

УДК 612.82:612.015.348.577.95

## НАРУШЕНИЕ СИНТЕЗА БЕЛКОВ ПРИ ПОВРЕЖДАЮЩЕМ ДЕЙСТВИИ ЭТАНОЛА В АНТЕНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ НА РАЗВИВАЮЩИЙСЯ МОЗГ

МАЙЗЕЛИС М. Я., ЗАБЛУДОВСКИЙ А. Л., ШИХОВ С. И.

У половозрелых крыс, подвергшихся воздействию этанола в антенатальном периоде, выявлено угнетение синтеза водонерастворимых белков мозга, наиболее выраженное в гиппокампе. Показаны половые различия изменений синтеза белков в результате пренатальных воздействий этанола. Установлены особенности реакции белоксинтезирующей системы мозга на действие экстремальных факторов, а также изменения содержания циклических нуклеотидов в структурах мозга. Отмечен определенный параллелизм изменений условнорефлекторной деятельности и синтеза белков в отделах мозга у опытных животных. Полученные данные обосновывают представление о важной роли нарушений метаболизма белков в ЦНС в механизме повреждающего действия этанола на развивающийся мозг.

Многочисленные клинические данные свидетельствуют о повреждающем действии этанола на развивающийся мозг [1—4]. В экспериментальных исследованиях установлены особенности функции, метаболизма и структуры головного мозга животных, перенесших воздействие этанола в антенатальном периоде. В частности, были показаны нарушения двигательной активности, условнорефлекторной деятельности [5—8], процессов миелинизации и развития мозга [9—11]. Выявлены изменения содержания в мозгу ряда ферментов [12—14], нейромедиаторов [15—16], нарушения белкового метаболизма [17—18]. Однако в большинстве работ авторы ограничивались изучением морфометрических, функциональных и биохимических показателей у плодов, новорожденных или преимущественно на ранних этапах постнатального развития. Мало исследовано влияние этанола, вводимого пренатально, на состояние белкового метаболизма в мозгу животных в позднем онтогенезе.

Целью настоящей работы являлось изучение синтеза белков и некоторых других нейрохимических показателей в разных структурах мозга и сопоставление этих данных с функциональными нарушениями ЦНС у половозрелых крыс, подвергшихся действию этанола в антенатальном периоде.

### Материалы и методы

Крысы-самки с 5-го дня и до конца беременности вместо питьевой воды получали 7° этиловый спирт, кроме того, им дополнительно вводи-

ли желудочным зондом по 1,5—2 мл 40%-ного этанола 2—3 раза в неделю. Ежедневное потребление этилового спирта составляло 3,0—7,0 мл/кг. Опытные и контрольные животные и их потомство находились в одинаковых условиях вивария на стандартном пищевом рационе.

В возрасте 2 месяцев у животных исследовали ряд поведенческих тестов: поведение в «открытом поле», выработку и сохранение условных рефлексов пассивного (УРПИ) и активного (УРАИ) избегания в Y-образном лабиринте или челночной камере.

При исследовании синтеза белков мозга в качестве предшественников использовали меченые аминокислоты ( $^3\text{H}$ -тирозин,  $^{35}\text{S}$ -метионин,  $^{14}\text{C}$ -гидролизат хлореллы), которые вводили внутривентриально за 1 ч до декапитации. Исследовали их включение в суммарные белки различных структур мозга (кора полушарий, гиппокамп, стриатум и хвостатое ядро, мозжечок, продолговатый мозг, гипоталамус, а также в отдельные фракции (водорастворимая, водонерастворимая, растворимая в трилоне X-100), выделенных из тех же структур. Счет радиоактивности проводили на жидкостном сцинтилляционном счетчике Ракбета (LKB). Рассчитывали удельную активность (расп./мин/мг белка) и относительную удельную активность (ОУА) как отношение радиоактивности белка и ТХУ-супернатанта. Содержание циклических нуклеотидов в мозгу определяли с помощью стандартных радиоиммунологических наборов («Amersham»). Результаты исследований обрабатывали статистически, используя непараметрический критерий Вилкоксона, Манна, Уитни. В опытах было использовано 80 белых крыс.

### Результаты и обсуждение

Вес новорожденных животных опытной серии был существенно ниже, чем в контроле, однако к 3 неделям средний вес опытных и контрольных крыс выравнивался. Возможно, это объясняется меньшим числом крыс в каждом помете опытной серии в результате более высокой смертности в постнатальный период. Так, если у контрольных животных к 21-му дню погибло 22% всех родившихся, то у опытных крыс, подвергавшихся воздействию этилового спирта в антенатальном периоде, в первые 3 недели погибло до 40% животных, то есть в 2 раза больше, чем в контрольной группе.

При исследовании включения меченых аминокислот ( $^3\text{H}$ -тирозина,  $^{35}\text{S}$ -метионина,  $^{14}\text{C}$ -гидролизата белка хлореллы) в суммарные белки, выделенные из разных структур мозга, не выявлено существенных различий между животными, подвергавшимися воздействию этанола, и контрольными (рис. 1). У опытных крыс-самцов при использовании разных меченых предшественников разнонаправленные изменения ОУА не превышали 10% по сравнению с контрольными. В аналогичных опытах на крысах-самках во всех структурах мозга обнаруживалась тенденция к активации включения меченых аминокислот в белки ( $p > 0,05$ ).

Можно предположить, что отсутствие существенных изменений синтеза суммарных белков у опытных животных связано с неоднозначными

сдвигами метаболизма белков в отдельных фракциях. Исследование интенсивности включения меченых аминокислот в водорастворимые, водонерастворимые и растворимые в тритоне X-100 белки показало, что изменения синтеза белков в этих фракциях у опытных животных действительно были не всегда однозначны.

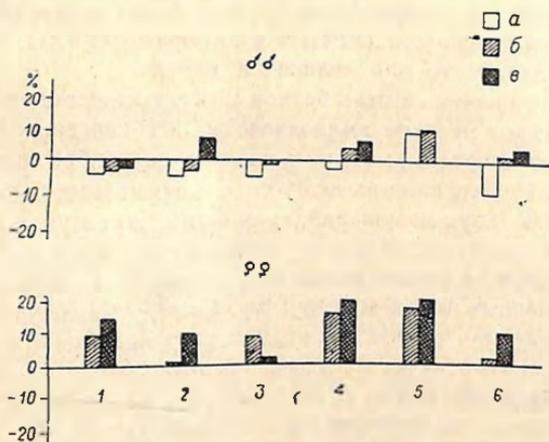


Рис. 1. Изменения включения меченых аминокислот в суммарные белки мозга крыс (в %), перенесших пренатальные воздействия этанола. а— $^{35}\text{S}$ -метионин; б— $^3\text{H}$ -тирозин; в— $^{14}\text{C}$ -гидролизат хлореллы. 1—кора, 2—гиппокамп, 3—базальные ганглии, 4—мозжечок, 5—продолговатый мозг, 6—гипоталамус

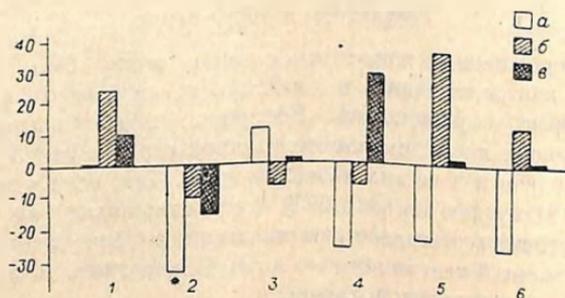


Рис. 2. Изменения включения  $^3\text{H}$ -тирозина во фракции белков мозга крыс-самцов (в %), перенесших пренатальные воздействия этанола. а—водонерастворимые, б—водорастворимые, в—растворимые в тритоне X-100 белки. 1—кора, 2—гиппокамп, 3—базальные ганглии, 4—мозжечок, 5—продолговатый мозг, 6—гипоталамус

На рис. 2 показаны изменения включения  $^3\text{H}$ -тирозина в отдельные фракции белков мозга у крыс-самцов, перенесших воздействие этанола, по сравнению с контрольными. Включение аминокислоты в водонерастворимые белки у опытных животных в большинстве структур снижено. При этом наибольшее угнетение синтеза белков в этой фракции отмечено в гиппокампе (34% при  $p < 0,05$ ). В коре полушарий изменений не

наблюдали, в подкорковых отделах обнаружена незначительная активация включения предшественника. В водорастворимых белках в гиппокампе, подкорковых отделах, мозжечке включение аминокислоты в белки имело тенденцию к снижению (до 10%), а в коре полушарий и продолговатом мозгу отмечалась активация синтеза. Включение предшественника в белки, растворимые в тритоне X-100, было несколько снижено в гиппокампе, а в мозжечке и коре полушарий наблюдали противоположные изменения. Таким образом, у опытных животных изменения синтеза белков были не всегда однонаправлены в отдельных фракциях. При этом обращают на себя внимание следующие факты: для водонерастворимых белков мозга в 4-х из 6 исследованных структур характерно угнетение синтеза, наиболее выраженное в гиппокампе; лишь в этой структуре обнаружены однонаправленные сдвиги—угнетение синтеза во всех группах белков, особенно водонерастворимых.

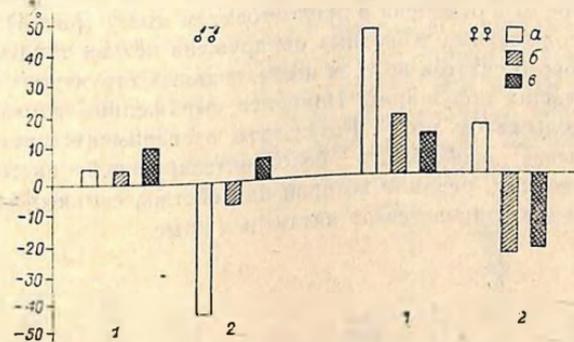


Рис. 3. Изменения включения  $^{14}\text{C}$ -гидролизата хлореллы во фракции белков мозга крыс (%), перенесших пренатальные воздействия этанола. Обозначения те же, что на рис. 2

Учитывая наиболее выраженные изменения белкового метаболизма в гиппокампе, в специальной серии опытов исследовали показатели синтеза белков в этой структуре в разных фракциях с использованием и других меченых аминокислот. В опытах на крысах-самцах с применением  $^{14}\text{C}$ -гидролизата хлореллы (рис. 3) было показано, что у опытных животных наряду с небольшой активацией включения предшественника в белки во всех фракциях в коре полушарий и гиппокампе обнаруживалось угнетение синтеза белков, особенно водонерастворимых, где включение предшественников было снижено на 50%. В аналогичных опытах у крыс-самок, подвергавшихся воздействию этанола, в коре полушарий во всех фракциях, особенно в водонерастворимых белках, отмечалась некоторая активация синтеза белков, однако в гиппокампе включение меченых предшественников в водо- и тритонрастворимые белки было снижено.

Приведенные результаты подтверждают данные, полученные в опытах с  $^3\text{H}$ -тирозином, и указывают на определенные различия изменений синтеза отдельных групп белков в разных отделах мозга животных, пе-

ренесших пренатальные воздействия этанола. При этом следует подчеркнуть, что из всех исследованных структур мозга у опытных животных наибольшее угнетение синтеза белков обнаружено в гиппокампе. Установлены половые различия изменений синтеза белков у животных, подвергавшихся воздействию этанола в эмбриогенезе: более значительные нарушения наблюдались у крыс-самцов.

Исходя из положения о том, что во многих случаях патология, не выявляемая в обычных условиях, может быть обнаружена при определенных функциональных нагрузках, в специальной серии экспериментов исследовали влияние стресса, вызванного комбинированным действием шума и вибрации в течение 1 ч, на включение  $^3\text{H}$ -лизина в суммарные белки разных отделов мозга. Было установлено, что реакция на стресс у животных обеих групп имеет существенные различия. Для интактных крыс характерно увеличение включения  $^3\text{H}$ -лизина в белки во всех структурах, кроме коры полушарий, при этом наибольшая активация синтеза белков отмечена в продолговатом мозгу (рис. 4). В отличие от этого у подопытных животных обнаружена четкая тенденция к снижению белкового синтеза во всех исследованных структурах мозга, кроме коры большого полушарий. Наиболее выраженные изменения отмечены в продолговатом мозгу. Результаты экспериментов указывают на функциональные особенности белоксинтезирующей системы мозга опытных животных, реакция которой на действие сильных раздражителей существенно отличается от интактных крыс.

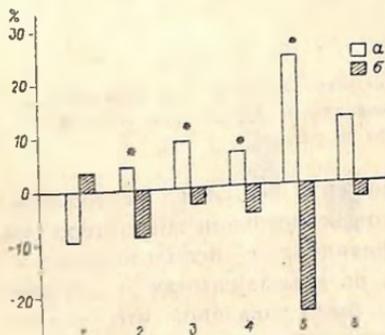


Рис. 4. Изменения включения  $^3\text{H}$ -лизина в суммарные белки отделов мозга крыс (в %) при стрессе. а—контроль, б—этанол анте-лат, 1—кора, 2—гиппокамп, 3—базальные ганглии, 4—мозжечок, 5—продолговатый мозг, 6—гипоталамус

Как известно, в регуляции синтеза РНК и белков принимают участие циклические нуклеотиды [19, 20]. С учетом этого определяли уровень сАМР и сGMP в структурах мозга подопытных и контрольных животных. Результаты исследований выявили существенные различия содержания циклических нуклеотидов в отделах мозга у опытных крыс по сравнению с контролем. При этом у крыс-самцов уровень сАМР во всех исследованных отделах мозга—коре полушарий, гиппокампе, мозжечке—был снижен, а у самок—достоверно увеличен (рис. 5).

Содержание сGMP в мозгу подопытных крыс-самок было повышено по сравнению с контрольными, а у самцов в разных отделах моз-

та изменения были неодинаковы: в коре полушарий отмечалась достоверная активация, а в мозжечке — снижение уровня сGMP (рис. 6).

Таким образом, изменения в содержании циклических нуклеотидов, в особенности сАМР, имеют определенное сходство с показателями синтеза белков в мозгу у опытных животных разного пола, хотя оценить конкретную роль этих изменений представляется затруднительным.

Результаты проведенных опытов свидетельствуют о значительных нейрохимических сдвигах в мозгу половозрелых животных, перенесших пренатальные воздействия этанола. У них выявлены определенные нарушения синтеза белков в ЦНС, носящие не тотальный, а избирательный характер. Угнетение синтеза не обнаруживалось в суммарных белках, выделенных из разных структур, но четко определялось в водонерастворимой фракции большинства отделов мозга. Как известно, эта фракция включает не только структурные белки мембран, но и часть локализованных в них и связанных с мембранами ферментов.

Особого внимания заслуживают данные о половых различиях в синтезе белков и содержании циклических нуклеотидов в результате воздействия этанола в пренатальном периоде. Эти факты прямо указывают на большую ранимость к действию этилового алкоголя развивающейся белоксинтезирующей системы мозга крыс-самцов и, по-видимому, отражают общую биологическую закономерность.

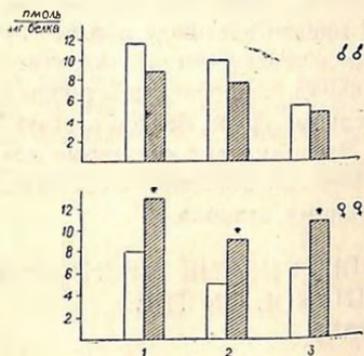


Рис. 5

Рис. 5. Содержание сАМР (пмоль/мг белка) в мозгу крыс, перенесших пренатальные воздействия этанола. а—контроль, б—этанол антенат, 1— кора, 2—гиппокамп, 3—мозжечок

Рис. 6. Содержание сGMP (пмоль/мг белка) в мозгу. Обозначения те же, что на рис. 5

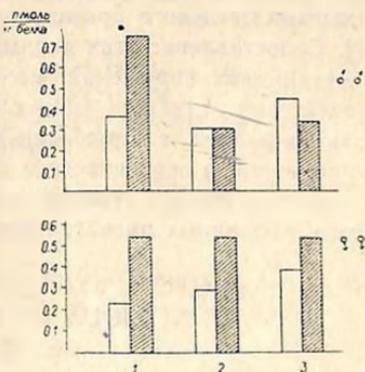


Рис. 6

Обращает на себя внимание тот факт, что нарушения белкового метаболизма у подопытных животных особенно рельефно выявились при использовании экстремальных факторов в качестве функциональных нагрузок. Так, если в нормальных условиях не удалось установить достоверных изменений синтеза суммарных белков у подопытных животных, то в условиях стресса у них обнаружены статистически значимые различия синтеза белков в 4-х из 6 исследованных церебральных

структур по сравнению с реакцией контрольных животных на такие же воздействия. Полученные данные указывают на целесообразность применения функциональных нагрузок при изучении состояния белоксинтезирующей системы мозга в условиях патологии.

Выявленные изменения синтеза белков мозга у животных, перенесших пренатальные воздействия этанола, сопоставлялись с особенностями условнорефлекторной деятельности. В 2-месячном возрасте у подопытных и контрольных животных исследовали скорость выработки и сохранение УРПИ и УРАИ. При этом у опытных крыс были выявлены определенные изменения высшей нервной деятельности. Следует отметить, что были нарушены не все, а наиболее сложные формы обучения. Так, показатели УРПИ, являющегося относительно простой формой обучения, у опытных животных были не изменены, в наибольшей степени патология выявлялась при использовании условных рефлексов двустороннего избегания. Более выраженные нарушения условнорефлекторной деятельности были отмечены у опытных крыс-самцов.

Полученные результаты свидетельствуют об определенных особенностях выработки и сохранения УРАИ у подопытных животных, что коррелирует с нарушениями синтеза белков в структурах мозга. В этой связи особое значение имеет тот факт, что наиболее выраженное угнетение синтеза белков у опытных крыс наблюдали в гиппокампе—структуре, которая, по современным представлениям, является одним из ключевых звеньев в организации консолидации временных связей [23, 24]. Сопоставление этих данных позволяет прийти к выводу о том, что в механизмах нарушений высшей нервной деятельности в результате воздействия этилового спирта в антенатальном периоде существенная роль принадлежит нарушению синтеза отдельных групп белков в структурах мозга, в особенности в гиппокампе. Это намечает некоторые новые пути подхода к терапии отдельных форм врожденной патологии мозга, вызванных пренатальными воздействиями этанола.

## ROLE OF PROTEIN SYNTHESIS DISORDERS IN THE MECHANISM OF NOXIOUS EFFECT OF ETHANOL ON THE DEVELOPING BRAIN

MAIZELIS M. Ya., ZABLUDOVSKY A. L., SHIKHOV S. N.

Institute of Psychiatry, RSFSR Health Ministry, Moscow

The inhibition of insoluble brain proteins synthesis has been detected in the brain, especially in hippocampus, of the mature rats prenatally exposed to ethanol (this process is sex-dependent). Some peculiarities of the response of the brain protein-synthesizing system to extremal conditions and to the alteration of the brain cyclic nucleotides content are established. A certain correlation between changes in the conditioned reflex activities and protein synthesis in the brain are revealed. Data obtained confirm the significance of CNS protein metabolism disorders in the mechanism of noxious effect of ethanol on the developing brain.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Шурыгин Г. И. Педиатрия. 11, 71—73, 1974.
2. Усова Е. В., Сазонова Н. С., Рассадина З. А. Ж. невропат. и психиатр., 10, 1552—1556, 1981.
3. Дульнев В. Д. Влияние хронического алкоголизма родителей на развитие нервной системы у потомства. Автореф. канд. дис. М., 1964.
4. Omenn G. S., Dixon R., Ball J.—In: The Fetal Alcohol Syndrome, Wash. p. 23—31, 1979.
5. Малаховский В. Г., Прозоровский В. Б. Фармакол. и токсикол., 38, 88—90, 1975.
6. Чаленков С. И. Труды Смолен. мед. ин-та, 31, с. 15—21, 1970.
7. Bond N. W. Psychol. Reports, 41, 3, 1269—1270, 1977.
8. Abel E. L. Pharmacol. Bioch. Behav., 10, 2, 239—243, 1979.
9. Попова Э. Н., Фрумкина Л. Е. Ж. невропат. и психиатр., 7, 1059—1062, 1960.
10. Druse M. J., Hofteig J. H. Drug. Alcohol Depend., 2, 5—6, 421—428, 1977.
11. Rasmussen B., Christensen N. Acta path. et microbiol. Scand., A 88, 285—289, 1980.
12. Куниковская Л. С. Клиника, патогенез и лечение алкоголизма, Кишинев, с. 112—114, 1973.
13. Thadani P., Pushpa V., Slotkin T. A., Schanberg S. Neuropharmacol., 16, 289—293, 1977.
14. Kornguth S. F. Brain Res., 177, 2, 347—360, 1979.
15. Ellis J., Krstak M., Poschlova N. Activ. Nerv. super., 18, 3, 220—221, 1976.
16. Lan C., Thadani P. V., Schanberg S. M. Neuropharmacol. 15, 505—507, 1976.
17. Ravat A. K. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol., 12, 723—732, 1975.
18. Khawaja G. A., Wallgren H., Usmt H., Hilsko P. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharm., 22, 3, 573—580, 1978.
19. Daly J.—In: Cyclic nucleotides in the nervous system, Pl. Press., 1977.
20. Хачатрян Г. С. Вопросы биохимии мозга, 13, с. 206—220, 1978.
21. Воронин Л. Г., Семенова Т. П. Ж. высш. нерв. деят., 4, 574—582, 1968.
22. Виноградова О. С. Гиппокамп и память, М., 1975.

Московский НИИ психиатрии МЗ РСФСР

Поступила 27. IX 1982