем изменениям. Если алкоголизацию не отменяли при вскармливании крысят, то уровень восстановленного глутатиона в мозге 7-дневных крысят возрастал на 34% ( $p<0,01$ ; табл. 5). Это свидетельствует об определенной напряженности функционирования антиоксидантной системы и повышении свободнорадикальных

Таблица 4

**Динамика уровня малонового диальдегида, восстановленного глутатиона и активностей каталазы и супероксиддисмутазы в мозге потомства крыс, рожденных от алкоголизированных беременных самок**

| Дни постнатального развития               | Малоновый диальдегид (мкмоль/г белка) | Каталаза (мкмоль $H_2O_2$ /мин · мг белка) | Супероксиддисмутаза (А/мг белка) | Восстановленный глутатион (мкмоль/г) |
|-------------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|
| Нормальный онтогенез (контроль)           |                                       |                                            |                                  |                                      |
| 7-й день                                  | 6,57±0,22                             | 10,24±1,37                                 | 2,52±0,36                        | 21,52±4,83                           |
| 21-й день                                 | 5,14±0,23                             | 8,63±1,18                                  | 3,76±0,40                        | 27,06±6,03                           |
| 49-й день                                 | 3,52±0,19                             | 5,44±1,11                                  | 2,78±0,36                        | 24,11±5,08                           |
| Алкоголизация самок в период беременности |                                       |                                            |                                  |                                      |
| 7-й день                                  | 6,29±0,24                             | 12,72±2,18                                 | 3,33±0,32**                      | 19,51±4,07                           |
| 21-й день                                 | 4,09±0,23                             | 8,19±1,28                                  | 5,12±0,29*                       | 28,05±5,52                           |
| 49-й день                                 | 3,31±0,18                             | 5,13±1,19                                  | 3,82±0,29                        | 23,09±5,38                           |

Примечание. \* —  $p<0,05$ ; \*\* —  $p<0,01$  по отношению к контролю

Таблица 5

**Динамика уровня малонового диальдегида, восстановленного глутатиона и активностей каталазы и супероксиддисмутазы в мозге потомства крыс, рожденных от самок, алкоголизированных в период беременности и вскармливания, а также после отмены этанола на 21-й день постнатального развития**

| Дни постнатального развития                               | Малоновый диальдегид (мкмоль/г белка) | Каталаза (мкмоль $H_2O_2$ /мин · мг белка) | Супероксиддисмутаза (А/мг белка) | Восстановленный глутатион (мкмоль/г) |
|-----------------------------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|
| Нормальный онтогенез (контроль)                           |                                       |                                            |                                  |                                      |
| 7-й день                                                  | 6,54±0,22                             | 14,52±2,58                                 | 2,57±0,33                        | 21,52±4,83                           |
| 21-й день                                                 | 5,11±0,23                             | 8,28±1,32                                  | 2,66±0,31                        | 27,06±6,03                           |
| 49-й день                                                 | 3,49±0,19                             | 5,22±1,14                                  | 2,72±0,30                        | 24,11±5,08                           |
| Алкоголизация самок в период беременности и вскармливания |                                       |                                            |                                  |                                      |
| 7-й день                                                  | 7,76±0,25**                           | 13,88±2,14                                 | 2,73±0,30                        | 29,38±4,72**                         |
| 21-й день                                                 | 7,69±0,23**                           | 8,62±1,39                                  | 4,38±0,27*                       | 28,96±5,06                           |
| Отмена алкоголя                                           |                                       |                                            |                                  |                                      |
| 49-й день                                                 | 3,82±0,19                             | 4,81±1,43                                  | 3,80±0,28*                       | 20,56±4,89                           |

Примечание. \* —  $p<0,05$ ; \*\* —  $p<0,01$  по отношению к контролю

реакций, которые обеспечивают активацию системы ПОЛ в мозге в исследованные сроки наблюдений.

Исходя из приведенных данных, можно констатировать, что повышенный уровень свободнорадикального окисления липидов в мозге эмбрионов, вызванный алкоголизацией, не в полной мере компенсируется повышением активности антиоксидантных ферментов (каталазы и СОД).

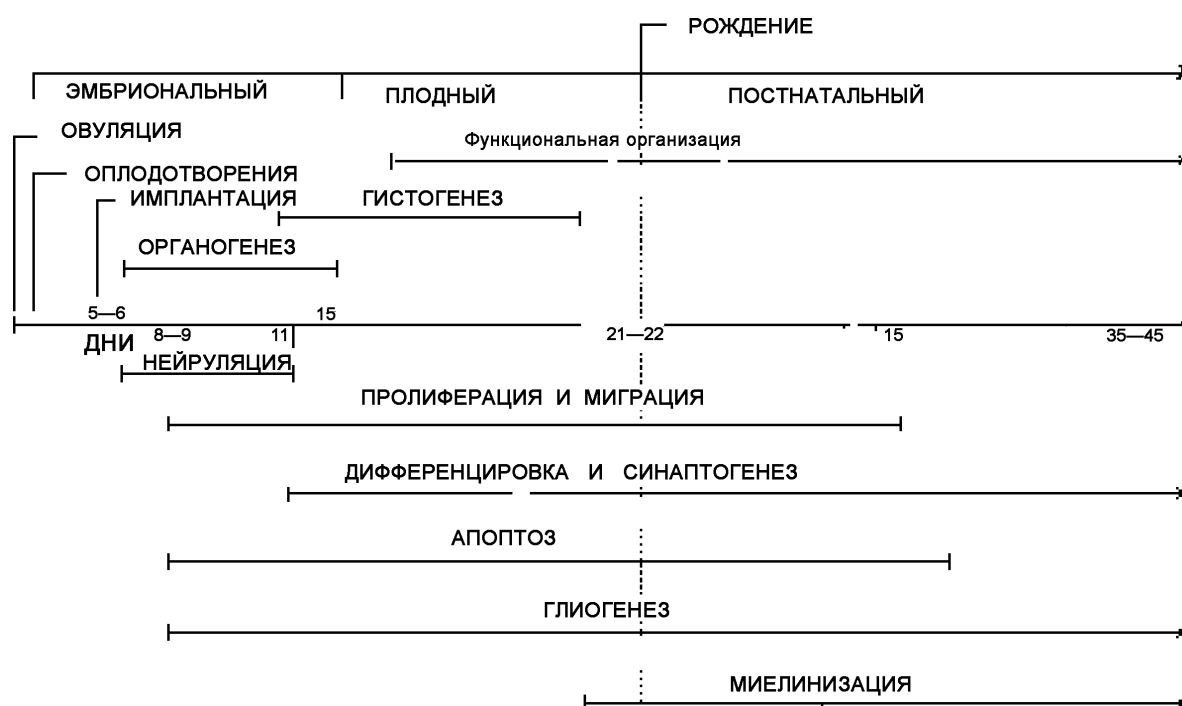
Одной из причин активации ПОЛ, как показано в исследованиях С.О. Бурмистрова [4], является сниженный уровень восстановленного глутатиона в тканях. Наши опыты также подтверждают, что возможной причиной активации процессов ПОЛ в мозге эмбрионов при алкоголизации может быть понижение уровня восстановленного глутатиона. Продолжение алкоголизации потомства после рождения сопровождается сохранением повышенной активности свободнорадикальных механизмов. Об этом в данном случае свидетельствует повышенный уровень МДА и восстановленного глутатиона.

### Обсуждение полученных результатов

Для исследований становления системы ПОЛ и антиоксидантной защиты в онтогенезе нами выбран третий триместр беременности крыс и отдельные этапы постнатального периода — 1—3—7—14 недель. Как показано многочисленными исследованиями [1, 3, 9, 11, 12], именно в третий триместр беременно-

сти и в ранний постнатальный период (до 21-го дня жизни) у крыс происходит созревание основных нейромедиаторных и внутриклеточных систем организма. Согласно современным представлениям, на протяжении всего периода развития нервной системы существует ряд чувствительных, или критических, периодов, характеризующихся активацией или протеканием важных морфогенетических процессов. Эти процессы, а именно: пролиферация, миграция, дифференциация, синаптогенез, миелинизация и апоптоз — протекают на всем протяжении внутриутробного развития и некоторые из них затрагивают первые годы (приматы и человек) или месяцы (грызуны) жизни. Полное созревание центральной нервной системы (ЦНС) заканчивается в пубертатный период (рисунок). Таким образом, воздействие каким-либо фактором в любой из этих периодов на развивающийся организм может привести к различным нежелательным последствиям. Повреждения могут носить как морфологический, так и функциональный характер и привести к нарушениям поведения, памяти и обучения, эмоциональной и мотивационной сферы.

Начиная с первой недели беременности у крыс (9,5 гестационный день) и первого месяца беременности у человека происходит закладка специфических структур ЦНС зародыша, сопряженная с пролиферацией, миграцией, дифференцировкой и другими процессами морфогенеза [14, 23, 35]. Развитие трех мозговых пузырей происходит у крысиного зародыша



Временные шкалы развивающихся процессов в нервной системе крыс [34]

и зародыша человека соответственно на 10,5-е и 26-е  $\pm 1$  сутки внутриутробного развития. Позднее, на 11,5-й день развития у крысы и на 33-й  $\pm 1$  день развития у человека, мозг представлен уже пятью мозговыми пузырями [20]. Мост и продолговатый мозг включают стволовую область мозга, моторные и сенсорные ядра созревают очень рано у крысиного зародыша (10—16-й гестационные дни) и у зародыша человека (3—7,5 месяцы пренатального развития). Гипоталамические и таламические ядра начинают свое формирование в позднем эмбриональном и раннем плодном периодах у крыс и человека. Примерно на 12-й гестационный день желудочковая зона крысиного зародыша представляет собой гистологически однородную зону, чуть позже анатомически начинает выделяться и поджелудочковая зона. Это две основные пролиферативные популяции клеток, которые вносят важный вклад в окончательную популяцию клеток зрелой коры головного мозга [33]. Самая экспансивная фаза пролиферации в желудочковых и поджелудочковых зонах у зародыша крысы регистрируется между 13-м и 18-м гестационными днями, хотя некоторые неокортикальные клетки могут оставаться митотически активными до последних дней внутриутробного развития (21—22-й гестационный день) [15, 16, 32]. Миграция клеток от желудочковой зоны и других зародышевых слоев происходит радиально к дорзальной коре головного мозга, проходя области переднего мозга, такие, как обонятельная луковица и боковая кора мозга [30]. В дополнение к миграции нейронов к корковой пластине другие факторы изменяют слоистость коры головного мозга: размер клеток, плотность упаковки, внеклеточный матрикс, глиогенез, миелинизацию и синаптогенез корковых афферентов и эфферентов, которые вносят свой вклад в дифференцирование этой структуры нервной системы. Дифференцирование нейробластов может быть определено как процесс экспрессии терминального фенотипа. Вероятно, начальная фаза дифференцировки проявляется, как только нейронные предшественники достигают корковой пластинки [21, 22, 27].

Синапсы, представляющие собой нейробиологические субстраты почти всей межклеточной коммуникации [1, 9], формируются в конце эмбрионального периода развития зародыша и продолжают формироваться после рождения вплоть до наступления пубертатного периода у обезьян [19] и человека [34]. Синаптогенез включает биохимические и морфологические изменения пред- и постсинаптических элементов. Процесс миелинизации начинается на заключительных этапах внутриутробного развития зародыша крысы [36, 37] и человека [24, 25, 31] и продолжается в постнатальном периоде развития [28, 29]. В процес-

се развития нервной системы наряду с клеточной пролиферацией протекает процесс запрограммированной гибели клеток, который систематически удаляет избыточные количество клеток. Известно две волны апоптоза — в пренатальном и постнатальном периодах развития ЦНС. Более ранняя волна встречается в пролиферативных зонах, вторая — среди постмитотических клеток [17, 18].

Приведенные морфофункциональные сведения получены главным образом на основании изучения гистологической картины меняющегося в онтогенезе мозга, а также в процессе изучения изменений созревания ЦНС после введения в разные периоды развития различных тератогенов и эмбриотоксических агентов (алкоголь, никотин, соединения тяжелых металлов и т.д.). Безусловный интерес представляет созревание функциональных биохимических систем в онтогенезе, чему, собственно, и посвящена настоящая работа. Мы выбрали в качестве таких биохимических маркеров созревания ЦНС антиоксидантные системы и ПОЛ. При этом найдено, что ПОЛ формируется в последний триместр беременности (наиболее ярко с 16-го дня беременности) и стабилизируется до 21-го дня постнатального развития, в дальнейшем умеренно снижаясь к половозрелому возрасту. Аналогичную динамику претерпевают показатели активности антиокислительных систем — практически повторяют динамику изменений ПОЛ восстановленный глутатион и СОД. При этом в постнатальный период содержание восстановленного глутатиона продолжает оставаться высоким, не уменьшаясь к половозрелости, как показатели СОД и МДА. Активность каталазы претерпевает динамику, прямо противоположную описанной: в третий триместр беременности активность каталазы максимальна, а после рождения она снижается практически в 5—10 раз, оставаясь пониженной (в сравнении с эмбриональной) у взрослых животных.

Динамика созревания ПОЛ и антиоксидантных систем в пре- и постнатальном периодах сходна с таковой для большинства нейромедиаторов. Так, ранее нами показано, что введение нейротоксинов 6-гидроксидофамина и 5,7-дигидрокситриптамина в третий триместр беременности вызывает выраженные нарушения синаптогенеза и созревания дофаминергической и серотонинергической систем мозга соответственно [11, 12]. Однако наиболее выраженные нарушения регистрировали после введения этих нейротоксинов в ранний постнатальный период (4—10—17-й дни жизни). Это доказывает, что созревание основных нейромедиаторных систем мозга идет параллельно созреванию систем ПОЛ и антиоксидантной защиты. Полученные нами результаты необходимо учитывать при изучении девиантного поведения, про-

являющегося главным образом у подростков, но имеющего, без сомнения, причины, заложенные именно в раннем онтогенезе.

В значительной степени системы ПОЛ и антиоксидантной защиты подвержены влиянию пре- и постнатального воздействия этанола. В наших опытах показано, что потребление беременными самками 20%-ного раствора этанола приводит к активации процессов ПОЛ, параллельно повышается активность и антиокислительных систем. Это вызвано, по-видимому, общей реакцией организма на действие этанола, которая заключается в усилении деструктивных событий в нервной системе (свободнорадикальных процессов), и возрастанием активности механизмов их нейтрализации (антиокислительных процессов). В какой степени эти феномены специфичны для действия этанола, сказать трудно. Скорее всего, неспецифичны. Тем не менее, последствия этих явлений четко проявляются в виде эмбриотоксического действия этанола, поскольку алкоголизация беременных самок снижала число родившихся крысят в помете, а также их массу тела и мозга, которые оставались пониженными вплоть до 7 недель постнатального развития. Все указанное позволяет сделать заключение, что алкоголизация беременных самок крыс нарушает процессы созревания в нервной системе, которые остаются пониженными (некомпенсированными) достаточно длительное время, в наших опытах — в течение 7 недель. Это в полной мере созвучно и другим исследованиям [1—4], в которых показано замедление развития нервной системы при воздействии в пренатальный период разных ксенобиотиков (никотин, алкоголь, холинолитики и др.).

### Выводы

1. Системы ПОЛ (малоновый диальдегид) и антиоксидантные системы (восстановленный глутатион, активность СОД и каталазы) активно развиваются в третий триместр беременности крыс. В раннем постнатальном периоде (до 21-го дня жизни) их активность продолжает возрастать, за исключением каталазы, активность которой в постнатальном периоде падает.
2. Алкоголизация беременных самок активирует процессы ПОЛ (содержание малонового диальдегида повышается) и системы антиоксидантной защиты (активность СОД и каталазы повышается) в мозге эмбрионов в третий триместр беременности.
3. Алкоголизация беременных самок снижает число родившихся крысят в помете, а также их массу тела и мозга, которые остаются пониженными вплоть до 7 недель постнатального развития.
4. Отмена алкоголизации в конце беременности не приводит к полному восстановлению показателей ПОЛ и активности антиоксидантных систем в ран-

ний постнатальный период (7—21—49-й дни жизни): активность СОД при этом остается значительно повышенной вплоть до 7 недель. Сходная закономерность наблюдается и при отмене алкоголизации на 21-й день постнатального развития.

### Список литературы

1. Байрамов А.А. Центральные холинергические механизмы регуляции половой функции (экспериментальное исследование): Автореф. дисс. на соискание ученой степени д.м.н. — СПб.: ВМедА, 2008. — 48 с.
2. Байрамов А.А., Сапронов Н.С. Влияние холинотропных препаратов на пренатальное развитие моноаминергической системы головного мозга // Мед. акад. журн. — 2007. — Т. 7, №4. — С. 52—58.
3. Байрамов А.А., Мещеров Ш.К. Отдаленные нейрохимические эффекты пренатального воздействия селективных М- и Н-холинотропных препаратов // Психофармакол. и биол. наркол. — 2008. — Т. 8, №1. — С. 2286—2293.
4. Бурмистров С.О. Антиоксидантная система и перекисное окисление липидов ткани мозга при пренатальном и раннем постнатальном воздействии этанола: Автореф. дисс. на соискание ученой степени к.б.н. — Л.: НИИЭМ РАМН СССР, 1990. — 23 с.
5. Дубинина Е.Е., Сальникова Л.А., Ефимова Л.Ф. Активность и изоферментный спектр СОД эритроцитов в плазме крови человека // Лаб. дело. — 1983. — №10. — С. 30—33.
6. Зарубина И.В., Миронова О.П. Влияние бемитила на глутатионовую систему в печени крыс при острой гипоксии // Эксперим. и клин. фармакол. — 2002. — Т. 65, №3. — С. 28—30.
7. Стальная И.Д. Метод определения диеновых конъюгатов ненасыщенных высших жирных кислот // Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. — М.: Медицина, 1977. — С. 63—64.
8. Стальная И.Д., Горишвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. — М.: Медицина, 1977. — С. 66—68.
9. Угрюмов М.В. Механизмы нейроэндокринной регуляции. — М.: Наука, 1999. — 247 с.
10. Шабанов П.Д. Психофармакология. — СПб.: Элби-СПб., 2008. — 416 с.
11. Шабанов П.Д., Лебедев А.А., Мещеров Ш.К. Дофамин и подкрепляющие системы мозга. — СПб.: Лань, 2002. — 208 с.
12. Шабанов П.Д., Мещеров Ш.К., Лебедев А.А. Синдром социальной изоляции. — СПб.: Элби-СПб., 2004. — 208 с.
13. Шабанов П.Д., Лебедев А.А., Стрельцов В.Ф. Гормональные механизмы подкрепления. — СПб.: Элби-СПб., 2004. — 208 с.
14. Atterberry T.T., Burnett W.T., Chambers J.E. Age-related differences in parathion and chlorpyrifos toxicity in male rats: target and nontarget esterase sensitivity and cytochrome P450-mediated metabolism // Toxicol. Appl. Pharmacol. — 1997. — Vol. 147. — P. 411—418.
15. Bayer S.A. Development of the hippocampal region in the rat. II: Morphogenesis during embryonic and early postnatal life // J. Comp. Neurol. — 1980. — Vol. 190. — P. 115—134.
16. Bayer S.A., Altman J. Neocortical development. — New York: Raven Press, 1991. — 223 p.
17. Blaschke A.J., Staley K., Chun J. Widespread programmed cell death in proliferative and postmitotic regions of the fetal cerebral cortex // Development. — 1996. — Vol. 122. — P. 1165—1174.
18. Blaschke A.J., Weiner J.A., Chun J. Programmed cell death is a universal feature of embryonic and postnatal neuroproliferative re-

gions throughout the central nervous system // J. Comp. Neurol. — 1998. — Vol. 396. — P. 39—50.

19. Bourgeois J.P., Goldman-Rakic P.S., Rakic P. Synaptogenesis in the prefrontal cortex of rhesus monkeys // Cereb. Cortex. — 1994. — Vol. 4. — P. 78—96.

20. Carpenter M.B., Sutin J. Human neuroanatomy. — Baltimore: Williams & Wilkins, 1983. — P. 71—74.

21. Eagleson K.L., Lillien L., Chan A.V., Levitt P. Mechanisms specifying area fate in cortex include cell-cycle-dependent decisions and the capacity of progenitors to express phenotype memory // Development. — 1997. — Vol. 124. — P. 1623—1630.

22. Geschwind N., Galaburda A.M. Cerebral lateralization. Biological mechanisms, associations, and pathology. I: A hypothesis and a program for research // Arch. Neurol. — 1985. — Vol. 42. — P. 428—459.

23. Herschkowitz N., Kagan J., Zilles K. Neurobiological bases of behavioral development in the first year // Neuropediatrics. — 1997. — Vol. 28. — P. 296—306.

24. Hunter S.F., Leavitt J.A., Rodriguez M. Direct observation of myelination in vivo in the mature human central nervous system. A model for the behaviour of oligodendrocyte progenitors and their progeny // Brain. — 1997. — Vol. 120, №11. — P. 2071—2082.

25. Iwasaki N., Hamano K., Okada Y. et al. Volumetric quantification of brain development using MRI // Neuroradiology. — 1997. — Vol. 39. — P. 841—846.

26. Lowry O.H., Rosebrough N.Y., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. — 1951. — Vol. 193, №1. — P. 265—275.

27. McConnell S.K. The specification of neuronal identity in the mammalian cerebral cortex // Experientia. — 1990. — Vol. 46. — P. 922—929.

28. Miller M.W. Limited ethanol exposure selectively alters the proliferation of precursor cells in the cerebral cortex // Alcohol Clin. Exp. Res. — 1996. — Vol. 20. — P. 139—143.

29. Miller M.W. Migration of cortical neurons is altered by gestational exposure to ethanol // Alcohol Clin. Exp. Res. — 1993. — Vol. 17. — P. 304—314.

30. O'Rourke N.A., Dailey M.E., Smith S.J., McConnell S.K. Diverse migratory pathways in the developing cerebral cortex // Science. — 1992. — Vol. 258. — P. 299—302.

31. Paus T., Zijdenbos A., Worsley K. et al. Structural maturation of neural pathways in children and adolescents: in vivo study // Science. — 1999. — Vol. 283. — P. 1908—1911.

32. Rakic P., Caviness V.S.J. Cortical development: view from neurological mutants two decades later // Neuron. — 1995. — Vol. 14. — P. 1101—1104.

33. Takahashi T., Nowakowski R.S., Caviness V.S.J. Early ontogeny of the secondary proliferative population of the embryonic murine cerebral wall // J. Neurosci. — 1995. — Vol. 15. — P. 6058—6068.

34. Uylings H.B., van Eden C.G. Qualitative and quantitative comparison of the prefrontal cortex in rat and in primates, including humans // Prog. Brain Res. — 1990. — Vol. 85. — P. 31—62.

35. Vorhees C.V. Principles of behavioral teratology // Handbook of behavioral teratology / Ed. by E.P. Riley, C.V. Vorhees. — New York: Plenum Press, 1986. — P. 23—48.

36. Wiggins R.C. Myelin development and nutritional insufficiency // Brain Res. — 1982. — Vol. 257. — P. 151—175.

37. Wiggins R.C. Myelination: a critical stage in development // Neurotoxicol. — 1986. — Vol. 7. — P. 103—120.

## THE EFFECT OF PREGNANT ETHANOL ADMINISTRATION ON FORMATION OF THE OXIDANT AND ANTIOXIDANT SYSTEMS IN THE DEVELOPING BRAIN OF RATS

SHABANOV P.D.

Dr.med. sci. (Pharmacology), Professor, Head of Dept. of Pharmacology, Military Medical Academy, St.Petersburg  
E-mail: pdshabanov@mail.ru

BURMISTROV S.O.

Ph.D. (Biochemistry), Scientific Researcher, Dept. of Pharmacology, Military Medical Academy, St.Petersburg

*The development of the brain peroxide oxidation of the membrane lipids (lipid peroxidation, or LPO) and antioxidant systems of the brain in pre- and postnatal period was studied in Wistar pregnant female rats, embryos and pups. The LPO system (assessed on the malonic dialdehyde level) was forming in the third trimester of pregnancy (the mostly since 16<sup>th</sup> day of pregnancy) and stabilizing up to 21<sup>st</sup> day of postnatal development, decreasing slightly up to adult age. The activity of antioxidant systems (recovered glutathione level and superoxide desmutase activity) repeated the same type of dynamics. The contents of recovered glutathione in postnatal period persisted on the high level, not decreasing to adulthood, as superoxide desmutase activity and malonic dialdehyde level. The catalase activity was changing in opportunity manner: the activity was maximal in the third trimester of pregnancy and than was decreasing in 5—10-fold in postnatal period, persisting low in adult rats in comparison with embryo activity. Therefore, in the early postnatal period (7—21<sup>st</sup> days) the stable status of the antioxidant system and POL indexes is forming. Alcoholization of pregnant rat females activated LPO processes (the malonic dialdehyde level was elevated) and the systems of antioxidant defense (the superoxide desmutase and catalase activities grew higher) in the embryo brain in the third trimester of pregnancy. Besides, alcoholization of pregnant females reduced number of pups delivered from alcoholized mothers, and their body and brain mass as well, which stated on decreased level up to 7 weeks of postnatal development. The withdrawal of alcoholization in the end of pregnancy recovered partly the indexes of LPO and the activity of antioxidant systems in the early postnatal period (7—21—49 days of life): the superoxide desmutase activity being elevated up to 7 weeks.*

*Key words: ontogeny, peroxide oxidation of lipids, antioxidant systems, malonic dialdehyde, recovered glutathione, catalase, superoxide dismutase, brain, ethanol, alcogolization, pregnancy, rats*