

Министерство здравоохранения Республики Беларусь

УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«ГРОДНЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ»

С. М. ЗИМАТКИН
Е. И. БОНЬ

**НАРУШЕНИЯ В МОЗГЕ ПРИ
АНТЕНАТАЛЬНОЙ АЛКОГОЛИЗАЦИИ**

Монография

Гродно
ГрГМУ
2017

УДК 612.821.44:618.33
ББК 57.162./2:56.145.1/
3-62

Рекомендовано Редакционно-издательским советом ГрГМУ (протокол № 14 от 14 декабря 2016 г.).

Авторы: д-р биол. наук, проф. С. М. Зиматкин;
аспирант каф. гистологии, цитологии и эмбриологии Е. И. Бонь.

Рецензенты: проф. кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии УО «Гродненский государственный медицинский университет», д-р биол. наук, проф. Я. Р. Мацюк;
зам. директора по научной работе ГП «Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси»,
д-р биол. наук, доц. П. С. Пронько.

Зиматкин, С. М.

3-62 Нарушения в мозге после антенатальной алкоголизации : монография / С. М. Зиматкин, Е. И. Бонь. – Гродно : ГрГМУ, 2017. – 192 с.
ISBN 978-985-558-828-4.

Монография посвящена нарушениям в мозге, возникающим под воздействием алкоголя в период внутриутробного развития. В ней изложены современные представления и данные собственных исследований о гистологических, гистохимических и молекулярных нарушениях в коре головного мозга при антенатальной алкоголизации.

Книга предназначена для научных сотрудников, врачей-педиатров и неонатологов, студентов медицинского и биологического профиля, аспирантов, врачей, всех тех, кто работает в области экспериментальной биологии и медицины, нейропатологии, педиатрии, неонатологии, наркологии и биомедицинского исследования алкоголизма.

УДК 612.821.44:618.33
ББК 57.162./2:56.145.1/

ISBN 978-985-558-828-4

© Зиматкин С. М., Бонь Е. И., 2017
© ГрГМУ, 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
Глава 1	
ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ И НЕВРОЛОГИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ	8
Глава 2	
НАРУШЕНИЯ НЕЙРОВИЗУАЛЬНЫХ ПАРАМЕТРОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА	17
Глава 3	
ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В МОЗГЕ ПОСЛЕ АНТЕНАТАЛЬНОЙ АЛКОГОЛИЗАЦИИ	26
ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В КОРЕ МОЗГА КРЫС, ПОДВЕРГАВШИХСЯ АНТЕНАТАЛЬНОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ АЛКОГОЛЯ	36
Глава 4	
УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В МОЗГЕ ПОСЛЕ АНТЕНАТАЛЬНОЙ АЛКОГОЛИЗАЦИИ	53
Глава 5	
КЛЕТОЧНЫЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ АЛКОГОЛЬНОГО ПОРАЖЕНИЯ МОЗГА ПЛОДА.....	69
Глава 6	
ПАТОГЕНЕЗ НАРУШЕНИЙ В МОЗГУ ПРИ АНТЕНАТАЛЬНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ АЛКОГОЛЯ	109
Глава 7	
ПРОФИЛАКТИКА И ЛЕЧЕНИЕ ПОСЛЕДСТВИЙ АНТЕНАТАЛЬНОЙ АЛКОГОЛИЗАЦИИ	127
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	147
ЛИТЕРАТУРА	150
ПРИЛОЖЕНИЕ 1	175
ПРИЛОЖЕНИЕ 2	179

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АДГ	–	алкогольдегидрогеназа
АДФ	–	аденозиндифосфат
АльдГ	–	альдегиддегидрогеназа
ГрЭС	–	гранулярная эндоплазматическая сеть
МРС	–	магнитно-резонансной спектроскопии
МРТ	–	магнитно-резонансная томография
ОФЭКТ	–	одnofотонная эмиссионная компьютерная томография
ПЭТ	–	позитронно-эмиссионная томография
СФ	–	синаптофизин
ФАС	–	фетальный алкогольный синдром
ЦНС	–	центральная нервная система
ЭЭГ	–	электроэнцефалография
СЗГ	–	цианидин-3-глюкозид
CDC	–	Centers for Disease Control and Prevention
CNTF	–	цилиарный нейротрофический фактор
DCX	–	даблкортин
DHM	–	дегидромецитин (Dihydromyricetin)
FASD	–	спектр нарушений плода, вызванных алкоголем (fetal alcohol spectrum disorders)
IGF	–	инсулиноподобный фактор роста
IGF	–	инсулиноподобный фактор роста
IOM	–	Institute of Medicine
NeuN	–	нейрональный ядерный белок
NT3	–	нейротропин 3

ВВЕДЕНИЕ

Существует закономерность, по которой ранние повреждения нервной системы имеют более тяжелые последствия для развития ребенка, чем поздние. Среди факторов, нарушающих нормальное течение беременности и влияющих на формирование разного рода девиаций у ребенка, особое место занимает употребление женщиной алкоголя во время беременности. Развернутая клиническая картина, возникающая у плода вследствие внутриутробного воздействия алкоголя, носит название фетального алкогольного синдрома. Впервые термин «фетальный алкогольный синдром» (ФАС) был введен в 1968 г. французским педиатром Паулом Лемоином, обследовавшим 127 детей, матери которых страдали алкоголизмом, и описавшим выявленные нарушения [Lemoine, 1968. Les enfant; Lemoine, 2012]. ФАС – комплекс невральных и экстраневральных аномалий, проявляющихся анте- или постнатальным поражением нервной системы и нарушением роста тела, встречается у младенцев, матери которых употребляли алкоголь во время беременности. Спектр алкогольных нарушений плода (FASD) – термин, раскрывающий диапазон последствий, возможных у ребенка, мать которого употребляла алкоголь во время беременности. Эти последствия могут включать физические, умственные, поведенческие ограничения и/или ограничения в обучении с возможными пожизненными последствиями [Пальчик, 2013]. Кроме того, FASD является одной из причин внезапной смерти младенцев, вызванной значительными повреждениями внутренних органов [Tangsermkijisakul, 2016]. В 1973 г. К. L. Jones, и соавторы впервые систематически исследовали особенности нарушений у детей, матери которых злоупотребляли алкоголем во время беременности, используя для выявляемого специфического паттерна нарушений название «Фетальный алкогольный синдром» [Jones, 1973. Pattern]. Это положило начало исследованиям и разработке специализированной помощи таким детям и профилактике ФАС в США и других странах. На сегодняшний день имеется значительное число научных и практических публикаций по данному вопросу как в медицинской литературе, так и в смежных дисциплинах [Зиматкин, 2014].

Пренатальное воздействие алкоголя является одной из основных причин поведенческих и когнитивных нарушений у детей, вызывает широкий спектр неблагоприятных последствий для развития

плаценты и всех внутренних органов плода. Во время беременности плацентарный барьер не препятствует прохождению этанола, который вызывает множественные нарушения в организме плода [Gabriel, 1998. The hormonal]. Плод абсолютно не защищен от губительного действия алкоголя, так как у него не развиты этанолметаболизирующие ферментные системы, а также другие механизмы защиты [Кузнецов, 1988].

На важность и актуальность проблемы антенатальной алкоголизации указывают весьма тревожные эпидемиологические данные. Распространенность ФАС в мире колеблется в диапазоне от 0,2 до 2,0 на 1000 новорожденных, в зависимости от расы, населения, социально-экономического статуса и т.д. Менее выраженные фетальные алкогольные эффекты отмечены с частотой 1 на 300 живорожденных [Пальчик, 2013; May, 2001]. Хотя, по другим данным, в среднем в мире 15 детей на 1000 новорожденных имеют диагноз ФАС [Feshbach, 1995].

В странах Северной Америки, где детально разрабатываются проблемы ФАС, показано, что в семьях американских индейцев ФАС встречается с частотой 8,5 на 10000 новорожденных, а в семьях индейцев Канады – до 190 на 10000 новорожденных. В семьях, где есть один ребенок с ФАС, у последующих детей заболевание встречается с вероятностью 771:1000 [Пальчик, 2013].

Распространенность и характеристики FASD были оценены среди 747 учеников первых классов в Южной Африке. Распространенность FASD (на 1000) выглядит следующим образом: ФАС – от 59,3 до 91,0; частичный фетальный алкогольный синдром (ПФАС) – от 45,3 до 69,6, связанные с алкоголем нервные расстройства (ARND) – от 30,5 до 46,8. Общий уровень FASD – от 135,1 до 207,5 на 1000 (или от 13,6 до 20,9%). Проявления дизморфии среди детей: ФАС = 18,9; ПФАС = 14,3; ARND = 12,2. Потребление алкоголя во время беременности значительно коррелирует с нарушениями вербального ($r = -0,253$) и невербального интеллекта ($r = -0,265$), негативным поведением ($r = 0,203$) [May, 2012. Approaching].

В России с ФАС в среднем рождается 15 детей на 1000 новорожденных [Feshbach, 1995]. Обследование педиатрами 2352 детей в специальных сиротских приютах Москвы (83% от числа детей, находящихся в этих учреждениях) выявило 186 (7,9%) детей с ФАС. Исследование, проведенное в домах ребенка в Мурманске, показало, что 13% детей имели ФАС, и у 45% детей отмечались

другие проявления FASD. В специализированном неонатологическом стационаре в 2005 г. грудные дети с ФАС составили 3,5%. Исследование распространенности ФАС в условиях observationalного родильного дома показали, что частота диагностирования ФАС на 1000 новорождённых составила в этом учреждении: в 2003 г. – 2,7, в 2004 г. – 1,17, в 2005 г. – 3,62 [Пальчик, 2006], а в 2007 г. – 2,4 [Пальчик, 2013]. В специализированном неонатологическом стационаре в Москве в 2005 г. грудные дети с ФАС составили 3,5% [Пальчик, 2013].

Распространенность употребления алкоголя российскими беременными женщинами, по разным оценкам, составляет 2,7-20,3%, в Ирландии – 82%, в США – 2-10% [Пальчик, 2013].

В Беларуси уровень потребления абсолютного алкоголя на душу населения составляет 17 л на душу населения в год. Распространенность проявлений алкогольного синдрома плода среди детей в возрасте 7-9 лет – 7 случаев на 1000 детского населения или 0,7%. Количество новых случаев алкогольного синдрома плода (инцидент) в год: $0,7\%/2 * 100000 = 350$ детей в год. Количество детей в возрасте до 14 лет включительно с проявлениями алкогольного синдрома плода: $14 \text{ лет} * 350 \text{ детей} = 4900$ детей. На каждый потребленный литр абсолютного алкоголя на душу населения в год приходится 20,59 вновь родившихся детей с ФАС, или 0,2059% от общего количества родившихся [Осипчик, 2014].

Особо опасно потребление алкоголя в период после зачатия, однако во II и III триместрах беременности употребление алкоголя не является безвредным, так как ассоциировано с дальнейшими когнитивными и поведенческими нарушениями у ребенка [Пальчик, 2013].

Глава 1

ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ И НЕВРОЛОГИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ

Результаты обследования детей, перенёсших антенатальную алкоголизацию

Нарушения интеллектуальной сферы. У детей с ФАС, обследованных в период между 1973 и 1996 гг., средний IQ был 65,73 с диапазоном от 20 до 120. Дети, перенёсшие умеренное воздействие алкоголя на плод, по всей видимости, имеют более высокий IQ, чем дети с классическим ФАС, но и эти показатели находятся в диапазоне умственной отсталости [Mattson, 1997]. При этом у подростков с ФАС результаты IQ оставались неизменными в течение 8 лет, что свидетельствует о долгосрочности последствий пренатального повреждения мозга алкоголем. У 54,1% детей с ФАС впоследствии обнаруживалась олигофрения (слабоумие) [Разводовский, 2005].

В другом исследовании принимали участие 80 детей: 23 с диагнозом FASD и 57 здоровых. После обследования на FASD и антропометрии, детям проводили тестирование общего интеллекта (WISC-R), невербального интеллекта (Raven, Цветные матрицы), понимания речи (Rustioni), академической успеваемости (IPDA) и проблем поведения (расстройство агрессивного поведения, Rating Scale). У детей с диагнозом FASD были более низкие показатели, чем в контрольной группе, по вербальному интеллекту и полной шкале IQ, невербальному интеллекту, пониманию речи и академической успеваемости. Кроме того, дети с FASD более невнимательны и гиперактивны. Также были выявлены значимые корреляции между окружностью головы, дисморфией и данными WISC-R теста [Akers, 2011. Fetal].

Нарушения внимания, памяти и других когнитивных функций. У людей с FASD замедлен процесс обработки информации и наблюдаются нарушения внимания как в младенчестве, так и в зрелом возрасте. Исследование когнитивных функций, таких как речь, зрительное восприятие, память и обучение, социальное функционирование, показало, что у лиц с FASD имеется дефицит в обработке и интеграции информации [Kodituwakku, 2009, 2007], часто наблюдаются гиперактивность, дефекты внимания и торможения [Lugo, 2006].

Для изучения дефицита объема рабочей памяти у детей с FASD использовали компьютеризированный нейропсихологический тест CANTAB®. Были протестированы 24 ребенка с FASD и 26 здоровых детей. У детей с FASD установлен дефицит в области функционирования исполнительной, рабочей памяти и внимания. С течением времени, по мере роста ребенка, с младенчества до юности и в зрелом возрасте некоторые из когнитивных и поведенческих проявлений FASD или все они проявлялись более или менее ярко [O'Leary, 2012, Mattson, 1997].

У людей, перенесших пренатальную алкоголизацию, замедлен процесс обработки информации и наблюдаются нарушения внимания как в младенчестве, так и в зрелом возрасте. Исследование когнитивных функций, таких как речь, зрительное восприятие, память и обучение, социальное функционирование, показало наличие у них дефицита в обработке и интеграции информации, часто наблюдаются гиперактивность, дефекты внимания и торможения [O'Leary, 2012].

При FASD основным симптомом поведенческих нарушений является познавательная дисфункция. Без раннего вмешательства последствия FASD необратимы [Stevens, 2015; Зиматкин, 2016].

Нарушения эмоциональной сферы. В Западной Австралии было проведено исследование для установления связи между дозой, структурой и сроком пренатального воздействия алкоголя и поведенческими нарушениями у детей в возрасте двух лет и старше. 10% женщин из случайной выборки (N=2224), родивших живого ребенка (в 1995-1996 гг.) были приглашены для участия в 8-летней программе исследования, 85% из них наблюдались со 2-го года, 73% – в течение 5 лет и 61% – 8 лет. Потребление алкоголя определяли путем суммирования общей дозы и частоты приема с учетом реалистичных моделей употребления алкоголя. Анализ был проведен с использованием обобщенных оценочных уравнений. Установлено, что низкие пренатальные дозы алкоголя не связаны с проблемами дальнейшего поведения ребенка. После тяжелого воздействия алкоголя в первом триместре беременности впоследствии у детей возрастала частота проявления тревоги/депрессии и соматических жалоб. Умеренный уровень воздействия алкоголя также повышал вероятность проявления тревоги/депрессии [O'Leary, 2012].

Эмоциональные нарушения (депрессивные состояния), повышенная возбудимость, агрессивность, склонность к риску являются характерными расстройствами при ФАС [Разводовский, 2005].

Нарушения социального взаимодействия. Для изучения способности к социальному взаимодействию было проведено обследование 20 детей с FASD (средний возраст – 12,6 лет) и 23 здоровых детей (средний возраст – 12,5 лет), которые решали задачи теста Shure и Spivak (1985), где дается оценка решения задач в соответствии с построением межличностных взаимодействий. У детей с FASD выявлено снижение способности к решению таких задач [Streissguth, 1991].

В связи с нарушением внимания ФАС часто ошибочно диагностируют как гипердинамический синдром. Разница состоит в том, что дети с гипердинамическим синдромом демонстрируют сложности с фокусированием и удержанием внимания, в то время как дети с ФАС испытывают сложности с переключением внимания с одного объекта на другой [Разводовский, 2005].

У детей с ФАС разного возраста проводилась оценка социального поведения, когнитивных функций и решения задач, связанных с межличностным и половым взаимодействием. В ходе исследования было выявлено, что дети младшего возраста показывают лучшие показатели в выполнении заданий, связанных с когнитивными функциями [Brown, 2015. Social Perspective].

Дети, перенесшие пренатальное воздействие алкоголя, испытывают впоследствии трудности в межличностном общении и социальном взаимодействии, также у них снижена эмпатия (способность сопереживать друг другу) [Stevens, 2012].

Нарушения поведения в подростковом возрасте и у взрослых. Пренатальное воздействие алкоголя вызывает у людей стойкие расстройства социального и полового поведения, повышает риск формирования никотиновой зависимости [Coles, 2015. Dose and Timing]. В подростковом возрасте у детей с ФАС становятся выраженными нарушения социализации, трудности в общении со сверстниками [Mattson, 1998]. У взрослых с ФАС могут проявляться следующие расстройства: умственная отсталость, шизофренические симптомы, синдром дефицита внимания с гиперактивностью, расстройства обучения, трихотилломания, биполярное расстройство и импульсивное поведение [Vingan, 1986]. По мере взросления на первый план выходит также церебростенический синдром с вы-

раженными нарушениями функции внимания, памяти, двигательной расторможенностью, агрессивностью, асоциальным поведением, бродяжничеством [Разводовский, 2005].

Аномалии полового поведения. В ряде исследований показана связь между аномалиями полового поведения и дисфункциями головного мозга. Внутриутробное воздействие алкоголя является одним из возможных объяснений возникновения нейрофизиологических отклонений, парафилии и сексуально агрессивного поведения [Abel, 1980; Williams, 1999].

Нарушения пищевого поведения. Дети с FASD имеют расстройства пищевого поведения. Исследовали 19 детей с диагнозом ФАС (11 мальчиков, 8 девочек), средний возраст 9,6 лет. 50% девочек имели избыточный вес или страдали ожирением, в то время как 37% мальчиков имели недостаточный для их возраста вес или рост. К нарушениям пищевого поведения были отнесены постоянные перекусы, неупорядоченные приемы пищи (36,8%), отсутствие сытости (26,3%) и разборчивости в еде/плохой аппетит (31,6%), запоры (26,3%), чрезмерное потребление сахара у 57% испытуемых. При этом отсутствие сытости, возможно, связано с нарушением регуляторных систем, а запор может отражать низкое потребление клетчатки или дисфункцию пищеварительной системы [Werts, 2014].

Нарушения исполнительных функций. Для FASD характерны нарушения исполнительных функций – психологических процессов, участвующих в управлении целенаправленным поведением. Для оценки компонентов исполнительных функций, в частности движения глаз, были разработаны специальные задачи. По сравнению с контрольной группой у детей с FASD реакция была замедлена, наблюдались ошибки направления. Эти результаты отражают дефицит исполнительных функций и связаны с дисфункцией лобных долей, возможно, из-за нарушений тормозных процессов [Green, 2004].

У детей с FASD наблюдается дефект в мозжечковой обработке информации, схожий с тем, что возникает при дислексии. Это функциональный дефицит, связанный с ограниченными возможностями в обучении [Coffin, 2005].

У лиц с агенезией или повреждением мозолистого тела наблюдаются дефекты бимануальной координации, особенно когда задача выполнялась без визуальной обратной связи. Для оценки скорости и точности движений в задаче, где обе руки должны коор-

динированно вести курсор по угловым линиям, был использован тест на бимануальную координацию. Он дает представление о межполушарных взаимодействиях и о способности координированной деятельности двух полушарий посредством мозолистого тела. В ходе данного исследования были протестированы 21 ребенок с FASD и 17 здоровых детей. При прохождении испытаний с обратной визуальной связью дети с FASD действовали медленнее, чем контрольная группа, но были одинаково точны. В отсутствие визуальной обратной связи дети с FASD были значительно менее точными в прохождении отдельных углов, которые считаются особенно чувствительными к межполушарным взаимодействиям [Roebuck, 2002].

Исследования на животных

Когнитивные нарушения. При FASD основным симптомом поведенческих нарушений является познавательная дисфункция. Последствия пренатального воздействия алкоголя включают нарушения внимания и когнитивных процессов [Brys, 2014].

Исследования на морских свинках показали, что те из них, кто подвергся внутриутробному воздействию этанола, совершают больше ошибок при прохождении лабиринта и чаще, чем животные контрольной группы, заходят в тупики.

В другом эксперименте крысы получили раствор этанола (5,25 г/кг в сутки через зонд) на 4-9 день после рождения (период, эквивалентный третьему триместру беременности у человека). В подростковом возрасте (35-38-й день) эти крысы и контрольная группа животных прошли обучение в лабиринте Морриса. Животные, употреблявшие этанол, показали нарушения в пространственной ориентации и в процессе обучения. Эти данные подтверждают, что раннее послеродовое воздействие этанола у крыс вызывает длительные стойкие дефекты когнитивных функций. При исследовании поведения крысят в возрасте трёх месяцев, подвергшихся антенатальному воздействию этанола, были отмечены нарушения способности к обучению [Abel, 1983].

Сенсомоторные и эмоциональные нарушения. Антенатальная алкоголизация вызывает задержку сенсомоторного и эмоционального развития крысят [Hard, 1985]. На десятый день с момента рождения у детенышей морских свинок, потреблявших этанол, было выявлено повышение спонтанной двигательной активности.

В другом исследовании беременные мыши имели свободный доступ к 10% раствору этанола. У их взрослого потомства впоследствии были выявлены нарушения координации движений и ориентации в пространстве, сенсорные дефекты [Marquardt, 2014].

Сочетанное действие этанола и стресса в пренатальном периоде вызывает предрасположенность к развитию обсессивно-компульсивных расстройств [Морозова, 2010]. Перинатальное воздействие этанола привело к возникновению депрессивных и тревожных расстройств поведения у взрослых крыс без ущерба для их двигательной активности [Brocardo, 2012. Anxiety].

При исследовании поведения крысят, подвергшихся антенатальному воздействию этанола, на 17-й день после рождения у них наблюдалось снижение двигательной активности в «открытом поле» и реакции пассивного избегания [Abel, 1982], а в возрасте трёх месяцев – значительное снижение показателя поведенческой реакции «челночного избегания» (в 4 раза) [Williams, 1999].

Крысы, подвергавшиеся антенатальной алкоголизации, демонстрировали низкую двигательную активность, усиленное пассивно-оборонительное поведение в открытом поле и депрессивно-подобные черты поведения в условиях неизбегаемого плавания [Айропетянц, 1987. Нарушения; Коломейцева, 1989]. У животных, подвергшихся пренатальному воздействию умеренных доз этанола, отмечались нарушения координации движений и реакции на стресс [Valenzuela, 2012. Dose.].

Крысы на 4-9 или 7-9 дни после рождения, что эквивалентно третьему триместру беременности у человека, подвергались воздействию этанола в дозе 5,25 г/кг, или 4,66 г/кг в день. Затем им предлагали задачи, отражающие состояние ствола мозга, мозжечка, гиппокампа и префронтальной коры. Крысы, получавшие этанол в более высоких дозах (5,25 г/кг в день), делали больше ошибок в решении задач, чем те, которые получили более низкие дозы (4,66 г/кг в день) [Coffin, 2005; Murawski, 2012. Effect.].

Исследования на крысах показали, что потребление этанола во время беременности способствует усилению тревожного поведения. Уровень тревоги определяли в специальном лабиринте. С помощью электрофизиологических методов оценивали синаптическую передачу в глутаматергических и ГАМКергических нейронах базолатеральной миндалины, области мозга, играющей важную роль в формировании эмоционального поведения. Анализ поведе-

ния крыс в лабиринте показал повышенный уровень тревоги и пассивной агрессии. Электрофизиологические измерения показали увеличение частоты спонтанных возбуждающих постсинаптических токов в пирамидных нейронах в опытной группе [Vaculis, 2015].

Пренатальное воздействие этанола приводит к возникновению депрессивных и тревожных расстройств поведения у взрослых крыс [Brocardo, 2012. Anxiety].

Нарушения социального поведения. Среди главных негативных последствий, связанных с воздействием этанола во время эмбрионального развития, находятся стойкие дефекты социального поведения. У пренатально алкоголизированных крыс были выявлены: дефицит социального взаимодействия с другими особями, нарушение ориентации в пространстве, повышенная агрессивность. Данные изменения свидетельствуют о нарушениях вентролатеральной фронтальной коры мозга. Эти поведенческие дисфункции сохраняются у крыс и в зрелом возрасте (10-11 месяцев) [Hamilton, 2014]. Нарушения социального и полового поведения у потомства животных, потреблявших алкоголь во время беременности, отмечали и другие исследователи [Айропетянц, 1987. Нарушения; Коломейцева, 1989, 1985; Hamilton, 2014; Hard, 1985].

Аквариумные рыбки Данио рерио естественно формируют социальные группы. Икра Данио рерио была помещена в растворы этанола разных концентраций (0.00, 0.25, 0.50, 0,75 и 1.00 %) на 24 часа после оплодотворения. У молодых взрослых рыб, появившихся из этой икры, наблюдалось ослабление социального поведения, они медленно формировали группы, что связано с нарушением отделов ЦНС, отвечающих за социальное поведение [Gerlai, 2015].

Предпочтение этанола в условиях свободного выбора. У потомства животных, потреблявших этанол во время беременности, отмечалась повышенная склонность к злоупотреблению психоактивными веществами. Это связано с дефектами нейромедиаторных систем, нейромодуляторов и/или синаптической пластичности в нескольких областях мозга [Valenzuela, 2012].

В одном из экспериментов самок крыс на протяжении всего периода беременности подвергали воздействию алкоголя (4,5 г/кг в день, внутривентрикулярно) в виде коньяка, виски и 40% раствора ректификованного этилового спирта, затем на протяжении 4 месяцев оценивали развитие их потомства. Раствор спирта индуцировал

резкое увеличение потребления алкоголя в условиях свободного выбора при первичном (в 3,3 раза) и повторном (в 2,6 раза) тестировании крысят. Напротив, коньяк и виски не повлияли на размеры добровольного потребления алкоголя при первичном тестировании или способствовали значительно менее выраженному его увеличению (на 54-58%) при повторном тестировании [Нужный, 2003. Сравнительное].

В другом исследовании беременным морским свинкам предоставляли постоянный доступ к 5% водному раствору этанола, подслащенному сахарозой (1 г/л), а контрольные животные пили только воду, подслащенную сахарозой (1 г/л), в течение беременности. При тестировании детенышей на предпочтение этанола на 40-й день после рождения у них наблюдалось повышенное предпочтение раствора этанола [Shirasaka, 2011]. Крысы в возрасте 45 дней, перенесшие антенатальное воздействие алкоголя, обнаруживают повышенное потребление алкоголя в условиях свободного выбора [Reyes, 1984].

Генетические различия в потреблении этанола и устойчивости к нему могут приводить к различиям в его воздействии на плод. У потомков крыс линии ANA (отвергающих этанол) при приеме самкой 5-10% раствора этанола на протяжении всей беременности были выявлены нарушения поведения и сна, в то время как у крыс AA (предпочитающих этанол) эти нарушения отсутствовали [Hilakivi, 1986]. Эмбриотоксическое и тератогенное воздействие этанола обнаруживается только у потомства животных, отвергающих этанол [Haddad, 1982] или низкоустойчивых к нему [Омельянчик, 1987].

Нарушения сна. Внутриутробное воздействие алкоголя нарушает цикл сна – бодрствования у крыс [Earnest, 2001]. У потомства крыс, на протяжении всей беременности употреблявших 15% раствор этанола, путем факторного анализа электрографической картины сна были выявлены инсомнические нарушения. Эти животные в большей степени были подвержены развитию невротических расстройств за счет того, что хронический эмоционально-болевой стресс вызывал у них более серьезные нарушения регуляции сна и высшей нервной деятельности. Нарушения регуляции циклов сна/бодрствования после антенатальной алкоголизации связаны с поражением лимбической системы [Сванидзе, 2012. Нарушения; Коломейцева, 1985].

Нарушения проявления рефлексов. У крыс, перенесших антенатальную алкоголизацию, наблюдалось увеличение сроков проявления и закрепления условных оборонительных рефлексов [Айропетянц, 1987. Нарушения; Коломейцева, 1989, 1988]. В исследовании беременные мыши пили 10% раствор этанола в течение всей беременности. Когда их потомство достигло совершеннолетия, для оценки структурных изменений в их мозге использовали МРТ высокого разрешения и обнаружили, что наибольшее уменьшение объемов мозгового вещества произошло в обонятельных луковицах. При использовании комбинации методов, в том числе структурных изображений мозга и *in vitro* методов, а также поведенческого тестирования установлено, что пренатальное воздействие алкоголя приводит к уменьшению обонятельных луковиц и нарушениям распознавания запахов, что сохраняется и в зрелом возрасте. Эти нарушения могут возникнуть в результате дефектов нейрогенеза во время раннего постнатального развития [Akers, 2011].

Таким образом, как у человека, так и у животных, подвергавшихся антенатальному воздействию алкоголя, развиваются разнообразные глубокие, долговременные и часто необратимые психические и поведенческие нарушения: когнитивные, сенсомоторные и эмоциональные расстройства, нарушения социального и полового поведения, повышенное влечение к этанолу и психоактивным веществам [Зиматкин, 2014, 2016].

Глава 2

НАРУШЕНИЯ НЕЙРОВИЗУАЛЬНЫХ ПАРАМЕТРОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Пагубные последствия пренатального воздействия алкоголя на развивающийся мозг включают: структурные аномалии мозга, а также когнитивные и поведенческие дефекты. Особое место в диагностике заболеваний, вызванных антенатальным воздействием алкоголя, принадлежит методам нейровизуализации. К ним относятся электроэнцефалография (ЭЭГ), позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ), однофотонная эмиссионная компьютерная томография (ОФЭКТ) и функциональная магнитно-резонансная томография (МРТ). Данные методы дают возможность понять влияние алкоголя на деятельность мозга, установить связь между активацией нейронов и поведением пациентов [Coles, 2011; Astley, 2009. Magnetic; Astley, 2009. Functional; Wang, 2015]. С помощью МРТ может быть поставлен прижизненный морфологический диагноз ФАС или FASD [Пальчик, 2013].

При ФАС отмечаются изменения биоэлектрической активности мозга. Исследования направлены на выявление степени и характера отклонений ЭЭГ от возрастной нормы, патологических изменений биопотенциалов и их локализации, которые могут свидетельствовать о задержке в возрастном развитии и, как следствие, возникновении проблем в обучении и поведении детей. Проведен анализ результатов ЭЭГ у 69 детей с ФАС обоего пола в возрасте от 18 до 29 месяцев. Зафиксированы умеренные и выраженные диффузные изменения. У испытуемых преобладали признаки нарушения межполушарного синергизма. Это связывают с усилением мозговой активности в лобной и лобно-височной долях, которая активируется бензодиазепиновыми рецепторами мозга, при этом имеет определенную связь с тормозной нейромедиаторной системой ГАМК. Исследования *in vitro* показали, что этанол действует как мощный стимулятор корковой активности. А в других работах, где исследования проводились на крысах, сообщается о подавлении мозговой активности, которая коррелирует во времени с активацией апоптоза [Lebedeva, 2015. Inhibition].

В работах Гнездицкого (2000) и Dierks et al. (1993) отмечается, что усиление мозговой активности в лобно-центральных областях имеет четкую связь с ухудшением когнитивных функций. ЭЭГ ис-

следования при ФАС регистрируют снижение амплитуды альфа-волновой активности [Разводовский, 2005].

Следует отметить и тот факт, что при внутриутробном воздействии алкоголя на плод во многих случаях фиксируется выраженное уменьшение размеров мозолистого тела, которое соединяет между собой два полушария мозга как морфологически, так и функционально. Имеются признаки раздражения таламических структур (69%), связанные с десинхронизированным характером большого числа бета-колебаний высокой частоты. Это может говорить о повышенной активности специфических и неспецифических ядер таламуса у данных пациентов, что свидетельствует о нарушении нейроэндокринных взаимодействий. Признаки снижения функциональной лабильности головного мозга (21%) и задержки возрастной феноменализации (69%) указывают на незрелость биоэлектрической активности головного мозга у значительной части детей с внутриутробным воздействием алкоголя. Наличие эпилептиформной активности мозга у детей не выявлено, что может быть косвенным свидетельством диффузного морфофункционального поражения мозга [Малахова, 2012].

В целом структура изменений на ЭЭГ в большей мере свидетельствует о недостаточности лимбических структур. С. В. Легонькова и соавт. (2010, 2011) показали, что для новорожденных с ФАС типичны нейрофизиологическая незрелость и асимметрия биоэлектрической активности на ЭЭГ, которые связаны с характером внутриутробной экспозиции алкоголя и выраженностью отдельных лицевых дисморфий. У детей дошкольного и школьного возраста при сохранении нейрофизиологической незрелости отмечено появление периодической локальной медленноволновой и патологической пароксизмальной активности на ЭЭГ [Легонькова, 2010, 2011].

Нейровизуализация с помощью МРТ подтверждает ранее полученные данные об общем сокращении объема мозга и дезорганизации ЦНС с конкретными структурными аномалиями мозолистого тела, мозжечка, хвостатого ядра и гиппокампа. Достижения в области нейровизуализации позволили выявить региональные увеличения толщины коры и объема серого вещества наряду с уменьшением объема и дезорганизацией белого вещества у лиц с FASD [Norman, 2009. Neuroimaging; Norman, 2012. A Functional].

Структурная магнитно-резонансная томография выявила связь между морфологическими нарушениями в мозге и лицевым

дисморфизмом. Нейровизуализация установила нарушение развития нервной системы при ФАС в детском и подростковом возрасте. Выявлены дефекты нейронных связей, лежащие в основе активации сенсорной обработки, когнитивных и поведенческих нарушений, а также глобальное снижение эффективности межнейрональных связей [Moore E. M., 2014].

У детей при антенатальной алкоголизации в дополнение к относительной макроцефалии МРТ показала тяжелую степень церебральной атрофии, особенно в лобно-теменной области. Наблюдались также атрофические изменения хвостатого ядра и мозолистого тела. При этом боковые и третий желудочки мозга были увеличены [Dobyns, 1997. Bilateral; Nokelainen, 2001. Two brothers; Elia, 2006. 6q].

Путем МРТ установлено снижение объема мозга в целом, а также истончение серого и белого вещества, аномалии развития мозолистого тела у пациентов с ФАС [Donald, 2014]. Лонгитюдные исследования с измерением толщины коры показало особенное ее истончения в медиальной лобной и теменной областях при FASD [Treit, 2015]. Кроме того, потребление алкоголя в период беременности приводило к сокращению количества и глубины извилин коры мозга [De Guio, 2013]. Показано, что с возрастом отмечается истончение в значительном количестве корковых образований [Zhou, 2011].

Анализировали толщину коры у 20 детей и подростков с ФАС, сопровождающимся дефицитом внимания и гиперактивностью (1-я группа), у 20 пациентов без ФАС с дефицитом внимания и гиперактивностью и у 20 здоровых (контроль). Измеряли толщину коры в лобной, затылочной и височной долях головного мозга. Исследование показало большую толщину коры у пациентов 1-й группы, вероятно, как выражение незрелости или ненормального развития мозга [Fernández-Jaén, 2011. Cortical].

С помощью структурной магнитно-резонансной томографии обследованы 69 детей и подростков с FASD. Методом FreeSurfer выявляли изменения толщины коры головного мозга и сопоставляли эти данные с дисморфией лица испытуемых. Исследование показало значительное увеличение толщины коры нескольких регионов лобной, височной и теменной долей. Кроме того, повышение толщины коры лобной доли коррелирует с уменьшением длины глазной щели. Установленная связь между толщиной коры и лице-

вым дисморфизмом позволяет предположить, что степень тяжести аномалий мозга может быть отражена на лице [Yang, 2012. Abnormal; Miki, 2010. Prenatal].

Пренатальное воздействия алкоголя вызывает значительные когнитивные дефекты и изменения в структуре мозга, которые сохраняются в зрелом возрасте. В Лос-Анджелесе, Сан-Диего (Калифорния) и Кейптауне (Южная Африка) проанализированы связи между структурой мозга, когнитивными функциями, лицевой морфологией и потреблением матерью алкоголя в течение первого триместра беременности. Установлено, что уменьшение глазных щелей связано с сокращением объема подкорковых ядер вентральной части промежуточного мозга, а более низкие показатели IQ связаны с меньшим объемом базальных ганглиев и лицевой дисморфией. У пациентов из Южной Африки обнаружили значительную отрицательную корреляцию между внутричерепным объемом и общим количеством алкогольных напитков в неделю в первом триместре беременности. Эти результаты подтверждают предыдущие сообщения, что пренатальное воздействие алкоголя особо токсично для базальных ганглиев и диэнцефальных структур [Roussotte, 2012. Regional].

Дети из семей с отягощенным алкогольным анамнезом имеют большую вероятность развития алкогольной зависимости и расстройств, связанных с употреблением психоактивных веществ. Большая восприимчивость для развития этих заболеваний может быть связана со структурными нарушениями мозга, которые влияют на эффективность обработки информации и восприимчивость к алкоголю. Исследовали мозжечок подростков/молодых/взрослых (71 чел.) с высокой степенью риска, выросших в семьях с несколькими случаями алкогольной зависимости, и 60 чел. с низким уровнем риска, с неотягощенным семейным анамнезом. Группы испытуемых были сопоставимы по возрасту, полу, социально-экономическому статусу и IQ. Магнитно-резонансные изображения были получены с помощью General Electric 1,5-Tesla сканера. У обследуемых из 1-й группы наблюдалось увеличение общего объема мозжечка и общего объема серого вещества по сравнению с контрольной группой [Hill, 2011. Cerebellum].

При исследовании 17 подростков с диагнозом ФАС (средний возраст 13 лет) с помощью МРТ у 10 из них была выявлена гипоплазия червя мозжечка, у 5 – гипоплазия полушарий мозжечка, у 2 – гипопла-

зия мозолистого тела. Данные морфологические аномалии являются характерными для ФАС. Они отмечаются даже у тех детей, которые подвергались воздействию алкоголя только в течение первого триместра беременности [Roebuck, 2002; Autti-Rämö, 2002. MRI].

Пренатальное воздействие алкоголя связано с широким спектром нейрокогнитивных дефектов. Все больше данных свидетельствуют о том, что белое вещество является мишенью для поражающего воздействия алкоголя. Для оценки состояния белого вещества (в частности структурных нарушений в ножке мозжечка) была применена МРТ мозга. Обследованы 13 детей с FASD и 12 детей из контрольной группы. Данные обрабатывали с помощью voxelwise техники и подвергали объемному анализу. У детей с FASD в ходе обследования были выявлены диффузные нарушения белого вещества ножки мозжечка [Spottiswoode, 2011].

МРТ-исследования, в том числе диффузная томография (DTI), выявили аномалии мозолистого тела, особенно его задних областей, у детей с FASD. 21 ребенок с FASD и 23 – из контрольной группы прошли МРТ и DTI. Используя полуавтоматический метод, исследовали мозолистое тело и 7 межполушарных трактов белого вещества. У детей с FASD наблюдались нарушения межполушарных функциональных взаимодействий. Нарушение было измерено в медиальных областях теменной доли. Данные нарушения коррелируют с дефицитом визуально-двигательных навыков, дефектами речи и исполнительным функционированием. Существенной связи между дисморфией лица и структурными нарушениями мозга не найдено [Wozniak, 2011. Inter-hemispheric].

Структурные повреждения головного мозга могут быть исследованы с помощью изображений с высоким разрешением. Повреждение структуры подкорковых ядер может иметь серьезные последствия, учитывая их многогранную роль в функционировании мозга. Для выявления различий в объеме подкорковых ядер у детей и подростков с FASD (N=28, с 6 до 17 лет) и у детей из контрольной группы использовали трёхмерную T1-взвешенную МРТ (FreeSurfer). Она обеспечивает автоматизированное измерение объема внутричерепного пространства, общего белого вещества, коркового серого вещества и 6 подкорковых структур мозга, а именно гиппокампа, миндалина, таламуса, хвостатого тела и бледного шара. При сравнении данных у детей с FASD установлено значительное сокращение объема внутричерепного пространства (7,6%), общего объема белого вещества (8,6%), об-

шего объема коркового серого вещества (7,8%) и общего объема подкорковых ядер (13,1%). Все 6 подкорковых ядер мозга показали значительное сокращение объема (хвостатое тело – около 16%, бледный шар – около 18%). Объем гиппокампа, таламуса и бледного шара снизился во всех 3-х возрастных подгруппах (с 6-9, от 10-13 и от 14-17 лет), но объем хвостатого тела и скорлупы был меньше при FASD только в двух младших, а миндалины – в двух старших подгруппах испытуемых [METHODY: Deti i podrostki (N = 28, 6 do 17 let) s diagnozom FASD i 56 vozrastnykh i polu zdorovykh (to yest', 2 v kontrol'noy FASD temy) proshla 3-mernoye T1-vzveshennykh MRT, kotoryye byli ispol'zovany dlya avtomatizirovannykh izmereniy ob'yema (FreeSurfer) vnutricherepnogo prostranstva, obshchego belogo veshchestva, korkovogo serogo veshchestva, i 6 glubokikh serykh struktur materii, a imenno gippokamp, mindalina, talamus, khvostatoye, putamen, i blednogo shara, s levoy i pravoy izmeryayetsya ot del'no . Ob'yemy byli sravneny mezhdru FASD i kontrolya, a takzhe menyayetsya s vozrastom.

REZUL'TATY: Znachitel'noye sokrashcheniye ob'yema v FASD nablyudali za vnutricherepnym khranilishcha (7,6%), obshchaya belogo veshchestva (8,6%), obshchego korkovogo serogo veshchestva (7,8%), a obshchiy glubokiy serogo veshchestva (13,1%). Vse 6 glubokikh serykh struktur materii pokazali znachitel'noye sokrashcheniye ob'yema dvustoronney osnove s khvostatogo (okolo 16%) i blednogo shara (okolo 18%), prichem naiboleye postradavshikh. Gippokamp, talamus, i blednogo shara pokazal sokrashcheniye vo vsekh 3 vozrastnyye podgruppy (6 do 9, ot 10 do 13 i ot 14 do 17 let), no khvostatogo i skorlupy byli men'shiye ob'yemy dlya FASD tol'ko v techeniye 2 molodykh podgruppy; mindalina byla Tol'ko men'she dlya FASD v 2 starykh podgruppy.

VYVODY: znachitel'nyy, no peremennoy, ob'yem sokrashcheniy po vsemu glubokogo serogo veshchestva nablyudayetsya v shirokom vozrastnom diapazone ot 6 do 17 let v FASD.

Nardelli, 2011. Acute; Nardelli, 2011. Extensive].

В одном из исследований оценивали нейронную основу вербальной памяти (WM) в группе из 20 детей и подростков с FASD и у 20 здоровых лиц с помощью функциональной МРТ. Обе группы показали активацию в лобно-теменных областях мозга, которые важны для процессов WM. Но у людей с FASD наблюдалось повышение активации, по сравнению с контрольной группой, в левой лобной доле и левой нижней теменной доле коры, а также в левой и правой задней ви-

сочных областях во время теста на WM. Эта модель повышенной активации показывает, что у людей с FASD в процессах WM задействованы более обширные зоны головного мозга, и обработка данных в лобно-теменной области менее эффективна, чем в норме [O'Hare, 2009. Altered; Diwadkar, 2012. Differences].

Изучено влияние пренатального воздействия алкоголя на морфологию поясной извилины, учитывая роль этого региона в когнитивном контроле, формировании внимания и эмоциональной регуляции. Обследуемые в возрасте 8-16 лет (31 чел.), из них подвергшиеся внутриутробно воздействию алкоголя – 21 чел., а также 10 здоровых людей, прошли структурную МРТ. Изучена поясная извилина и измерен объем серого и белого вещества. У лиц, имевших в анамнезе пренатальное воздействие алкоголя, наблюдалось значительное снижение объема серого и белого вещества поясной извилины по сравнению с контрольной группой. Была также выявлена корреляция между объемом серого вещества поясной извилины и тестом WISC-III, определяющим дефицит внимания. Эти данные позволяют предположить, что пренатальное воздействие алкоголя ведет к гипоплазии поясной извилины и к разрушительным последствиям для эмоциональной и когнитивной сферы [Bjorkquis, 2010. Cingulate].

Для исследования отношения между математическими способностями и строением белого вещества мозга 21 ребенок в возрасте от 5 до 13 лет с диагнозом FASD прошел DTI на 1,5-Т МРТ и ряд когнитивных тестов, включая количественный тест Вудкок-Джонсона. Выявлены 4 кластера со значимыми корреляциями между структурой белого вещества и математическими способностями: 2 положительно коррелировавших кластера в левой теменной области, 1 положительно коррелировавший кластер в левой доле мозжечка, и 1 отрицательно коррелировавший кластер в мозолистом теле. Диффузная трактография определила конкретные тракты белого вещества, проходящие через эти кластеры, а именно: левый верхний продольный пучок, кортикоспинальный тракт, тракт мозолистого тела и среднюю ножку мозжечка. Это 4 ключевых региона, связанные с математическими способностями и обеспечивающие связь между микроструктурами мозга и когнитивными функциями. Данные результаты указывают на значимость левой теменной области для решения математических задач, а также демонстрируют и другие регионы мозга, которые могут быть специфическими для

обработки математической информации у детей с FASD [Lebel, 2010. Brain].

Многочисленные исследования на животных позволили изучить повреждения головного мозга под воздействием алкоголя. Результаты МРТ указали на снижение объема мозга и аномалии его развития, нарушения клеточной дифференцировки и кровоснабжения. Исследования на животных способствовали изучению воздействия этанола в конкретных случаях, позволяли выявить связь повреждений со сроками потребления и дозой [Clarren, 1988; Miller, 1993; Wang, 2015].

Для изучения соотношения между мозговыми нарушениями и изменением поведения в зрелом возрасте проводили следующее исследование. Мыши пили 10% раствор этанола в течение всей беременности. Когда их потомство достигло совершеннолетия, для оценки структурных изменений в их мозге использовали МРТ высокого разрешения и обнаружили, что наибольшее уменьшение объемов мозгового вещества произошло в обонятельных луковицах у потомства. В ходе выполнения взрослыми мышами определенных заданий были обнаружены нарушения дискриминации при восприятии сходных запахов. Выявлено также, что под воздействием алкоголя сократилось число нейронов-предшественников в субэпендимальной зоне и количество новых клеток в обонятельных луковицах в течение первых нескольких недель послеродового развития. При использовании комбинации методов, в том числе структурных изображений мозга и *in vitro* методов, а также поведенческого тестирования было установлено, что пренатальное воздействие алкоголя приводит к уменьшению обонятельных луковиц и нарушениям при распознавании запахов, которые сохраняются в зрелом возрасте. Эти нарушения в обонятельной луковице могут возникнуть в результате дефектов нейрогенеза во время раннего постнатального развития [Akers, 2011. Fetal].

После пренатального воздействия этанолом путем МРТ мозга было обнаружено снижение объема мозга и толщины коры. Кроме того, выяснилось, что сенсорные области особо уязвимы при воздействии этанолом [Abbott, 2016. The Impact]. Нейропатологические аномалии включают микроцефалию, глионейрональные гетеротопии, агенезию мозолистого тела, дисгенезию мозжечка и ствола мозга. Магнитно-резонансная томография (МРТ) для детей, подростков и взрослых с классическим ФАС показала высокую частоту аномалий средней линии мозга [Swayze, 1997].

Магнитно-резонансная микроскопия (MRM) и МРТ на микроскопических уровнях дают беспрецедентные возможности для определения полного спектра воздействия этанола на развивающийся мозг. Беременным мышам вводили этанол в дозировке 2,8 г/кг внутрибрюшинно на 8-е сутки беременности. На 17-е сутки плоды извлекли и фиксировали для MRM-исследования по методу Буэна. В результате 29 изображений с микрон- (изотропным) разрешением были обработаны с помощью инструмента визуализации ИТК-SNAP и 3-D сегментации. Производились линейные и объемные измерения для регионов мозга, головы и частей тела каждого образца. По сравнению с контрольной группой у подверженных воздействию алкоголя плодов был значительно снижен объем мозга, как и всего тела. Сокращение объема наблюдалось в каждой области мозга, за исключением гипофиза, и сопровождалось увеличением объема желудочков. Непропорциональное региональное сокращение объема было наиболее выражено в правом полушарии и достигало максимальных величин в обонятельной луковице, гиппокампе и мозжечке. Кроме того, область перегородки и гипофиз были непропорционально велики. Выявлена также колобома зрительных нервов [Parnell, 2009. Magnetic].

Методы нейровизуализации способствовали выявлению значительных и разнообразных нарушений: биоэлектрической активности, развития всех отделов мозга, взаимосвязей между ними, а также функциональных нарушений метаболизма мозга, что часто было связано с лицевым дисморфизмом, неврологическими и поведенческими нарушениями у пациентов с ФАС и FASD.

Глава 3

ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В МОЗГЕ ПОСЛЕ АНТЕНАТАЛЬНОЙ АЛКОГОЛИЗАЦИИ

Алкоголь влияет на основные механизмы формирования нервной системы плода. Во время миграции нейронов этанол вызывает преждевременное преобразование радиальной глии в астроциты. Этанол также ингибирует глиогенез. В результате постмиграционная кора головного мозга имеет ненормальное строение и архитектуру [Gressens, 1992. Ethanol-induced]. У эмбрионов и плодов человека, полученных от злоупотреблявших алкоголем матерей, на 5-12-й неделе развития были выявлены существенные структурные нарушения мозга, дефекты развития полушарий, ультраструктурные изменения нейро- и глиобластов. При этом выраженность патологии головного мозга зависела от тяжести злоупотребления этанолом во время беременности [Коновалов, 1988. Нарушения; Ковецкий, 1988].

При судебно-медицинской экспертизе случая смерти двухмесячного ребенка с частичным ФАС, погибшего в результате черепно-мозговой травмы, не совместимой с жизнью, были задокументированы поражения ЦНС (очаги разряжения и дистрофические изменения нейронов, уменьшение корзинчатых клеток в мозжечке) [Малахова, 2012].

Этанол оказывает негативное влияние на процессы *формирования нервной трубки* зародыша. Исследование проводили на крысах. Беременным животным давали жидкую пищу, в которой 20% или 25% калорий приходилось на этанол, с 7-го (до нейруляции) или 8-го (нейруляция) дня эмбрионального развития. Мозг плодов изучали на 13-, 15-, или 18-е сутки внутриутробного развития. У 60% эмбрионов на 13-е сутки и у 20% на 15-е сутки было обнаружено нарушение формирования диэнцефальных пузырьков. На 13-е и 15-е сутки формирование нервной трубки не было завершено, оно завершилось только на 18-е сутки [Zhou, 2001. Prenatal; Zhou, 2003. Moderate].

В другом исследовании рассматривается влияние этанола на пролиферацию клеток в двух *пролиферативных зонах неокортекса*: вентрикулярной зоне (VZ) и субвентрикулярной зоне (SZ). С 5-го до 21-го дня беременности крыс кормили жидкой пищей, содержащей 6,7% этанола. Беременным крысам делали инъекции

бромдезоксипуридина (BrdU). После иммуногистохимической обработки определили соотношение клеток, меченных BrdU, в каждой пролиферативной зоне. Рассчитали также общую длительность клеточного цикла, фазы роста и S-фазы. Воздействие умеренных доз этанола оказало заметное влияние на пролиферативные зоны. В VZ длительность общего клеточного цикла возрастала под воздействием этанола, однако длительность S-фазы и фазы роста осталась прежней. В противоположность этому в SZ происходило замедление фазы роста, а продолжительность полного цикла и S-фазы не изменилась. Эти различия могут лежать в основе нарушений нейрогенеза [Miller, 1991].

Для определения воздействия этанола на *процессы миграции нейронов* проводилось следующее исследование. Крыс кормили жидкой пищей, содержащей 6,6% этанола, с 6-х по 21-е сутки беременности. При оценке результатов установлено, что этанол вызвал задержку миграции нейронов на 2 дня у эмбрионов на 13-е сутки внутриутробного развития. У эмбрионов на 21-е сутки внутриутробного развития миграция задерживалась на 4-6 дней, и часто эти нейроны заканчивали миграцию в эктопических местах. Этанол значительно снизил темпы миграции и клетки в постмитотическую фазу оставались в пролиферативных зонах. Таким образом, миграция молодых нейронов была глубоко изменена пренатальным воздействием этанола. Такие задержки могут привести к десинхронизации развития коры и нарушениям функций ЦНС [Miller, 1986, 1993].

Важнейшими этапами раннего нейроонтогенеза являются: образование в перивентрикулярной зоне путем митоза более сотни миллиардов нейронов из нескольких десятков клеток-прародительниц; миграция молодых нейронов к местам своего назначения; рост аксона к клетке-мишени; рост и ветвление дендритного дерева; завершение синаптогенеза с последующим отбором наиболее эффективных функциональных связей. Этанол меняет скорость деления клеток, уменьшает синаптическую плотность в молекулярном слое коры, индуцирует преждевременную трансформацию радиальной астроглии в астроциты, в результате чего нарушается миграция молодых нейронов к своему месту в мозге [Малахова, 2012].

Подтверждение этому было получено и в исследованиях на экспериментальных животных. Животные были разделены на две

группы: 1-я – основная (крысы, получавшие вместо воды в течение 1-го месяца до беременности и в течение всей беременности 15% раствор спирта), 2-я – контрольная (интактные животные). У полученного потомства в возрасте одного месяца для светооптического и электронно-микроскопического исследований брали фрагменты головного мозга. Визуально у части животных наблюдались пороки развития глаз и ушных раковин. В 1-й опытной группе были найдены выраженные изменения: кора имела очаги разрежения нервных клеток, чередовавшихся по выраженности и распространенности. Участки разрежения локализовались преимущественно в средних слоях коры, но встречались единичные зоны разрежения, которые шли через все слои. Были выражены дистрофические изменения нейронов, главным образом в виде хроматолиза в средних слоях и пикнотических изменений в верхних слоях [Малахова, 2012].

Аntenатальная алкоголизация нарушает клеточный цикл, замедляет генерацию и миграцию нейронов двигательной коры мозга крыс [Miller, 1986; Alvares, 1988]. При этом значительно замедляются и нарушаются процессы миелинизации во всех волокнистых трактах мозга крыс [Rosman, 1976; Samoraiski, 1986]. На 18-й день внутриутробного развития у плодов снижены вес мозга, численность клеток и содержание в нем ДНК и РНК [Woodson, 1979].

Проводилось исследование для выяснения, вызывает ли апоптоз кратковременное пренатальное воздействие алкоголя в мозге плода у приматов. Беременным макакам на разных стадиях беременности (со 105-х по 155-е сутки) давали доступ к алкоголю на 8 ч ежедневно в указанный период. Плоды извлечены с помощью кесарева сечения после 155 суток, их мозг был подвержен перфузии с фиксатором. В мозге наблюдалось 60-кратное увеличение апоптоза по сравнению с контролем. Предполагается, что многие из нейропатологических изменений и долгосрочных психоневрологических нарушений FASD можно объяснить апоптогенным действием алкоголя на мозг плода [Farber, 2010].

Обезьянам (*Macaca nemestrina*) давали этанол один раз в неделю (1,8 г/кг массы тела) со 2-й по 19-ю неделю беременности. Диагностика пороков развития была сделана после ультразвуковой оценки и извлечения плода с помощью кесарева сечения. Другой плод того же возраста был использован в качестве контроля. Оба плода изучены антропометрически, рентгенографически и гистологически. У плода, подвергнутого пренатальному воздействию эта-

нола, выявили микроцефалию, отсутствие обонятельных луковиц, зрительных нервов и хиазмы, расширение бокового желудочка мозга, теменно-затылочную грыжу, дисплазию мозжечка [Siebert, 1991].

В другом опыте этанол вводили перорально, один раз в неделю, 54 беременным макакам (*Macaca nemestrina*) в дозах 0, 0,3, 0,6, 1,2, 1,8, 2,5 или 4,1 г/кг с 1-й недели беременности или в дозах 2,5, 3,3 или 4,1 г/кг с 5-й недели. Средняя концентрация этанола в плазме крови матери колебалась от 24 ± 6 мг/дл при 0,3 г/кг до 549 ± 71 мг/дл при 4,1 г/кг. Тридцать три живорожденных детеныша были оценены на наличие физических и поведенческих нарушений развития. Микрофтальмия и снижение количества ганглиозных клеток сетчатки отмечено у троих из 26 животных, подвергшихся воздействию этанола [Clarren, 1990. Neuroanatomic].

Одной из ключевых особенностей экспериментального алкогольного синдрома плода является микроцефалия. Кора головного мозга особо чувствительна к пренатальному воздействию этанола. Ее общая масса уменьшается, она становится тоньше и содержит меньше нейронов и глиии. Разного рода исследования на крысах показывают, что хроническое раннее воздействие этанола приводит к массивной реорганизации коры и характеризуется гетеротопией нейрональных кластеров [Miller, 1986; 1993].

Для оценки повреждения структур головного мозга при пренатальной алкоголизации проводили исследование на мышах линии C57B1/6J. На 14-е и 18-е сутки внутриутробного развития у плодов были обнаружены следующие аномалии: отсутствие обонятельных луковиц, дефекты медиальной септальной области и коры головного мозга, соединение боковых желудочков и уменьшение толщины стенок желудочков. Данные нарушения объясняют многие функциональные дефициты, наблюдающиеся при ФАС [Schambra, 1990].

Этанол индуцирует у грызунов апоптоз нейронов с активацией микроглии, нейродегенеративные изменения и долгосрочные поведенческие отклонения, схожие с FASD [Wilson, 2011. Local; Ahler, 2015. Transient activation]. Воздействие умеренными дозами алкоголя в период пренатального развития приводит к замедлению роста мозга, снижению его массы у новорожденных крысят, а степень выраженности данных нарушений варьирует у животных разных линий [Woodson, 1979; Wainwright, 1985; Lalitha, 1988. Effects].

Пренатальное воздействие алкоголя вызывает уменьшение числа и размеров пирамидных нейронов в коре мозга у животных, снижение содержания белка и недоразвитие цитоплазмы нервных клеток [Hammer, 1981; Fabregues, 1985; Lopes-Tejero, 1986. Effects; Худоерков, 1987; Казакова, 1987]. При этом в сенсомоторной коре крысят наблюдаются признаки задержки развития нейронов и их дендритов, деструктивные и дистрофические изменения клеток (кариоцитоз, хроматолиз, появление «клеток-теней»). Эти нарушения коррелируют с угнетением способности крыс к обучению. Данные изменения обратимы и уменьшаются к 2-месячному возрасту [Смольникова, 1985. Антенатальное; Артюхина, 1986, 1988].

Для изучения конкретных морфологических изменений коры головного мозга плода под воздействием алкоголя беременным крысам заменили воду на 15% этиловый спирт на весь период гестации. Исследовали образцы коры мозга плодов и новорожденных крыс. Макроскопические исследования показали гиперемия мягкой мозговой оболочки, разные типы нарушений нейроорганогенеза, лептоменингеальных гетеротопий и микроцефалию в 6 случаях из 24 (25%) в экспериментальной группе. Морфологически в коре плода под воздействием алкоголя происходят массовое разрушение нейронов и их митохондрий, инволюционные изменения в дендритах, нарушение пролиферации глии [Chikhladze, 2011. The spectrum].

Этанол вызывает истончение сенсомоторной коры головного мозга у крыс, которые подвергались его воздействию внутриутробно [Minciacchi, 1993. Modifications].

Антенатальная алкоголизация ингибирует астроцитопосредованный нейритогенез, развитие олигодендроцитов и миелинизацию [Guizzetti, 2014. Glia and neurodevelopment; Creeley, 2014. Alcohol-induced]. Кроме того, этанол активирует микроглию и индуцирует окислительный стресс, ведущий к гибели нейронов [Guizzetti, 2014. Glia and neurodevelopment].

Введите текст или адрес веб-сайта либо переведите документ.

Отмена

Пример использования слова "":

автоматически переведено системой Google

Alpha

На крысах исследовали изменения в морфологии дендритов нейронов в медиальной префронтальной коре мозга при антена-

тальной алкоголизации. Дендритную морфологию анализировали с помощью трехмерной реконструкции NeuroLucida (Bioscience). Количество клеток определяли с помощью объективной процедуры стереологии (Bioscience). Установлено, что пренатальное воздействие этанола не повлияло на количество нейронов или глиальных клеток, но изменило ветвление дендритов по продольной оси [Lawrence, 2012].

Для изучения влияния антенатального воздействия этанола на нейрогенез корковых и подкорковых структур лимбической системы крыс разделили на 2 группы. Животные 1-й группы получали 20% раствор сахарозы, 2-й – 15% раствор этанола в течение беременности. Забор материала осуществляли на 3-, 7-, 15-, 21-, 30-е сутки после рождения. На срезах мозга, окрашенных крезидиновым фиолетовым, определяли число пирамидных нейронов в энторинальной коре, поясной извилине, аммоновом роге, мультиполярных и веретенообразных нейронов в супраоптическом, паравентрикулярном, вентромедиальном ядрах гипоталамуса, срединном ядре мамиллярного тела, латеральном и медиальном ядрах прозрачной перегородки, нейронов в зернистом слое зубчатой извилины гиппокампа и подсчитывали пролиферативную активность клеток. Культуры тканей коры мозга 1-3-суточных животных использовали для выявления влияния этанола на миграционную способность нейронов и клеток глии. Снижение пролиферативной активности наблюдалось на 3-, 7- и 15-е сутки постнатального развития. После посева культуры лимбической коры в питательную среду, содержащую этанол, миграция глио- и нейробластов была слабо выражена, а периметр эксплантата состоял из малого числа глиальных клеток. Снижение числа пирамидных нейронов определялось в энторинальной коре, поясной извилине, аммоновом роге и зубчатой извилине гиппокампа, супраоптическом и паравентрикулярном ядрах гипоталамуса, в латеральном и медиальном ядрах прозрачной перегородки, в срединном ядре сосцевидного тела [Сванидзе, 2012. Нарушение].

Гиппокамп – одна из областей мозга, наиболее уязвимых к воздействию этанола. Исследования с использованием морфометрических методов показали, что пренатальное воздействие этанола оказывает влияние на развитие зубчатой извилины. Данная аномалия может привести к разным нарушениям поведения у потомства [Miki, 2003. Effects; Klintsova, 2007. Persistent; Miki, 2008. Ethanol].

Уменьшение размеров мозга при FASD связано как со снижением пролиферации клеток в развивающейся ЦНС, так и с апоптозом постмитотических нейронов. Для изучения долговременных последствий воздействия алкоголя на клеточную пролиферацию и нейрогенез в зубчатой извилине гиппокампа у крыс в период развития, эквивалентного третьему триместру беременности у человека, проводили следующий эксперимент. На 4-9-й день после рождения крысятам давали этанол в молочной смеси, общая доза 5,25 г/кг в сутки. Маркер пролиферирующих клеток BrdU вводили через день в период с 30-го по 50-й день после рождения. Забор мозга для перфузии и изучения цитогенеза и нейрогенеза в зубчатой извилине гиппокампа осуществляли на 50-й и 80-й день после рождения, чтобы оценить выживаемость клеток. Срезы гиппокампа подвергали иммуноокрашиванию для выявления BrdU, маркера пролиферирующих клеток, Ki67, эндогенного маркера пролиферации и NeuN, маркера зрелых нейронов. На 50-е и 80-е сутки после рождения в зубчатой извилине гиппокампа значительно сократилось число зрелых нейронов. Кроме того, сократилось количество новых нейронов, которые образовались в промежутке между 30-ми и 50-ми сутками. Эти наблюдения показывают, что раннее постнатальное воздействие алкоголя способствует возникновению дефектов ЦНС в зрелом возрасте [Klintsova, 2007. Persistent].

Одной из важных проблем является отсутствие систематического изучения влияния сроков воздействия этанола на клетки гиппокампа. В настоящем исследовании рассматривается вопрос о том, происходят ли при систематическом воздействии этанола долгосрочные потери нейронов гиппокампа, связанные с определенным периодом развития. Этанол давали животным в периоды, эквивалентные первому, второму и третьему триместрам беременности у человека. Объективные стереологические оценки общего количества пирамидальных и зернистых клеток в СА1, СА3 и ГД регионах гиппокампа были выполнены, когда крысы достигли совершеннолетия. Полученные результаты свидетельствуют, что область СА1 особо восприимчива к воздействию этанола в раннем неонатальном периоде и во всех трех триместрах беременности, а зоны СА3 и DG более устойчивы к эффектам этанола во все рассмотренные периоды развития гиппокампа [Livy, 2003. Fetal; Maier, 2001; Tran, 2003].

Воздействие этанола на *мозжечок* подчиняется определенным закономерностям, связанным с дозой, длительностью и периодом

развития нервной системы. Опыты [West, 1993; Olney, 2001] показали, что наибольшая чувствительность клеток Пуркинье к этанолу приходится на период дендритогенеза (4-5-е сутки постнатального развития у крыс), что эквивалентно третьему триместру беременности у человека, причём отмечалась региональность чувствительности мозжечка – наиболее чувствительными оказались раннесозревающие дольки: I-IV и IX-X [Sawant, 2013]. Сходные результаты получены Maier [Maier, 1999. Fetal] при сравнении гистологической картины мозжечка после воздействия этанола на 1-10 сутки беременности и 1-10 сутки постнатального развития, коогда более выраженные изменения наблюдались при более позднем воздействии этанола. Однако исследования по воздействию этанола в более поздние сроки показали, что эффект по мере взросления мозжечка снижается, но всё ещё имеет место [Goodlett, 1997]. При анализе дозозависимого эффекта было определено, что негативный эффект от краткосрочного введения этанола начинает проявляться, начиная с дозы 6 г/кг. Двухдневное четырёхразовое введение этанола крысам в возрасте 4-6 суток, в дозе 4,5, 5,25 и 6 г/кг выявило значительные нарушения лишь после воздействия этанола в дозе 6 г/кг [Goodlett, 1998]. Алкоголизация самок дозами 2,25, 4,5 и 6,5 г/кг/сут на протяжении всей беременности приводила к снижению количества клеток Пуркинье у 10-суточного потомства после концентрации 6,5 г/кг/сут [Maier, 2001]. Было также отмечено, что интенсивность нарушений развития мозжечка зависит в большей степени от пиковой концентрации алкоголя в крови (peak BAC), нежели от дозы потреблённого алкоголя или длительности алкоголизации [West, 1990].

При изучении эффекта этанола на развивающийся мозжечок наиболее распространённым показателем является численность клеток Пуркинье. В результате воздействия этанола в клетках Пуркинье наблюдаются процессы апоптоза и аутофагии, приводящие к снижению их количества [Chen, 2012; Oliveira, 2014. Apoptosis]. Алкоголь-индуцированная гибель клеток наступает уже через 12 ч после однократного введения этанола в концентрации 6 г/кг, а после 16 ч введения интенсивность апоптозных процессов достигает максимума [Lee, 2008]. По данным Green J. T. (2002), введение этанола в период, эквивалентный третьему триместру беременности, в дозе 5,25 г/кг/день (пиковая концентрация алкоголя в крови – 363 мг/дЛ) приводит к 50% снижению количества нейронов в ядрах

мозжечка. При введении беременным мышам 18% этанола в качестве единственного источника питья в мозжечке потомства выявлено 20% снижение количества клеток Пуркинье [Servais, 2007]. Опыты Sawant на овцах показали, что прерывистая антенатальная алкоголизация в дозе 1,75 г/кг/день в третьем триместре внутриутробного развития приводит к снижению количества клеток Пуркинье до 37% (I долька червя). В то же время однократное введение этанола в дозе 6,6 г/кг крысам в период лактации приводит к примерно такому же результату при введении на 4-е сутки развития, но не имеет эффекта на 9-е сутки [Goodlett, 1997]. При сравнении эффекта этанола в дозе 7,5 г/кг на 5-е и 10-е сутки после рождения у подопытных крыс отмечалось снижение количества клеток Пуркинье в обеих группах, но максимальный эффект наблюдался у животных, подвергшихся алкоголизации в более ранний период, однако тест на обучаемость (Morris water maze) показал одинаково низкие результаты в обеих группах [Pauli, 1995]. Опыты Marcussen (1994) показали чувствительность клеток Пуркинье к этанолу в период нейрогенеза (13-18-е сутки эмбрионального развития). Отмечено, что гибель клеток Пуркинье приводит к закономерному снижению числа клеток-зёрен в соответствующих зонах коры мозжечка [Namre, 1993], максимальная чувствительность клеток-зёрен к алкоголю также приходится на 4-е сутки постнатального развития [Kane, 2008/ Ethanol].

Обнаружено также, что воздействие этанола вызывает анатомические нарушения коры мозжечка. При изучении аутопсийного материала установлено, что длительная алкоголизация вызывает снижение объёмов серого вещества, осевое смещение и в целом вызывает уменьшение объёмов как мозжечка, так и мозга в целом [Dorrie, 2014. Fetal]. Воздействие жидкой алкогольной диеты (35% ккал) на крыс в возрасте 6-21 дней вызывало нарушение образования монослоя клеток Пуркинье, и в целом гистологическая картина алкоголизированного мозжечка на 14-е сутки была сходна с контрольным 7-суточным мозжечком [Mohamed, 1987]. Введение 5% этанола в период с 10-х по 21-е сутки эмбрионального развития вызывало аномалии фолиации (формирование слоёв) коры мозжечка и слияние V и VI долек, что, возможно, объясняется нарушением регуляции глиогенеза [Sakata-Haga, 2001] или нарушением миграции нейробластов [Gressens, 1992. Ethanol-induced; Aronne, 2011].

Аntenатальная алкоголизация вызывает повреждение *подкорковых и стволовых отделов мозга* у потомства. У 70-дневных потомков-самцов уменьшаются объем и средний размер нейронов в диморфическом ядре преоптической области гипоталамуса, что предполагает дифференциальную чувствительность к алкоголю данного ядра [Barron, 1988]. Внутриутробное воздействие алкоголя нарушает развитие среднего мозга, играющего важную роль в координации ответов на разные стимулы. Показано, что у плодов мышей, подвергавшихся пренатальному воздействию алкоголя, уменьшается площадь поперечного сечения среднего мозга в области сильвиева водопровода, плотность расположения нейронов и средний объем их ядер в верхних холмиках четверохолмия, играющих важную роль в моторной координации, при значительном увеличении плотности расположения нейронов в наружном и внутреннем слоях верхних холмиков [Zajac, 1987]. Внутриутробное воздействие алкоголя задерживает развитие нейронов, в особенности их дендритов в плотной части черной субстанции, вызывает деформацию клеточных тел и шаровидное расширение их отростков [Shetty, 1993].

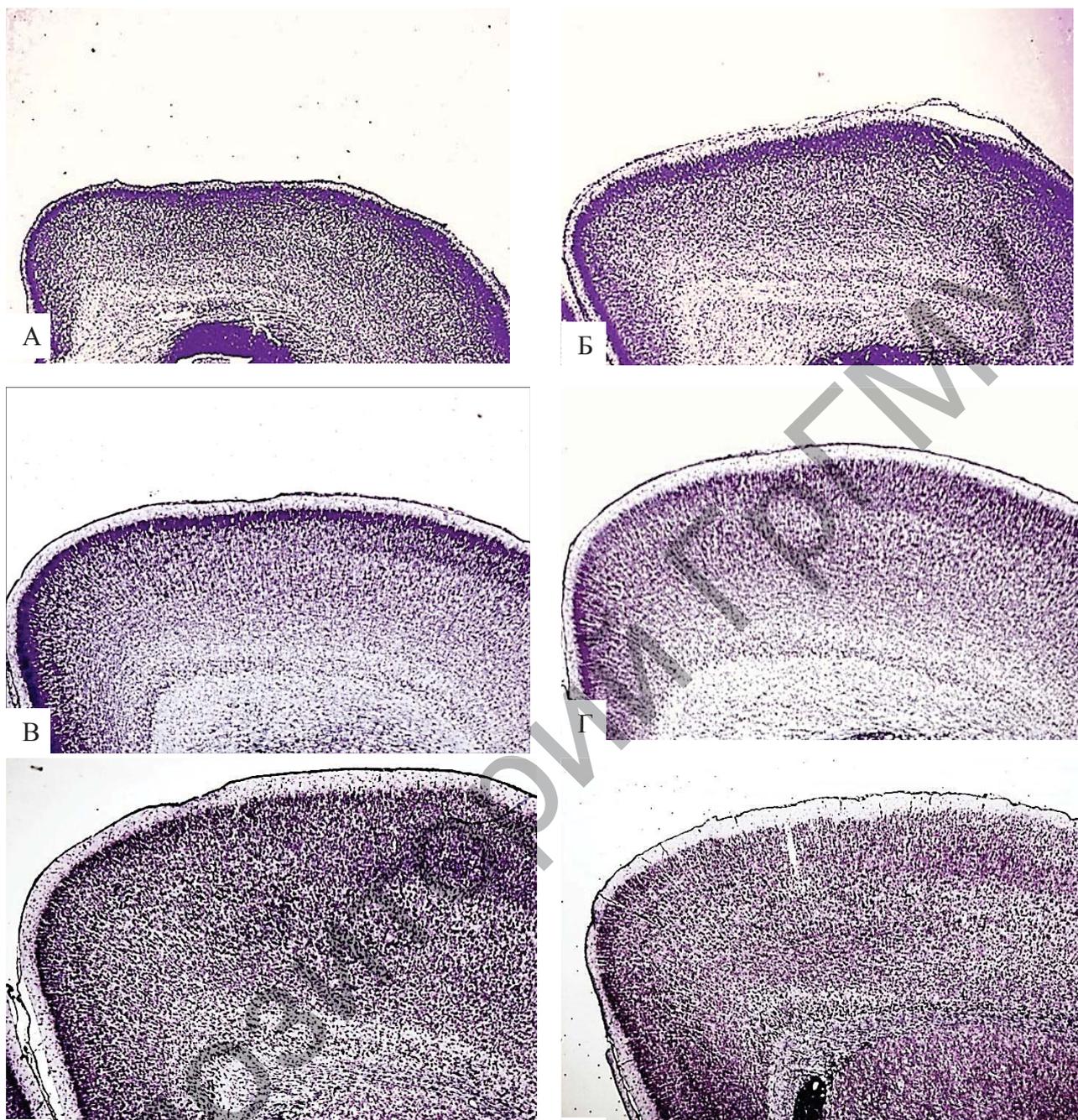
ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В КОРЕ МОЗГА КРЫС, ПОДВЕРГАВШИХСЯ АНТЕНАТАЛЬНОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ АЛКОГОЛЯ

(Материалы и методы изложены в приложении 1).

Толщина коры

В наших собственных исследованиях установлено, что у крысят, подвергавшихся антенатальной алкоголизации на протяжении всего эмбриогенеза (беременные крысы получали 15% этанол в качестве единственного источника питья), на 2-е сутки после рождения кора мозга была достоверно толще: цингулятная – на 28%, фронтальная – на 33%, париетальная – на 16% по сравнению с контролем (рисунки 3.1, 3.3; приложение 2, таблица 1). Это может быть связано с набуханием нейронов, что заметно на гистологических препаратах. Именно на 2-е сутки постнатального развития выявлена наибольшая корреляция между толщиной коры и площадью сечения тел нейронов ($r=0,98$; $p<0,01$).

У крысят, подвергавшихся антенатальной алкоголизации, на 5-е сутки после рождения была достоверно толще: фронтальная кора – на 13%, париетальная кора – на 9% по сравнению с контролем (рисунки 3.1, 3.3; приложение 2, таблица 1). У крысят в опытной группе на 10-е сутки после рождения была достоверно тоньше: фронтальная кора – на 12%, париетальная кора – на 13%, соответственно, по сравнению с контролем. Это может быть связано с уменьшением отека, наблюдавшегося на 2-е и 5-е сутки (рисунки 3.1, 3.3).

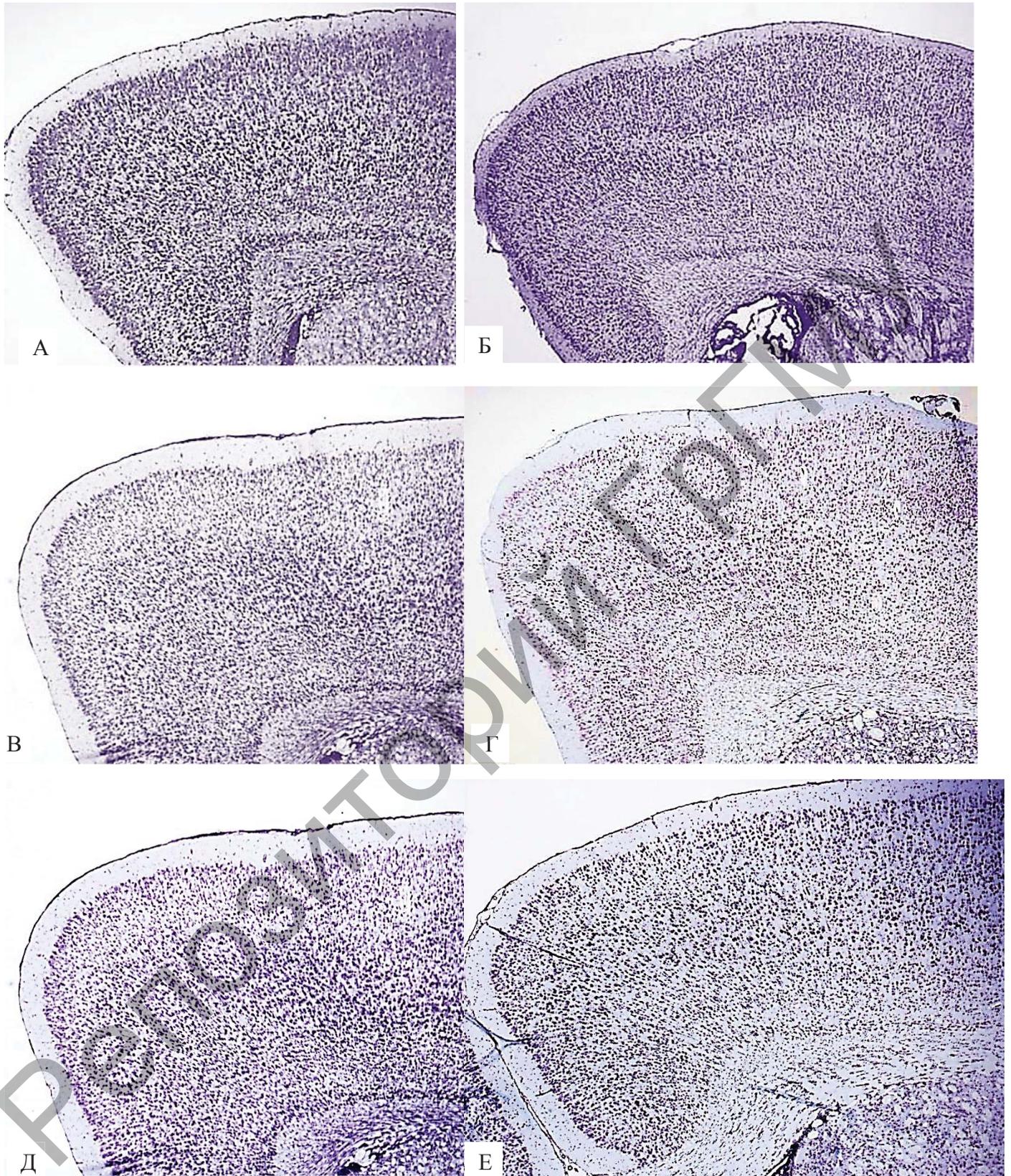


Д

Е

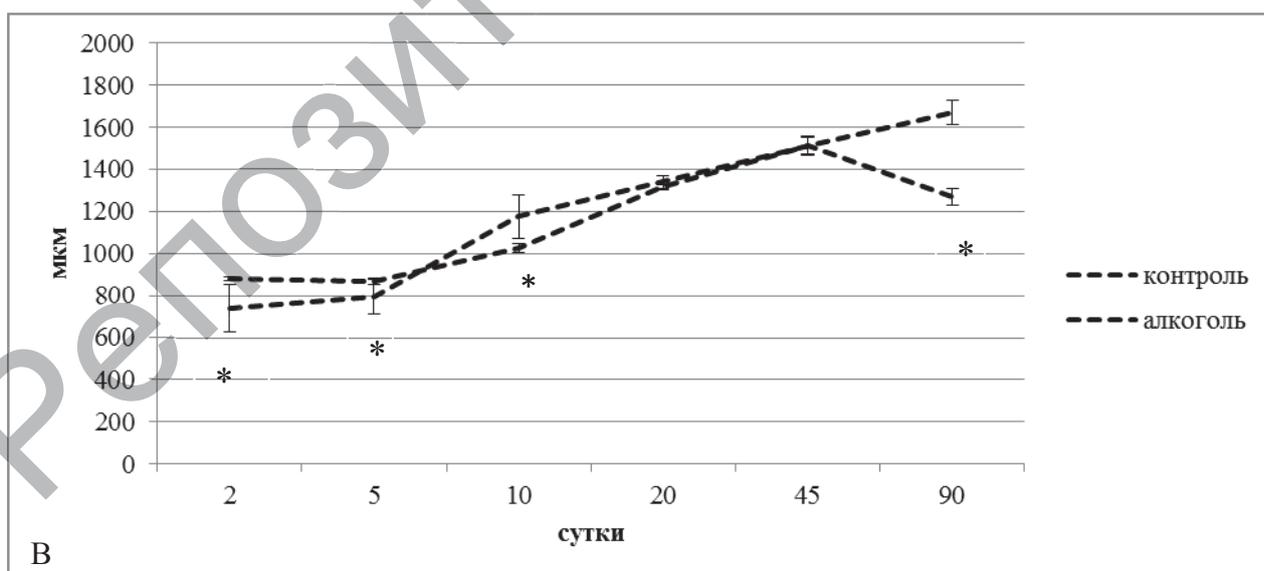
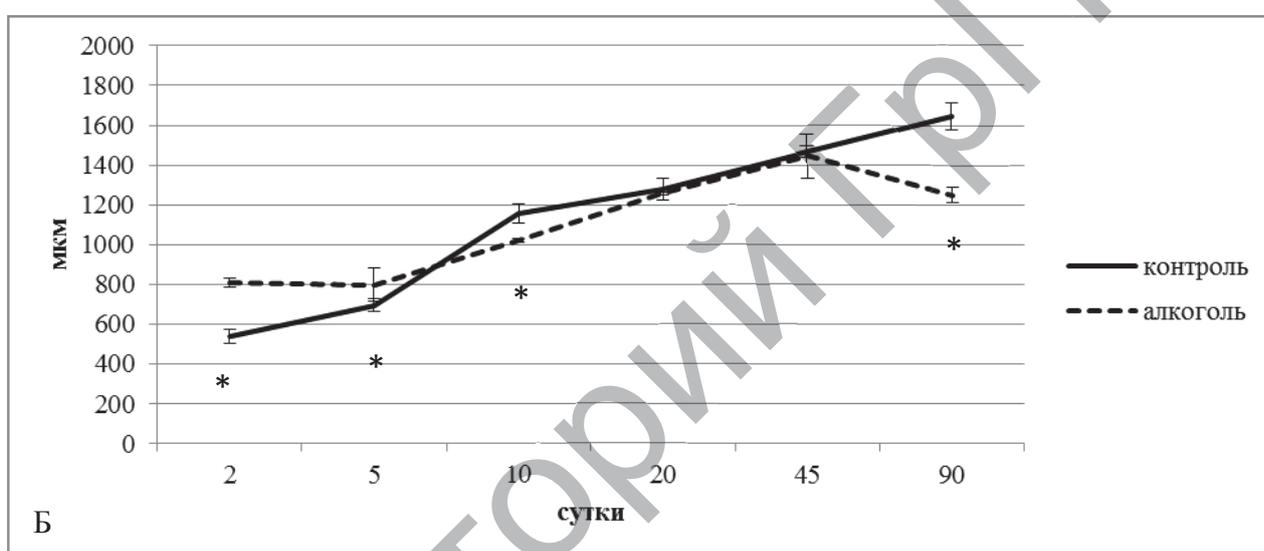
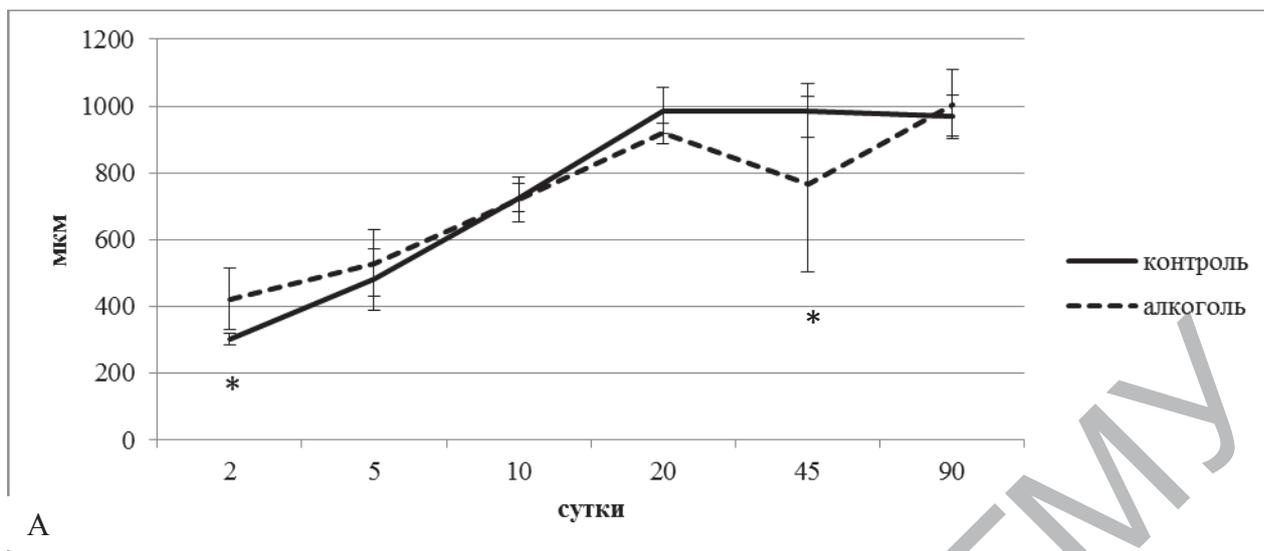
Окраска по Нислю. Цифровая микрофотография. Ув. 25

Рисунок 3.1. – Цингулятная (1), фронтальная (2) и париетальная (3) кора контрольных крысят (А, В, Д) и после антенатальной алкоголизации (Б, Г, Е) на 2-е (А, Б), 5-е (В, Г) и 10-е (Д, Е) сутки после рождения



Окраска по Нислю. Цифровая микрофотография. Ув. 25

Рисунок 3.2. – Цингулятная (1), фронтальная (2) и париетальная (3) кора контрольных крысят (А, В, Д) и после антенатальной алкоголизации (Б, Г, Е) на 20-е (А, Б), 45-е (В, Г), и 90-е (Д, Е) сутки после рождения



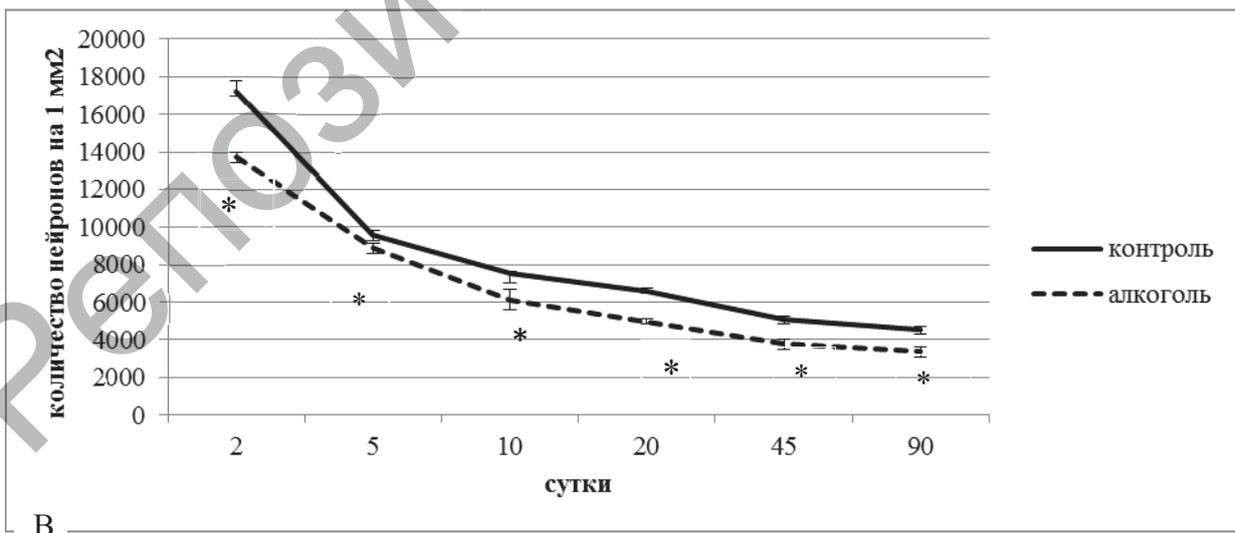
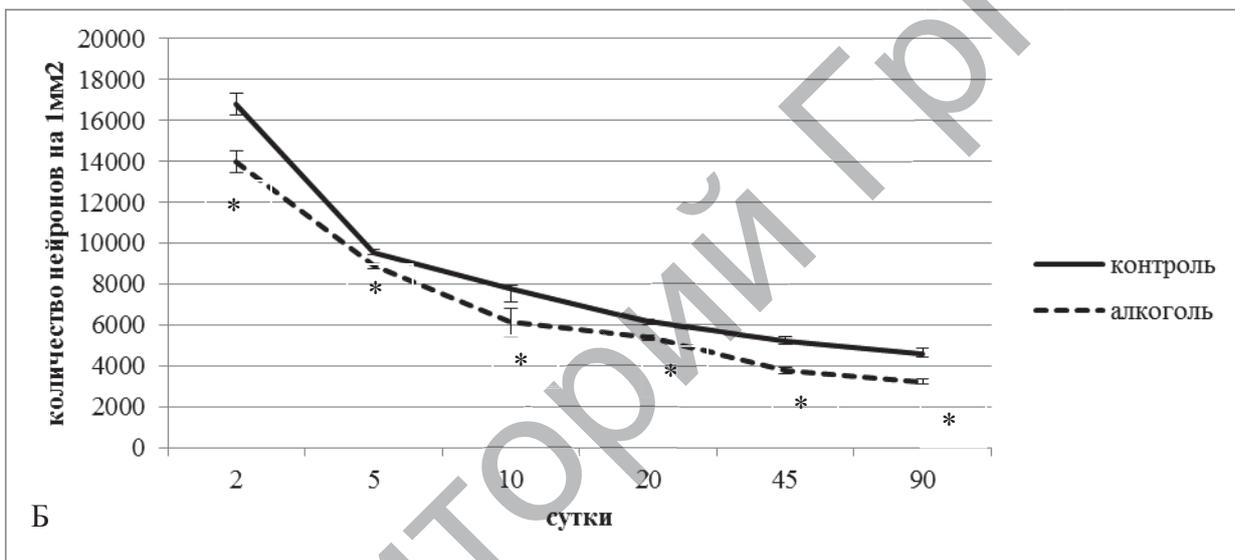
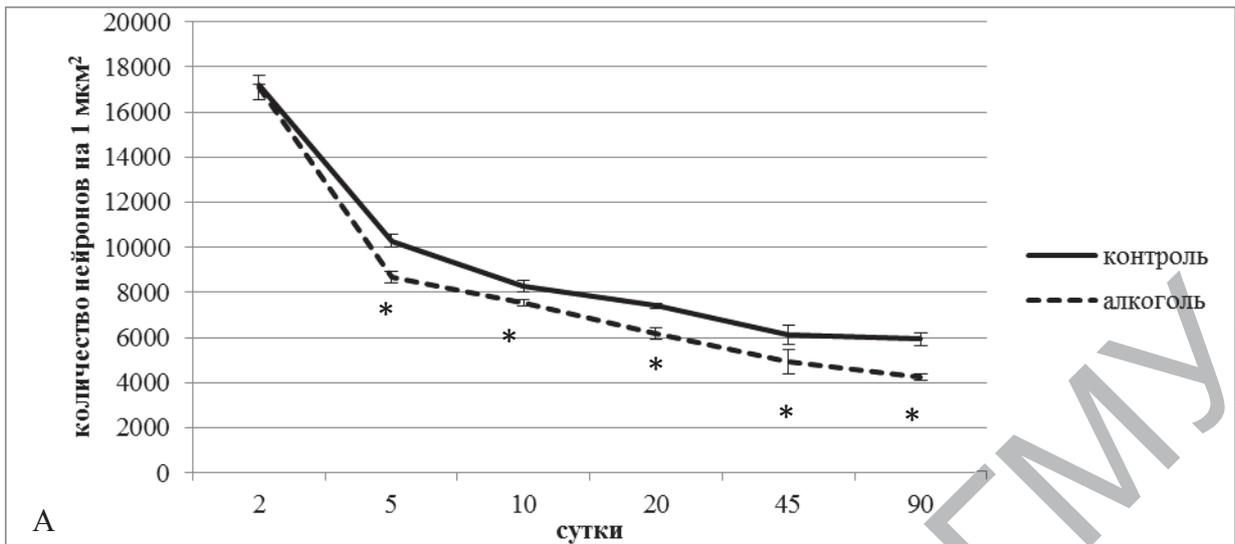
Me ± IQR; * – p < 0,05 по сравнению с контролем

Рисунок 3.3. – Изменение толщины цингулятной (А), фронтальной (Б), и париетальной (В) коры мозга крыс в разные сроки после рождения, мкм

Количество нейронов

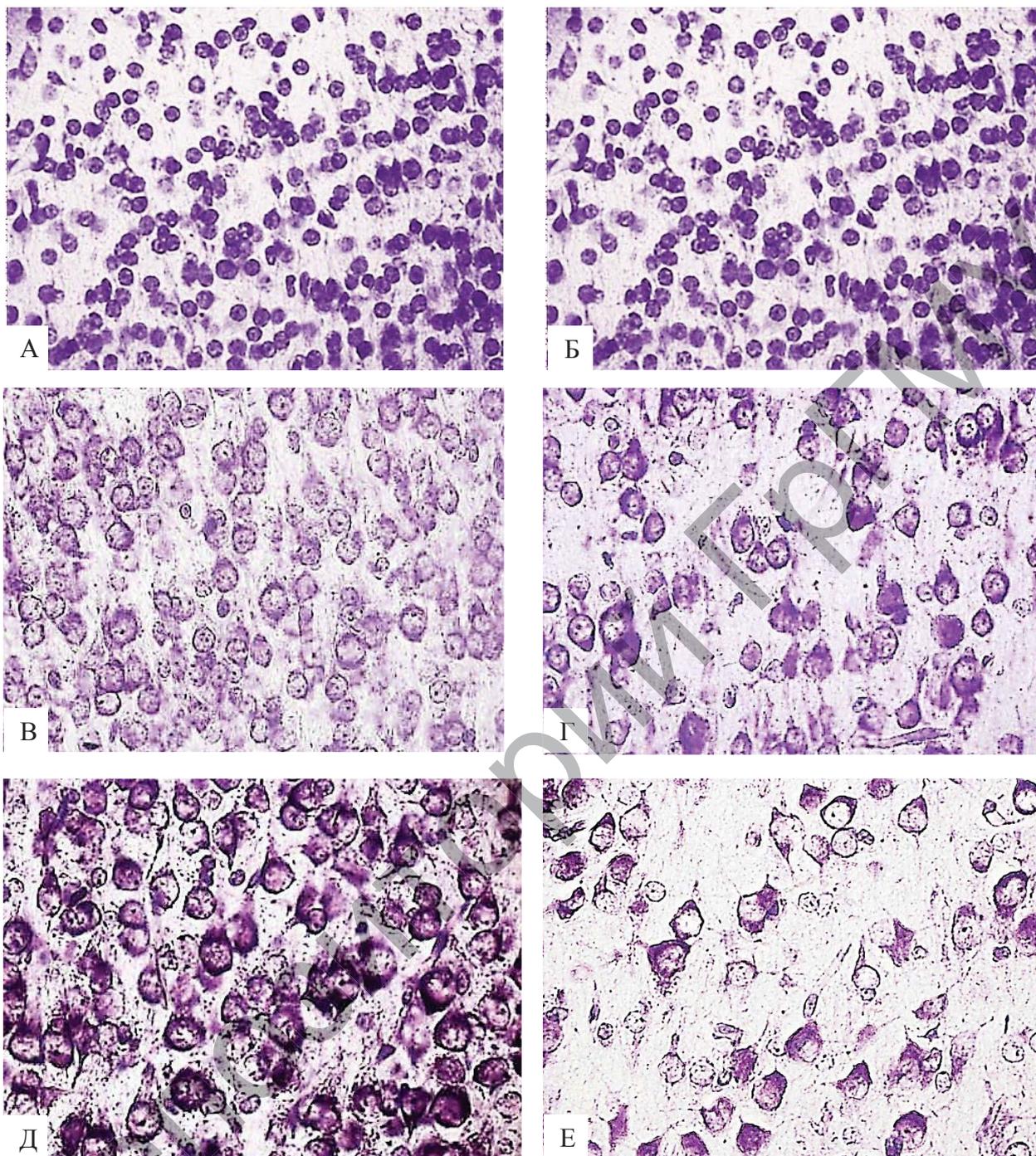
У опытных и контрольных животных в коре головного мозга наблюдалось закономерное уменьшение во времени (со 2-х по 90-е сутки постнатального онтогенеза) плотности расположения тел нейронов (примерно в 3 раза), что связано с ростом нейронов (рисунок 3.4, приложение 2, таблица 2). Однако во все сроки исследования и во всех изученных отделах коры мозга у антенатально алкоголизированных крысят установлено меньшее (на 10-25%) количество нейронов на единицу площади среза (рисунок 3.4, приложение 2, таблица 2). Возможно, это связано с гибелью части нейронов под действием алкоголя еще в период эмбриогенеза. Соответственно, такой дефицит нейронов в коре мозга сохраняется на протяжении всего постнатального онтогенеза.

Так, на 20-е сутки после рождения в 5-м слое коры мозга у алкоголизированных крысят определялось достоверное снижение относительного количества нейронов на единицу площади среза (плотности расположения): в цингулятной коре – на 16%, фронтальной – на 12% и в париетальной коре – на 25% , а на 90-е сутки в цингулятной коре – на 28%, во фронтальной – на 29% и в париетальной – на 26,5% (рисунки 3.4, 3.6; приложение 2, таблица 2).



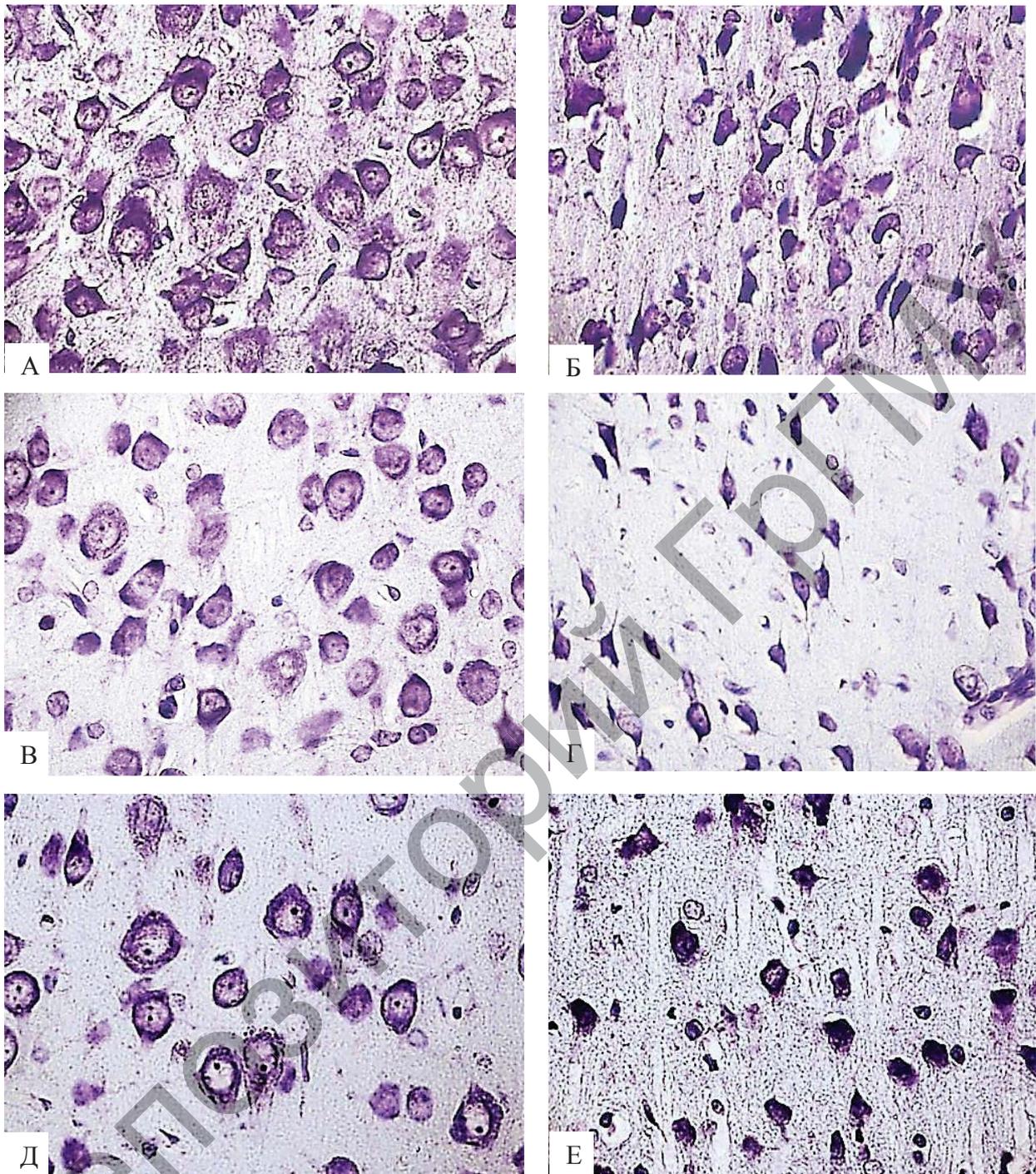
Me±IQR; * – p<0,05 по сравнению с контролем

Рисунок 3.4. – Плотность расположения нейронов в 5-м слое цингулярной (А), фронтальной (Б) и париетальной (В) коры мозга крыс в постнатальном онтогенезе, на площадь 1 мм²



Окраска по Нислю. Цифровая микрофотография. Ув. 400

Рисунок 3.5. – Нейроны 5-го слоя парietальной коры контрольных крысят (А, В, Д) и снижение их относительного количества после антенатальной алкоголизации (Б, Г, Е) на 2-е (А, Б), 5-е (В, Г) и 10-е (Д, Е) сутки после рождения



Окраска по Нислю. Цифровая микрофотография. Ув. 400

Рисунок 3.6. – Нейроны 5-го слоя париетальной коры контрольных крысят (А, В, Д) и снижение их относительного количества после антенатальной алкоголизации (Б, Г, Е) на 20-е (А, Б), 45-е (В, Г), 90-е (Д, Е) сутки после рождения

Степень хроматофилии цитоплазмы

У контрольных животных во все сроки постнатального развития на препаратах, окрашенных по Нисслию, процентное соотношение нейронов по степени хроматофилии цитоплазмы менялось, однако среди них всегда преобладали нормохромные клетки (60-70%). У опытных животных в 5-м слое коры мозга во все сроки было выявлено уменьшение числа нормохромных нейронов и повышение количества патологических форм нейронов (гипер-, гипохромных нейронов и клеток-теней) (рисунки 3.7, 3.8; приложение 2, таблица 3). Наибольшие изменения в изучаемых отделах коры выявлены на 20-90-е сутки постнатального развития. Интересно, что гиперхромные сморщенные нейроны у контрольных животных немногочисленны, а на 90-е сутки вовсе исчезают, а у крыс, подвергавшихся антенатальной алкоголизации, их количество на 20-90-е сутки резко повышено (рисунки 3.9, приложение 2, таблица 3).

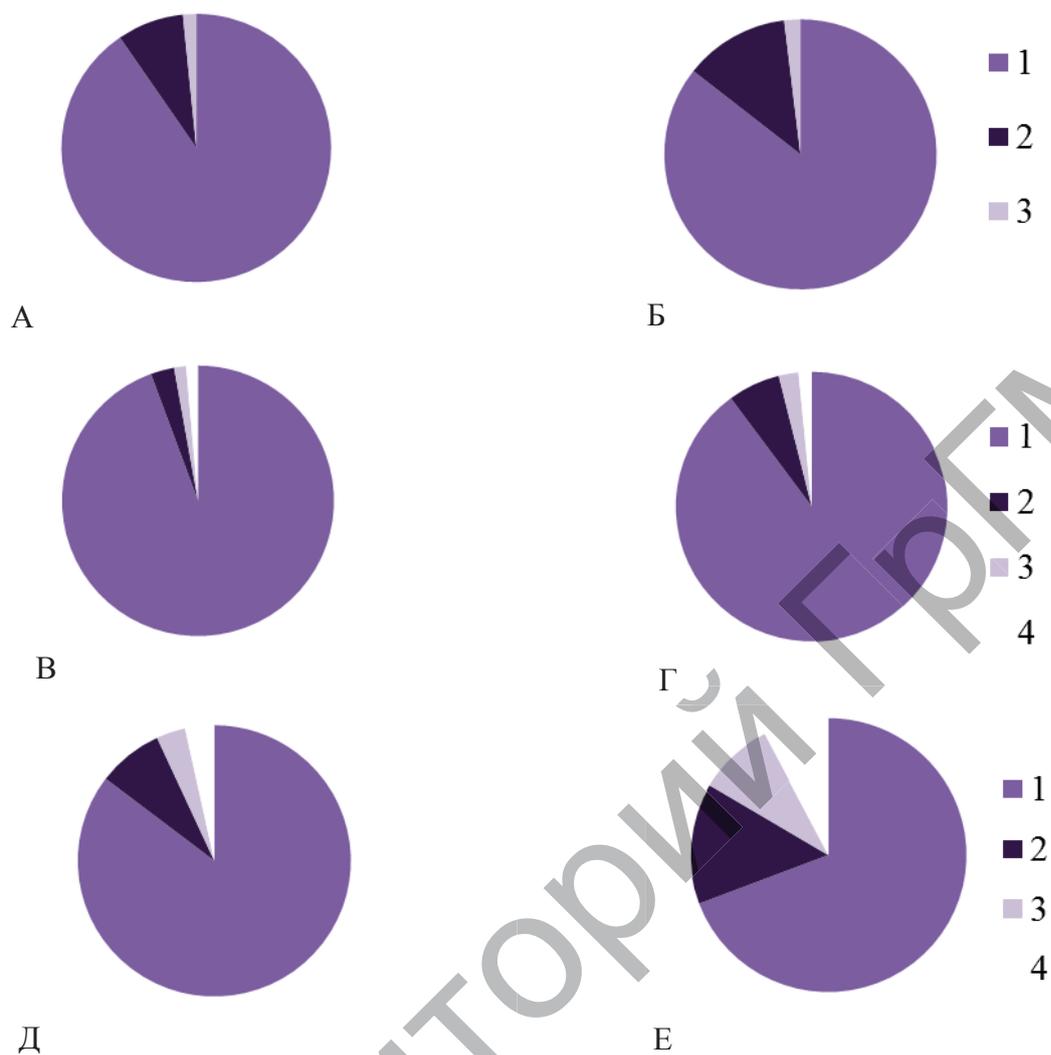


Рисунок 3.7. – Соотношение форм нейронов с разной хроматофилией контрольных (А, В, Д) крысят и после антенатальной алкоголизации (Б, Г, Е),% на 2-е (А, Б), 5-е (В, Г) и 10-е (Д, Е) сутки после рождения во фронтальной коре мозга. 1 – нормохромные нейроны, 2 – гиперхромные, 3 – гипохромные, 4 – клетки-тени

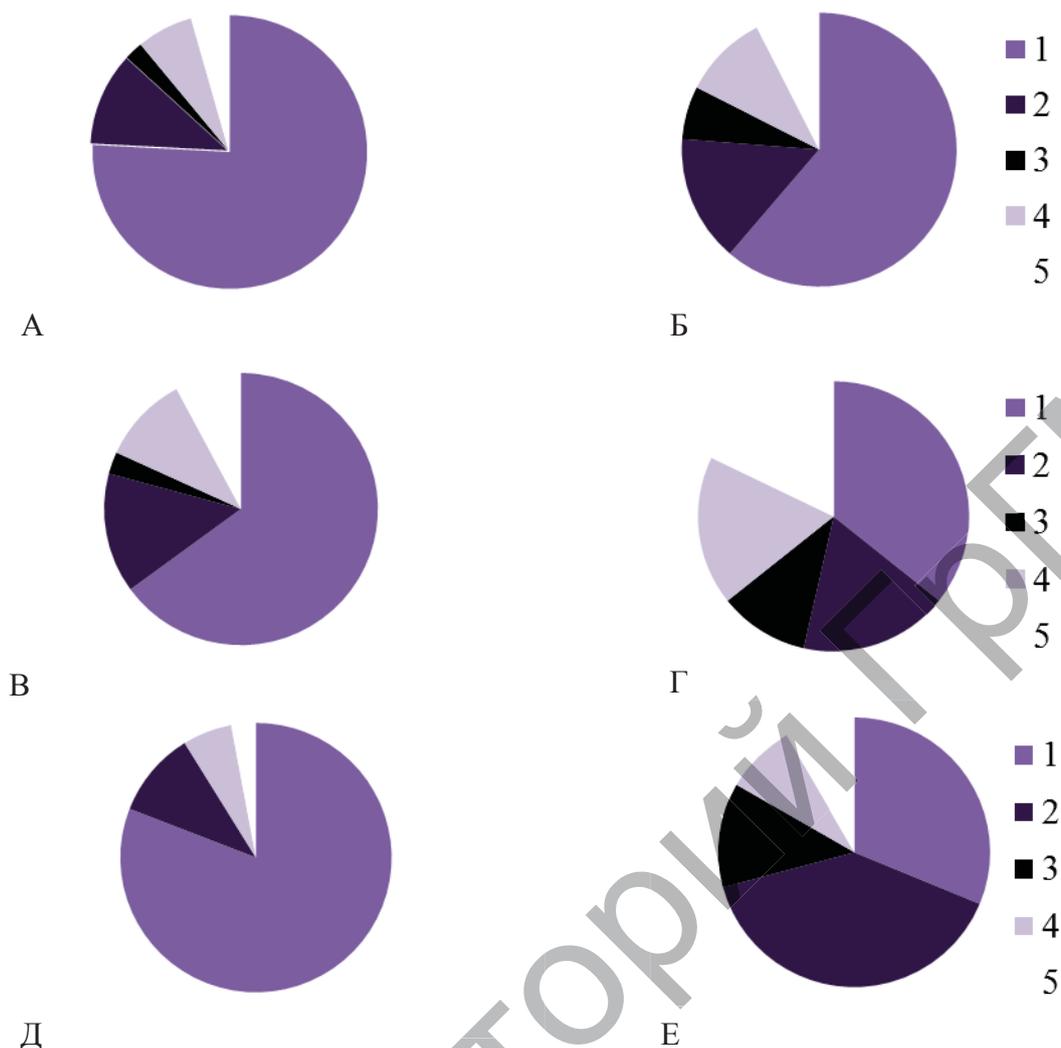
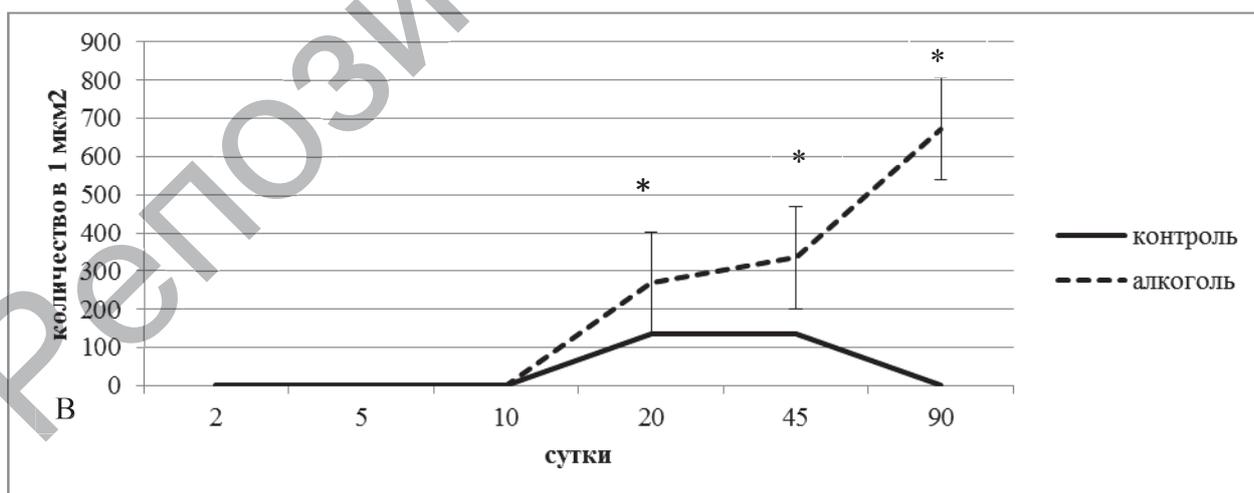
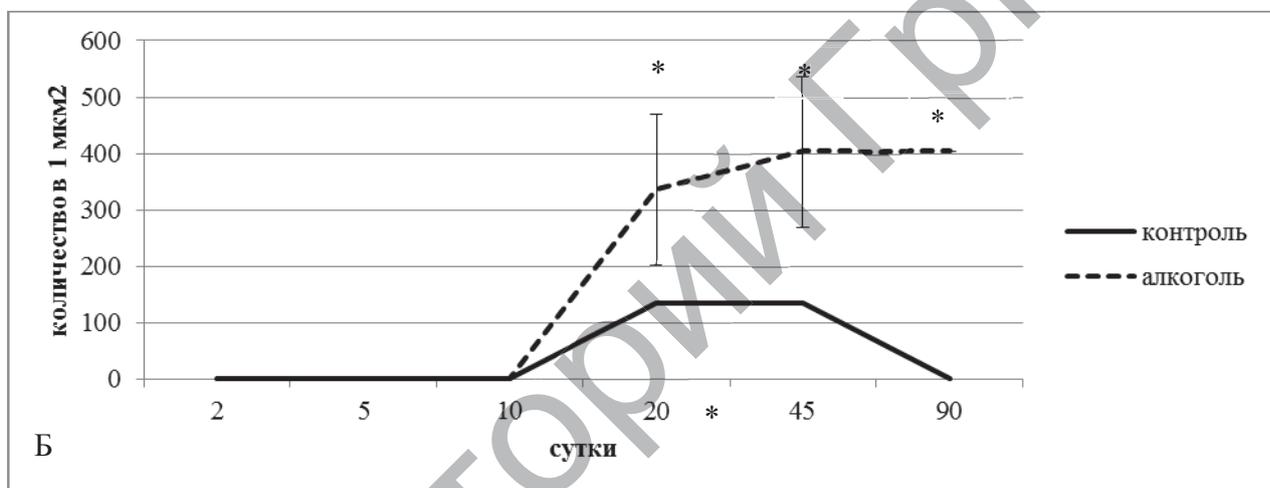
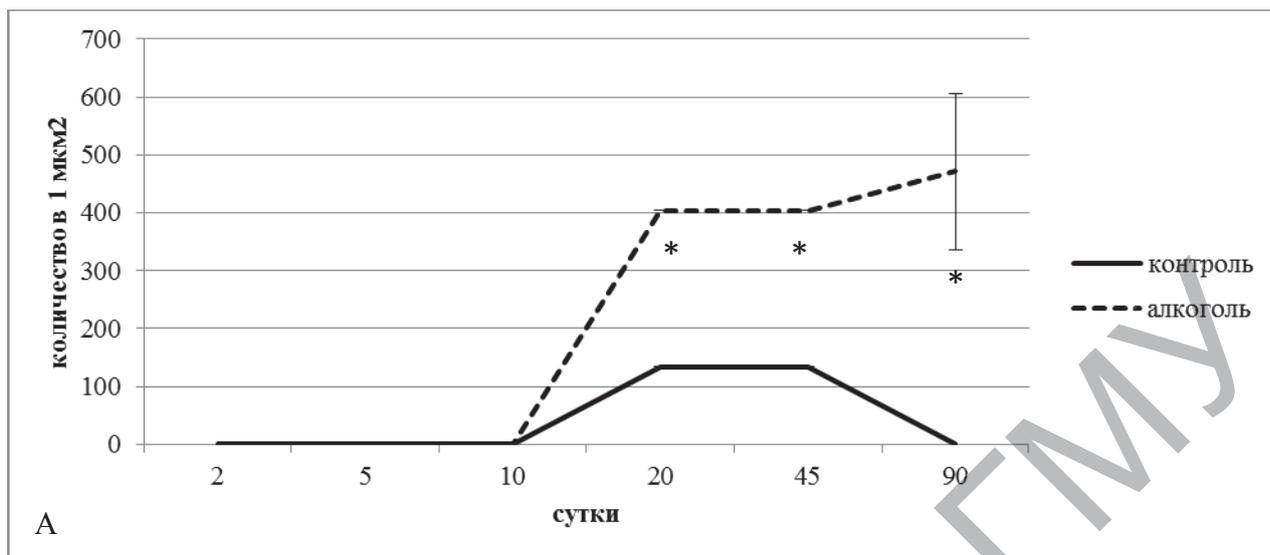


Рисунок 3.8. – Соотношение форм нейронов с разной хромотофилией контрольных (А, В, Д) крысят и после антенатальной алкоголизации (Б, Г, Е), %, на 20-е (А, Б), 45-е (В, Г), и 90-е (Д, Е) сутки после рождения во фронтальной коре мозга. 1 – нормохромные нейроны, 2 – гиперхромные, 3 – гиперхромные сморщенные, 4 – гипохромные, 5 – клетки-тени



Me±IQR; * – p<0,05 по сравнению с контролем

Рисунок 3.9. – Количество гиперхромных сморщенных нейронов в цингулятной (А), фронтальной (Б) и париетальной (В) коре мозга крыс в постнатальном онтогенезе, на площадь 1 мм²

На 2-е сутки после рождения крыс количественный анализ нейронов 5-го слоя коры мозга по степени хромофилии цитоплазмы на препаратах, окрашенных по методу Ниссля, не выявил достоверных различий между контрольной и опытной группами, кроме достоверного снижения количества нормохромных нейронов во фронтальной коре на 21%, и в париетальной – на 25%. На 5-е сутки установлено достоверное снижение числа нормохромных нейронов (в цингулятной коре – на 19%, во фронтальной – на 11%, в париетальной – на 11%) и достоверное увеличение числа гиперхромных несморщенных нейронов во всех изучаемых отделах коры крысят опытной группы: в цингулятной коре – на 38%, во фронтальной коре – на 33% и в париетальной – на 33%. На 10-е сутки отмечено снижение числа нормохромных нейронов (в цингулятной коре – на 22%, во фронтальной – на 36% и в париетальной – на 34%), достоверное увеличение числа гиперхромных несморщенных нейронов (в цингулятной коре – на 33%, во фронтальной – на 31%, в париетальной – на 33%), гипохромных нейронов (в цингулятной коре – на 60%, во фронтальной – на 50%, в париетальной – на 56%) и клеток-теней (в цингулятной коре – на 44%, во фронтальной – на 43%, в париетальной – на 43%) во всех изучаемых отделах коры крысят опытной группы. На 20-е сутки имелось снижение числа нормохромных нейронов (в цингулятной коре – на 33%, во фронтальной – на 29%, в париетальной – на 43%) и достоверное увеличение числа гиперхромных несморщенных нейронов (в цингулятной коре – на 25%, во фронтальной – на 17%), гиперхромных сморщенных (в цингулятной коре – на 67%, во фронтальной – на 60%, в париетальной – на 50%), гипохромных нейронов (в цингулятной коре – на 38%, во фронтальной коре – на 25% и в париетальной – на 50%) и клеток-теней (в цингулятной коре – на 34%, во фронтальной – на 34% и в париетальной – на 50%). На 45-е сутки – снижение числа нормохромных нейронов (в цингулятной коре – на 40%, во фронтальной – на 60% и в париетальной – на 62%) и достоверное увеличение гиперхромных сморщенных (в цингулятной коре – на 67%, во фронтальной коре – на 67%, в париетальной – на 60%), гипохромных нейронов (во фронтальной и париетальной коре – на 20%) и клеток-теней (во фронтальной коре – на 40%, в париетальной – на 33%). На 90-е сутки отмечено снижение числа нормохромных нейронов (в цингулятной коре – на 54%, во фронтальной – на 73% и в париетальной – на 67%) и достоверное увеличение числа гиперхром-

ных несморщенных (в цингулятной коре – на 92%, во фронтальной – на 63% и в париетальной – на 57%) и гиперхромных сморщенных нейронов, которые не встречались в коре мозга контрольных животных (приложение 2, таблица 3).

Размеры и форма перикарионов нейронов

Выявлены изменения *размеров и формы перикарионов нейронов* 5-го слоя коры мозга: на 2-е сутки после рождения установлено достоверное увеличение их максимального и минимального радиуса в цингулятной коре – на 16% и на 8%, соответственно, периметра – на 12%, площади – на 23%, а также фактора элонгации в цингулятной коре на 9%. Во фронтальной коре достоверно увеличены максимальный и минимальный радиус на 8% и на 8%, соответственно, периметр – на 8%, и площадь – на 15%. В париетальной коре достоверно увеличены максимальный и минимальный радиус – на 15 и на 8%, соответственно, периметр – на 15%, площадь – на 29%. На 5-е сутки установлена тенденция к увеличению максимального и минимального радиуса, периметра, площади, а также фактора элонгации во всех изучаемых отделах коры мозга в опытной группе, а на 10-е – тенденция к снижению максимального и минимального радиуса, периметра, площади, а также форм-фактора во всех изучаемых отделах коры мозга в группе «алкоголь».

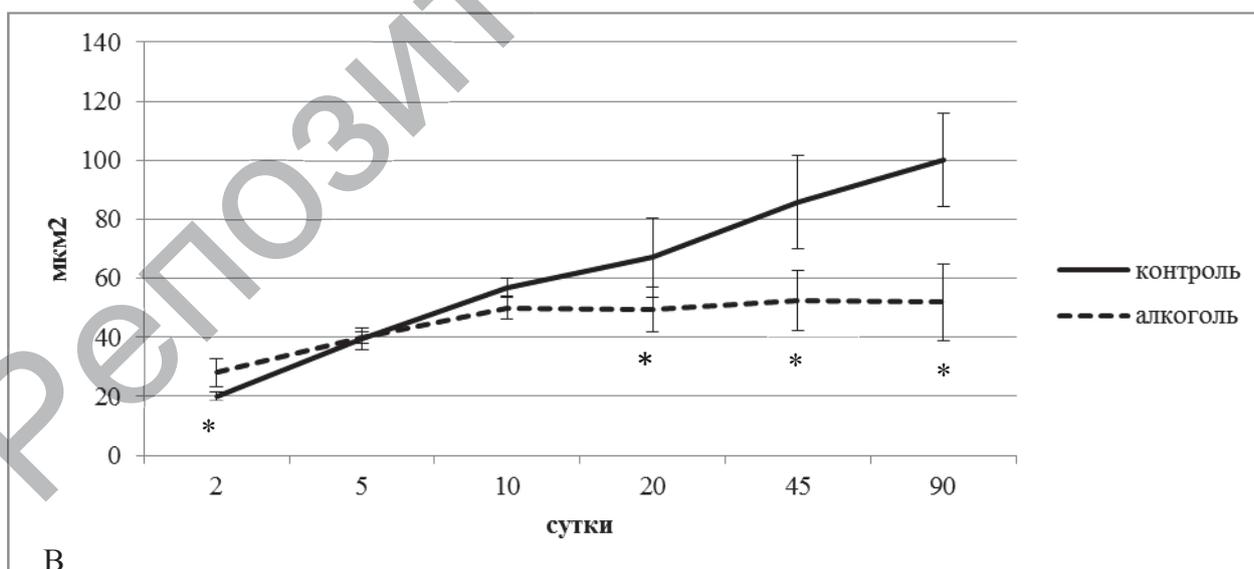
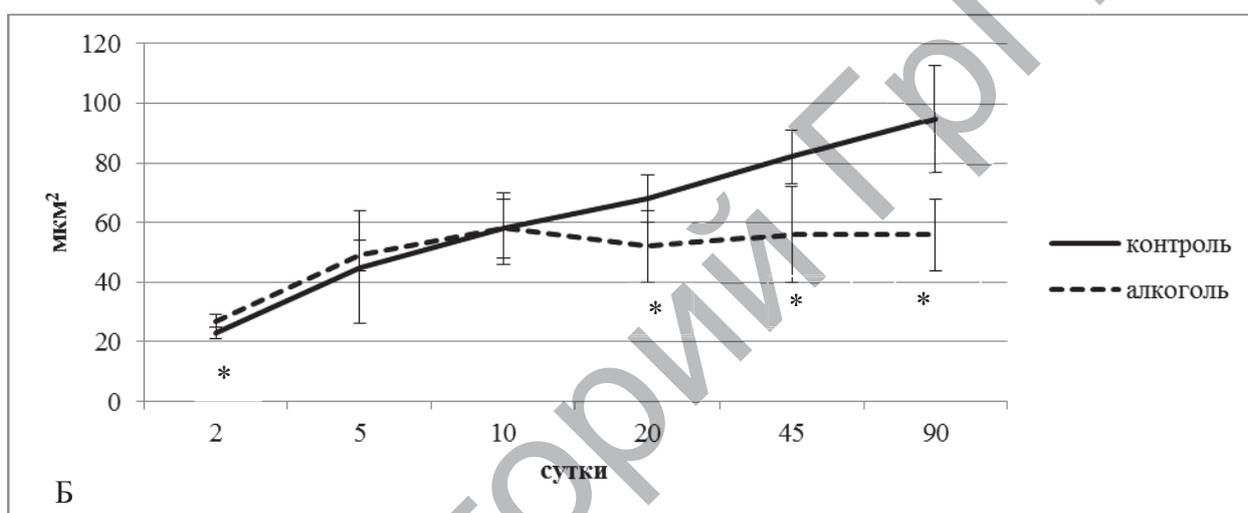
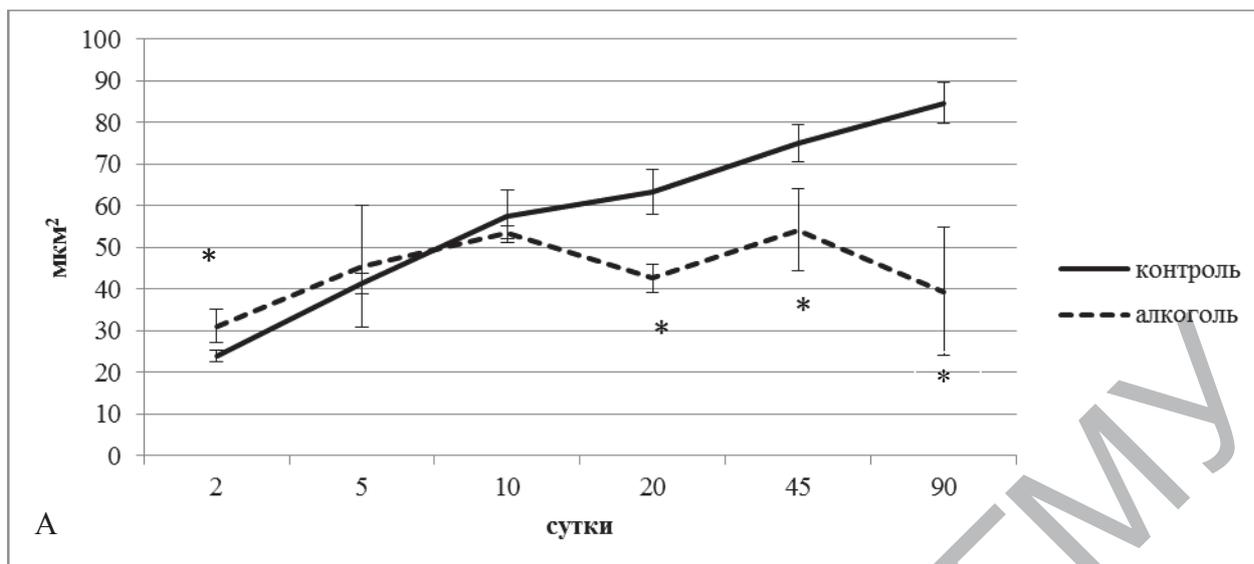
На 20-е сутки в опытной группе выявлено достоверное снижение максимального радиуса (в цингулятной коре – на 15%, во фронтальной – на 10% и в париетальной – на 13%) и минимального радиуса (в цингулятной коре – на 19%, во фронтальной – на 16%, в париетальной – на 22%), площади (в цингулятной коре – на 32%, во фронтальной – на 24%, в париетальной – на 27%), периметра (в цингулятной коре – на 17%, во фронтальной – на 10%, в париетальной – на 18%) во всех изучаемых отделах коры мозга, а в цингулятной коре: форм-фактора – на 3%, и достоверное увеличение фактора элонгации – на 8%. На 45-е сутки – достоверное снижение максимального радиуса (в цингулятной коре – на 8%, во фронтальной – на 13%, в париетальной – на 25%) и минимального радиуса (в цингулятной коре – на 27%, во фронтальной – на 33%, в париетальной – на 26%), площади (в цингулятной коре – на 28%, во фронтальной – на 32%, в париетальной – на 40%), периметра (в цингулятной коре – на 12%, во фронтальной – на 15%, в париетальной – на 20%) во всех изучаемых отделах коры мозга,

а в цингулятной коре: форм-фактора – на 7%, достоверное увеличение фактора элонгации – на 14%. *На 90-е сутки:* достоверное снижение максимального (в цингулятной коре – на 16%, во фронтальной – на 24%, в париетальной – на 14%) и минимального радиуса (в цингулятной коре – на 42,5%, во фронтальной – на 27%, в париетальной – на 35%), площади (в цингулятной коре – на 54%, во фронтальной – на 41% и в париетальной – на 52%), периметра (в цингулятной коре – на 23%, во фронтальной – на 27% и в париетальной – на 24%), форм-фактора (в цингулятной коре – на 9%, во фронтальной – на 3,5%, в париетальной – на 10%), достоверное увеличение фактора элонгации в париетальной коре – на 20% (приложение 2, таблица 4).

Особенно интересные данные получены при изучении динамики размеров нейронов. Так, у контрольных животных площадь перикарионов прогрессивно нарастала (в 4-5 раз со 2-х по 90-е сутки). У опытных животных выявлено временное увеличение площади перикарионов нейронов 5-го слоя опытной группы на 2-е сутки, что может быть связано с их набуханием в результате отека коры. Именно в этот срок установлена наибольшая корреляция между толщиной коры и площадью тел нейронов ($r=0,98$; $p<0,01$). Однако на 20-90-е сутки постнатального развития размеры нейронов становились достоверно меньше по сравнению с контролем (рисунок 10). В то время как размеры тел нейронов у контрольных животных с 20-х по 90-е сутки прогрессивно нарастают, у крыс, подвергшихся антенатальной алкоголизации, их рост после 10-20-го дня постнатального развития останавливается (рисунок 3.10, приложение 2, таблица 4). При этом наблюдается отрицательная корреляция между площадью нейронов и числом гиперхромных сморщенных клеток ($r=-0,87-0,98$; $p<0,05$).

Проведенное исследование показало, что пренатальное воздействие алкоголя ведет к стойким, а иногда и прогрессирующим гистологическим нарушениям нейронов коры мозга крыс в постнатальном онтогенезе. В целом это соответствует данным предыдущих исследований [Miller, 1991, 1993, Артюхина, 1986, 1988].

Выявленные структурные изменения могут лежать в основе известных неврологических и поведенческих нарушений у животных после антенатальной алкоголизации. Поведенческие нарушения включают когнитивные, сенсомоторные и эмоциональные расстройства.



Me±IQR; * – p<0,05 по сравнению с контролем

Рисунок 3.10. – Динамика площади перикарионов нейронов 5-го слоя цингулятной (А), фронтальной (Б), и париетальной (В) коры мозга крыс в постнатальном онтогенезе

К неврологическим дисфункциям, вызванным антенатальной алкоголизацией, относятся слуховая дисфункция, задержка речи, неспособность к обобщению и обучению. Полагают, что антенатальная алкоголизация снижает выживаемость нейронов и нарушает их функции двумя основными путями: 1) этанол действует как нейротоксин, вызывая окислительный стресс, повреждение ДНК и митохондриальную дисфункцию; 2) подавляет сигналы инсулина, необходимые для обеспечения жизнеспособности, метаболизма, формирования синапсов и синтеза ацетилхолина на уровне рецепторов инсулина, нарушая связывание с рецептором, и повышает активность фосфатаз. То есть хроническое внутриутробное воздействие этанола приводит к состоянию инсулинорезистентности в ЦНС [de la Monte, 2012].

Выводы. Таким образом, антенатальное или раннее постнатальное воздействие этанола на развивающийся организм вызывает значительные и разнообразные микроскопические изменения во всех изученных структурах коры большого мозга, зависящие от дозы и сроков воздействия этанола. Выявлены грубые нарушения развития нервной трубки и мозговых пузырей, недоразвитие определённых структур мозга, нарушение миграции нейробластов, процессов созревания нейронов, массовый апоптоз и деструкция нервных клеток в разных отделах мозга, с появлением очагов выпадения нейронов [Зиматкин, 2014а; Зиматкин, 2014б].

Антенатальная алкоголизация индуцирует глубокие гистологические изменения в коре головного мозга крыс, которые в постнатальном онтогенезе носят волнообразный, необратимый, а иногда и прогрессирующий характер. Так, выявлено увеличение (2-, 5-е сутки), а затем уменьшение толщины коры (на 10-е и 90-е сутки) и размеров нейронов (20-90-е сутки), снижение относительного количества нейронов 5-го слоя коры, уменьшение числа нормохромных форм и увеличение числа патологических форм нейронов во все сроки исследования. Установлены и такие важные факты, как остановка роста и прогрессивное сморщивание нейронов фронтальной коры мозга с 20-го дня постнатального развития крыс. Нами показано, что эти изменения сохраняются, по крайней мере, до 90-х суток [Бонь, 2015, 2016, Зиматкин, 2016а]. Данные нарушения объясняют многие функциональные дефициты, наблюдающиеся при ФАС.

Глава 4

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В МОЗГЕ ПОСЛЕ АНТЕНАТАЛЬНОЙ АЛКОГОЛИЗАЦИИ

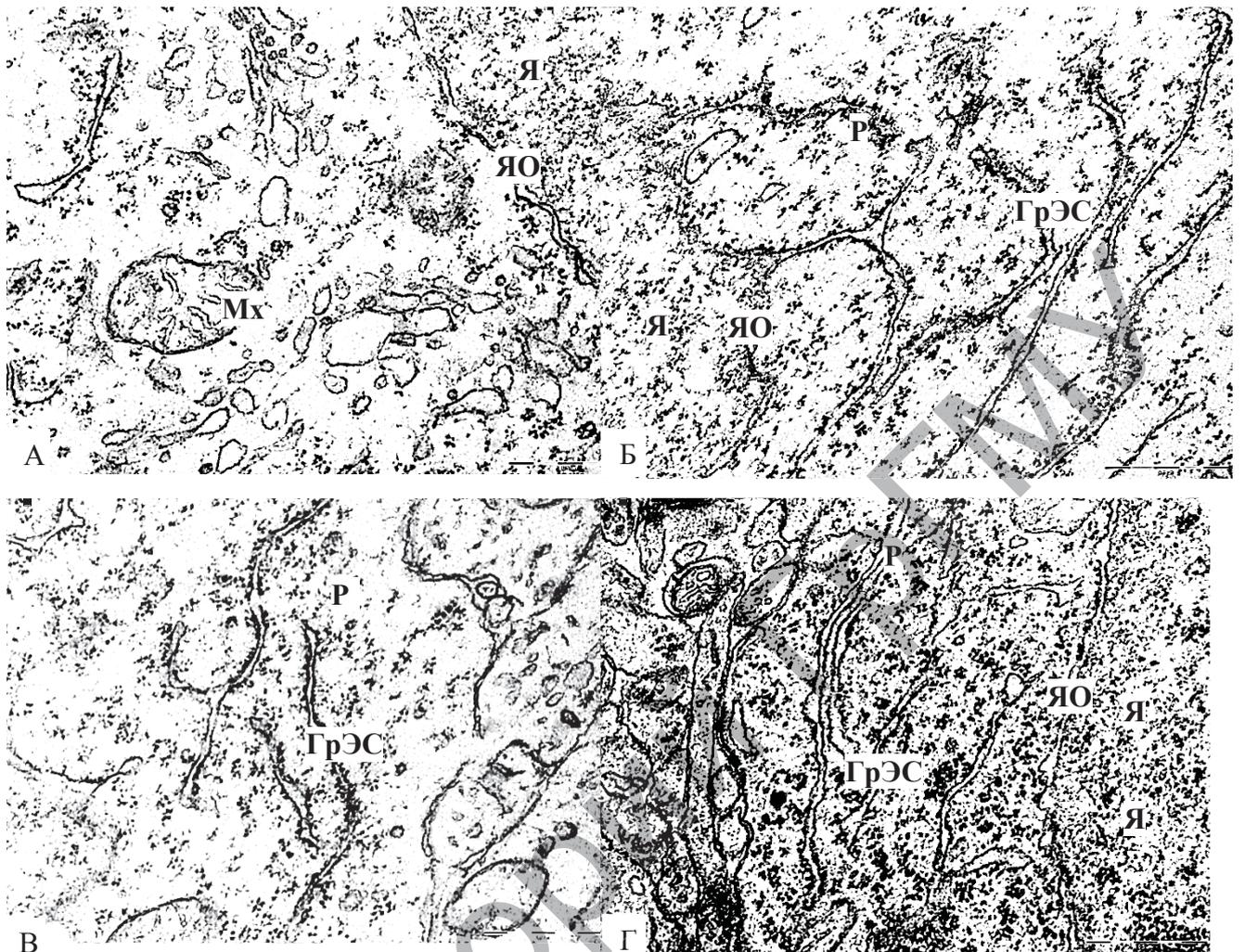
В многолетних систематических исследованиях Э. Н. Поповой изучены постнатальные изменения ультраструктуры сенсомоторной коры у потомства, рожденного от крыс, подвергавшихся умеренной алкоголизации во время беременности. Найдены 3 категории ультраструктурных сдвигов: задержка созревания корковых структур, их деструктивные изменения и признаки репаративных процессов, имеющие свою динамику в постнатальном онтогенезе. Высказана гипотеза о важной роли гипоксически-ишемического фактора в патогенезе алкогольных поражений мозга у потомства [Попова, 2010]. Среди нейронов имелись клетки, напоминающие незрелые, а также гипохромные и гиперхромные нейроны. В нейронах коры мозга крыс пренатальное воздействие этанола вызвало задержку созревания нейронов и их дендритов, дистрофические и деструктивные изменения, повреждение ядра и комплекса Гольджи, набухание митохондрий и проявления репаративного, компенсаторно-приспособительного характера, которые нарастают к 60-му дню после рождения [Попова, 1988, 2010; Артюхина, 1989].

При электронной микроскопии в головном мозге крыс после антенатальной алкоголизации выявлялись также нейроны с повышенной электронно-плотной цитоплазмой, гомогенизированным ядерным хроматином, нечеткими границами цитоплазмы и редуцированной системой эндоплазматического ретикулума в виде мелких, неравномерно расположенных цистерн [Малахова, 2012]. Заметно изменена ультраструктура нейронов и нейропиля в сенсомоторной коре 30-дневного потомства. Определялась дезорганизация цистерн комплекса Гольджи, который вместе с лизосомами занимает большую часть цитоплазмы нейронов. В нейропиле меньшая площадь у дендритов, особенно у дендритных стволов, и большая – у аксонных профилей. Значимо увеличивается число асимметричных синапсов [al-Rabiai, 1989].

Результаты собственного электронно-микроскопического исследования

Во все сроки исследования у контрольных крысят во внутреннем пирамидном слое фронтальной коры преобладают нормохромные нейроны. Для них характерно наличие крупного, богатого эухроматином клеточного ядра с эксцентрично расположенным ядрышком. Небольшие глыбки гетерохроматина располагаются равномерно по всей кариоплазме. На 5-е сутки после рождения наблюдалось расширение перинуклеарного пространства. В цитоплазме выявляются каналцы гранулярной эндоплазматической сети (ГрЭС) с небольшим количеством рибосом и умеренное количество митохондрий, чьи кристы не всегда хорошо выражены. Выявлены и делящиеся митохондрии. Цистерны комплекса Гольджи на данном этапе постнатального развития еще не сформированы. В цитоплазме диффузно распределены свободные рибосомы в умеренном количестве, гиалоплазма имеет очень низкую электроную плотность (рисунок 4.1). В целом, нейроны контрольных животных имели нормальную ультраструктуру, типичную для больших пирамидных нейронов коры мозга крыс на 5-е сутки постнатального развития [Sato, 2012].

В цитоплазме нейронов 5-суточных крысят, перенесших пренатальную алкоголизацию, увеличивается общее количество рибосом, – как свободных, так и связанных. Цистерны ГрЭС часто образуют необычную сетевидную структуру, просвет их каналцев иногда неравномерно суживается и расширяется. Длина цистерн значительно больше, чем в контроле. Наблюдается полиморфизм митохондрий (рисунок 4.1).



■ Ядро (Я), ядерная оболочка (ЯО), митохондрии (Мх), рибосомы (Р), гранулярная эндоплазматическая сеть (ГрЭС). Множество свободных рибосом и большая протяженность цистерн ГрЭС в опытной группе.

Масштабный отрезок равен 0,5 мкм. Электронограмма. Ув. 50000

Рисунок 4.1. – Фрагмент нейрона 5-го слоя фронтальной коры мозга 5-суточных контрольных (А, В) и пренатально алкоголизированных крысят (Б, Г)

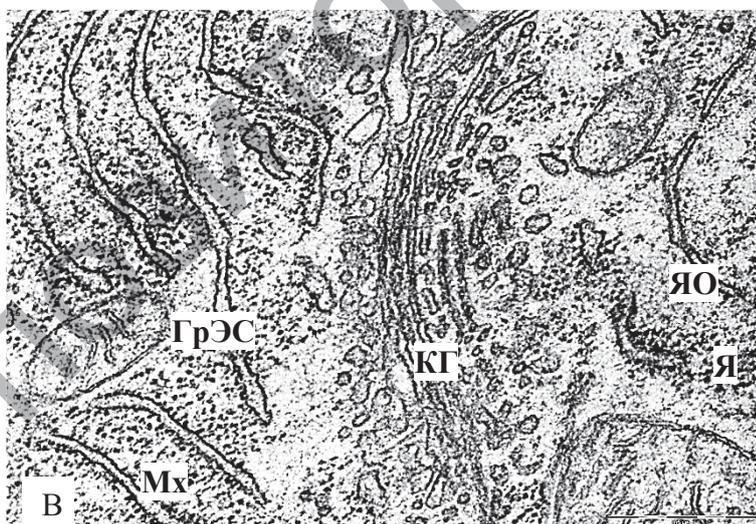
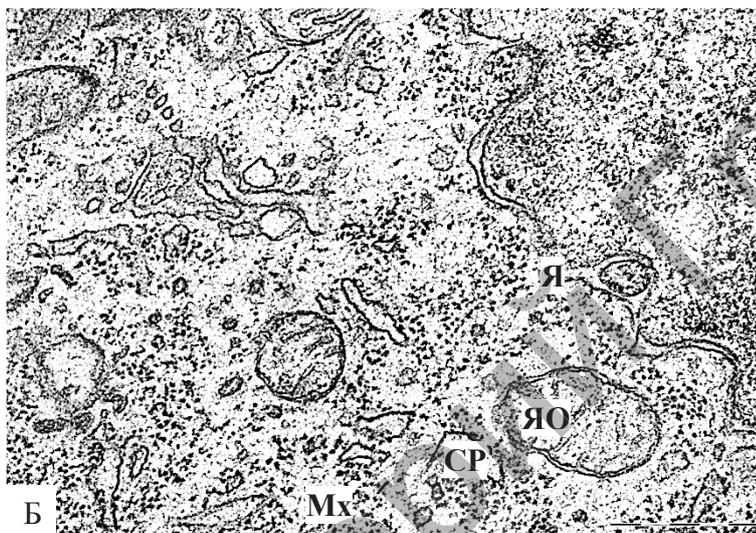
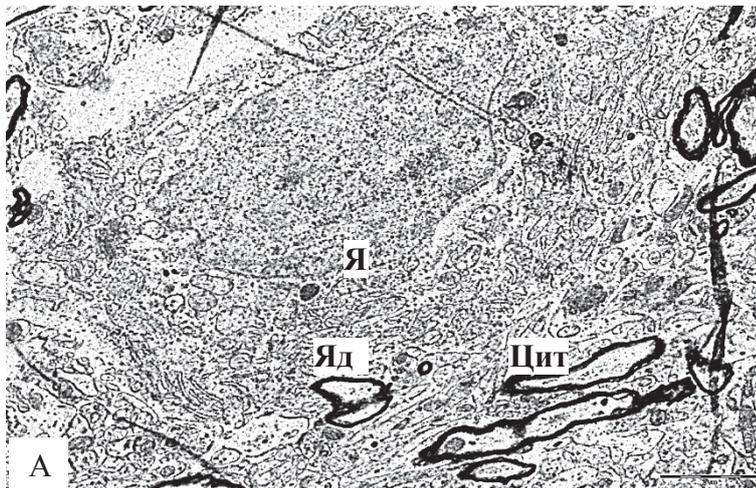
В цитоплазме нормохромных нейронов контрольных животных на 20-е сутки после рождения выявляются узкие каналцы гранулярной эндоплазматической сети (ГрЭС) с большим количеством связанных рибосом и умеренное количество митохондрий с хорошо выраженными кристами (рисунок 4.2, Б, В). Интересно, что митохондрии имеют большие размеры и меньшее количество крист, чем у взрослых животных. Сформированный Комплекс Гольджи, представленный стопками уплощенных цистерн разной протяженности, располагается в перинуклеарной зоне. В цитоплазме диффузно рас-

пределены свободные рибосомы и полисомы в умеренном количестве (рисунок 4.2, Б, В).

Нормохромные нейроны 20-суточных крысят, перенесших пренатальную алкоголизацию, характеризуются рядом отличительных черт. Так, комплекс Гольджи часто имеет кольцевидную или даже спиральную форму, цистерны ГрЭС иногда необычно сближены и почти лишены рибосом, располагаются параллельно. Увеличивается относительное количество свободных рибосом (рисунок 4.3).

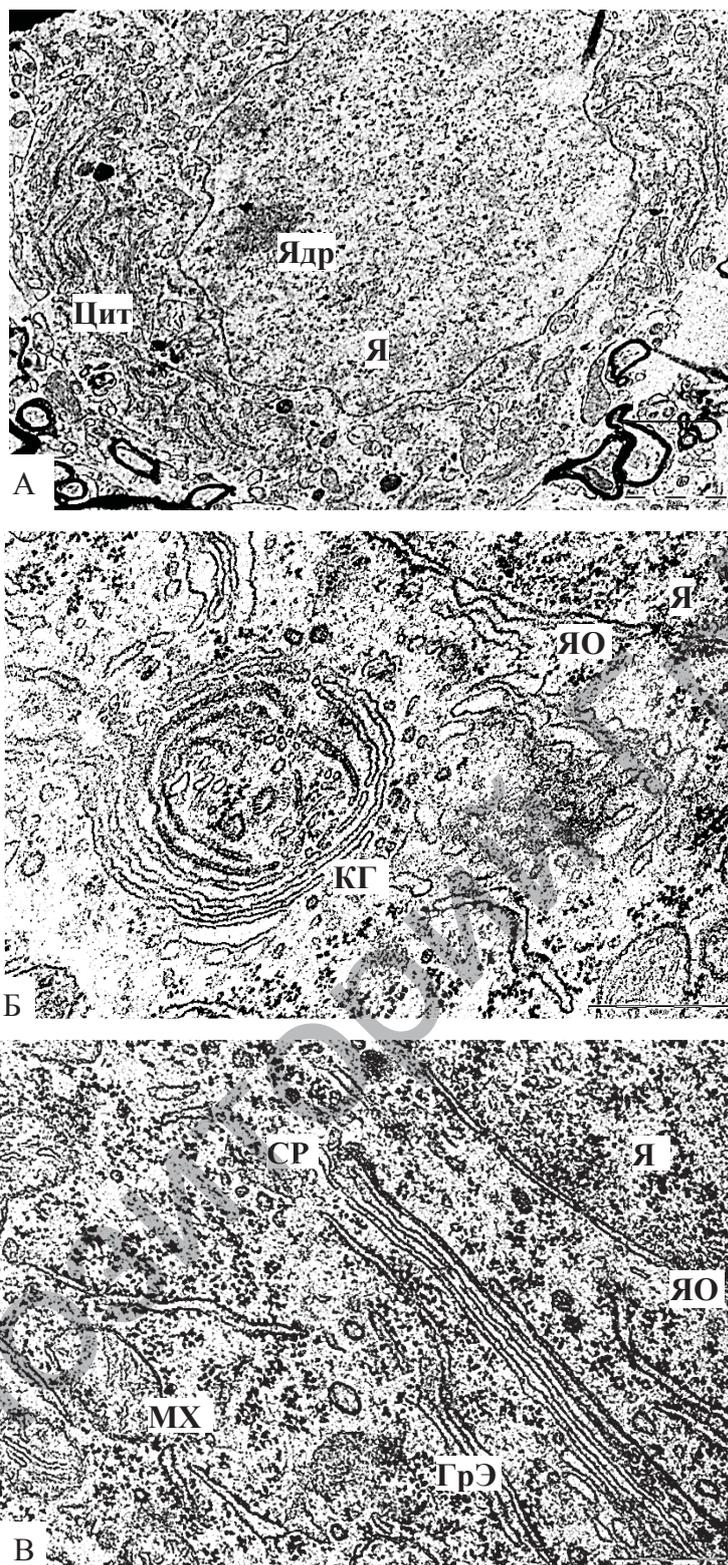
Гиперхромные сморщенные нейроны у потомства алкоголизованных животных имеют темное, складчатое ядро и цитоплазму (рисунок 4.4, А). В них наблюдаются дезорганизация и деструктивные изменения органелл (рисунок 4.4, Б, В). Канальцы ГрЭС содержат мало рибосом, цистерны комплекса Гольджи расширены, митохондрии набухшие, без крист, с осмиофильным матриксом. Преобладают свободные рибосомы, образующие обширные скопления. В гиалоплазме встречаются чёрные участки с гомогенным гипросмиофильным содержимым, и её общая осмиофилия цитоплазмы значительно выше (рисунок 4.4, Б, В). Это определяет темную окраску гиперхромных нейронов на электронограммах. Описанная ультраструктура гиперхромных нейронов аналогична той, что выявляется и на более поздние сроки постнатального развития у потомства крыс, получавших алкоголь во время беременности.

Установлено, что у крысят, подвергавшихся антенатальной алкоголизации, количества митохондрий на единицу площади цитоплазмы на 20-е сутки значительно меньше, чем в контроле. При этом размеры митохондрий не отличались от контроля, но они стали более сферичными и менее вытянутыми, а количество и длина крист на 1 мкм^2 митохондрий были ниже (рисунок 4.5, приложение 2, таблица 5). Общее количество рибосом на единицу площади цитоплазмы нейронов и содержание РНП в цитоплазме у животных, подвергавшихся антенатальной алкоголизации, было несколько выше, чем в контроле. При этом относительное количество свободных рибосом было значительно выше, а связанных – значительно ниже, чем в контроле. Относительное количество лизосом на единицу площади цитоплазмы и их размеры у пренатально алкоголизованных крыс значительно увеличены (рисунок 4.5, приложение 2, таблица 5). Соответственно, в цитоплазме нейронов опытных крыс повышена и активность маркерного фермента лизосом КФ.



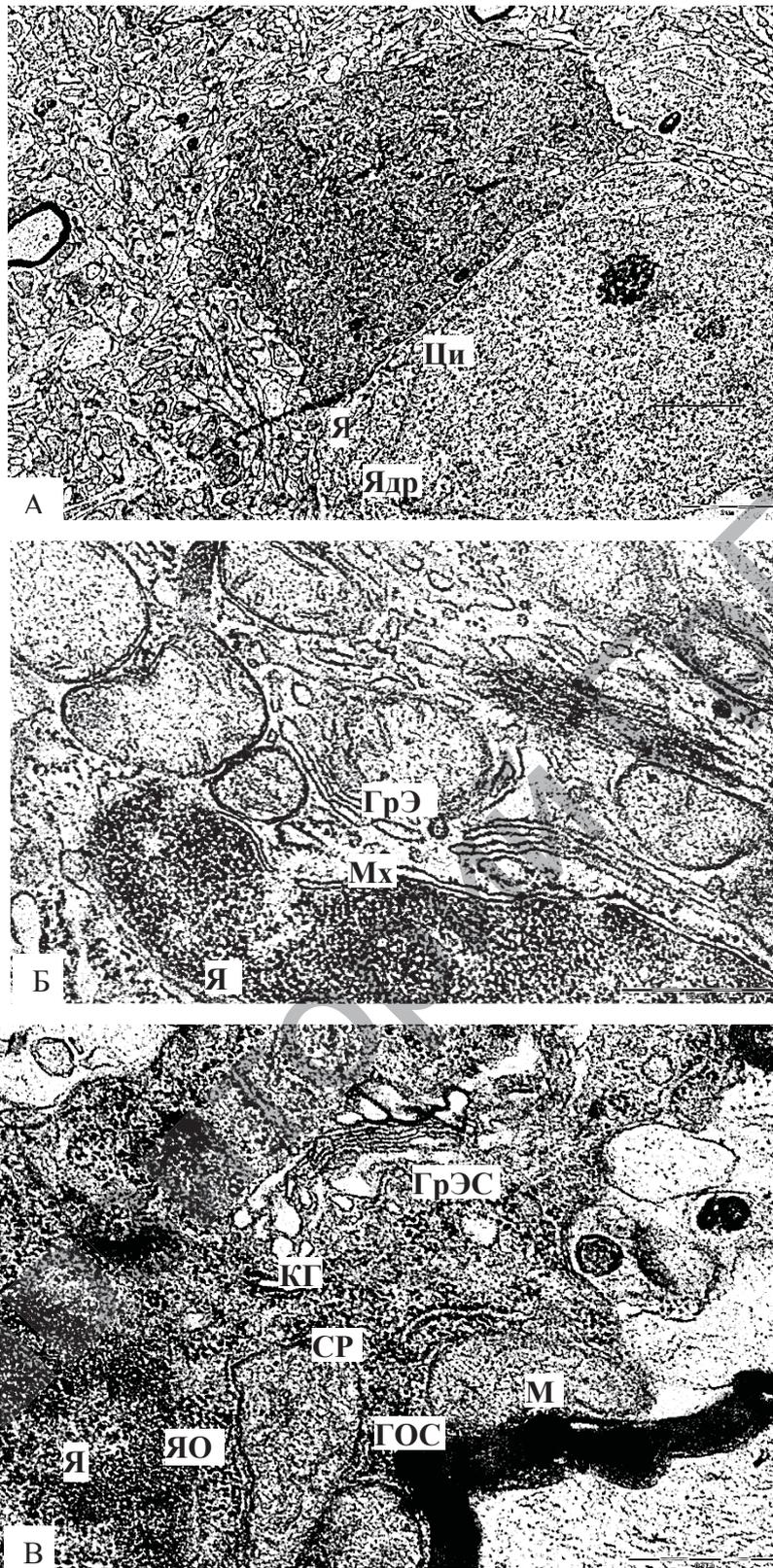
Ядро нейрона (Я), ядерная оболочка (ЯО), митохондрии (Мх), гранулярная эндоплазматическая сеть (ГрЭС), свободные рибосомы (СР), комплекс Гольджи (КГ), цитоплазма (Цит). Масштабный отрезок: А – 2 мкм, Б, В – 0,5 мкм. Электронограмма.
Ув.: А – 8000, Б, В – 50000

Рисунок 4.2. – Нейроны внутреннего пирамидного слоя фронтальной коры контрольных 20-суточных крыс. А – общий вид нейрона. Б, В – фрагменты ядра и цитоплазмы нейрона



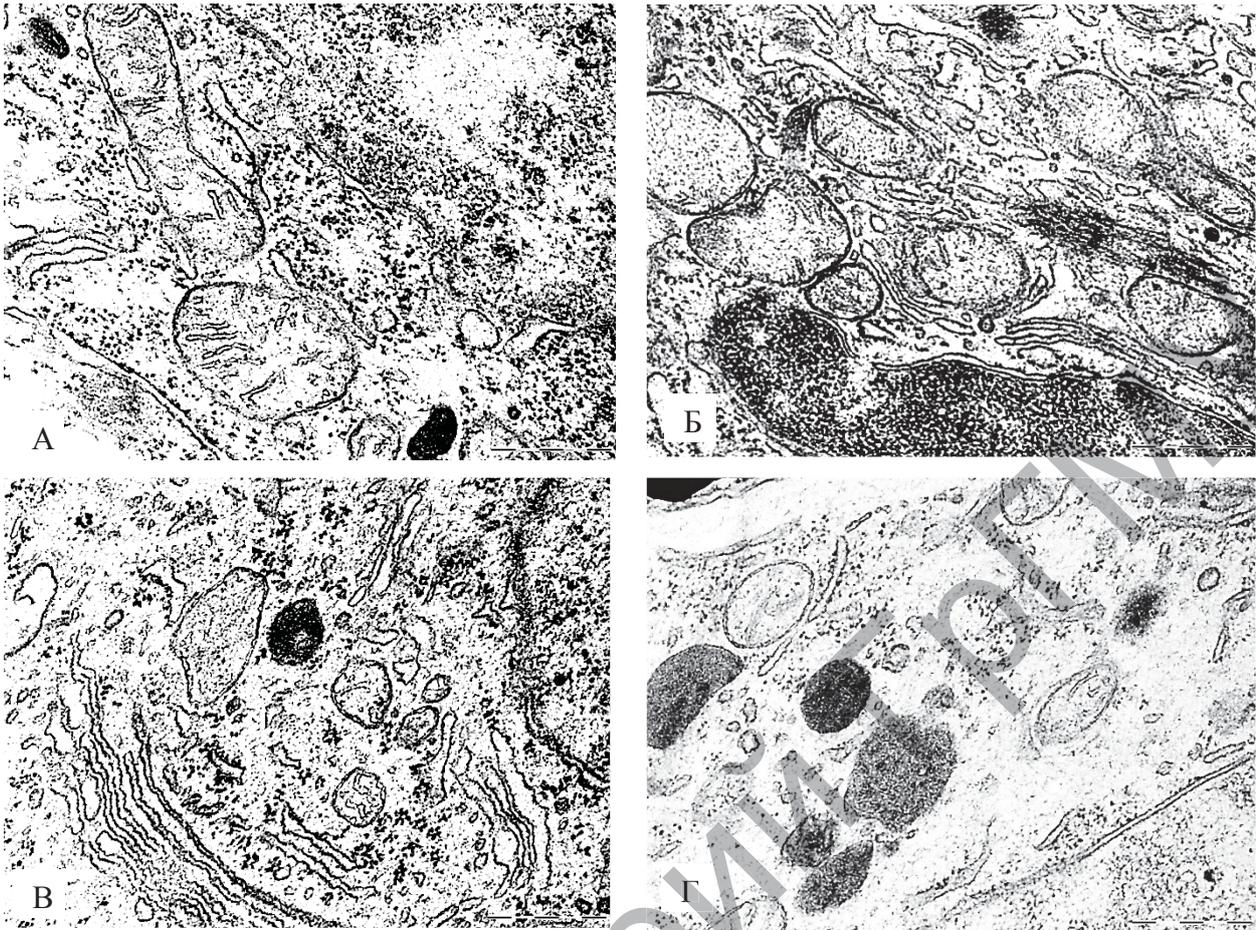
Ядро нейрона (Я), ядерная оболочка (ЯО), митохондрии (Мх), гранулярная эндоплазматическая сеть (ГрЭС), свободные рибосомы (СР), комплекс Гольджи (КГ), цитоплазма (Цит). Масштабный отрезок: А – 2 мкм, Б, В – 0,5 мкм. Электронограмма.
Ув.: А – 8000, Б, В – 50000

Рисунок 4.3. – Нормохромные нейроны внутреннего пирамидного слоя фронтальной коры 20-суточных крыс, подвергавшихся антенатальной алкоголизации. А – общий вид нейрона. Б, В – фрагменты ядра и цитоплазмы нейрона



Ядро нейрона (Я), ядерная оболочка (ЯО), митохондрии (Мх), гранулярная эндоплазматическая сеть (ГрЭС), свободные рибосомы (СР), гомогенное гиперосмиофильное содержимое (ГОС), комплекс Гольджи (КГ), цитоплазма (Цит). Масштабный отрезок: А – 2 мкм, Б, В – 0,5 мкм. Электронограмма. Ув.: А – 8000, Б, В – 50000.

Рисунок 4.4. – Гиперхромные сморщенные нейроны внутреннего пирамидного слоя фронтальной коры 20-суточных крыс, подвергавшихся антенатальной алкоголизации. А – общий вид нейрона. Б, В – фрагменты ядра и цитоплазмы нейрона



Ядро нейрона (Я), ядерная оболочка (ЯО), митохондрии (Мх), лизосомы (Л). Масштабный отрезок равен 0,5 мкм. Электронограмма. Ув. 50000

Рисунок 4.5. – Фрагмент нейрона 5-го слоя фронтальной коры мозга 20-суточных контрольных (А, В) и пренатально алкоголизированных крысят (Б, Г)

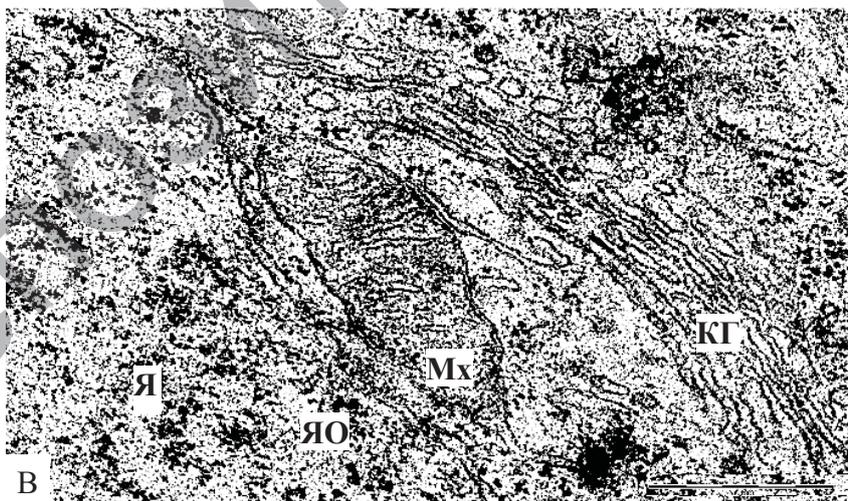
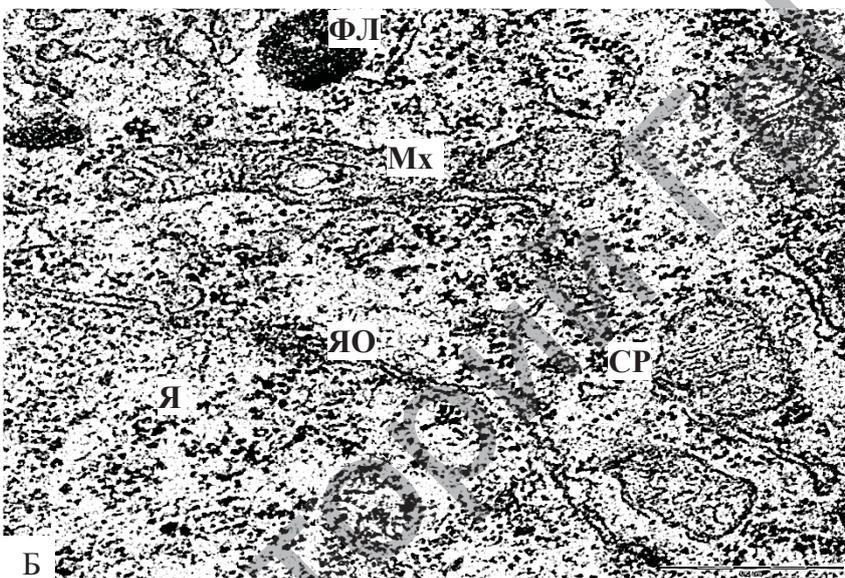
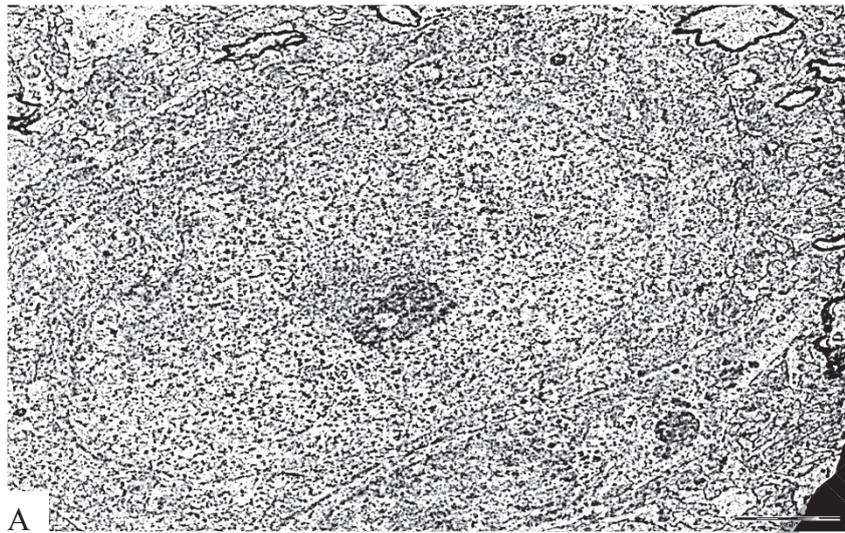
На 45-е сутки после рождения в цитоплазме нормохромных нейронов выявляются узкие каналцы гранулярной эндоплазматической сети (ГрЭС) и умеренное количество митохондрий с четкими кристами. Комплекс Гольджи, представленный стопками уплощенных цистерн разной протяженности, располагается в перинуклеарной зоне. В цитоплазме нейронов выявляются редкие первичные лизосомы и фаголизосомы. В цитоплазме диффузно распределены свободные рибосомы и полисомы (рисунок 4.6, Б, В).

У 45-суточных крысят, перенесших пренатальную алкоголизацию, часто выявляются гиперхромные несморщенные нейроны (рисунок 4.7, А). Их цитоплазма содержит более многочисленные цистерны ГрЭС, покрытые рибосомами, и повышенное число свободных рибосом. Эти нейроны содержат меньшее количество ми-

тохондрий, чем нормохромные нейроны контрольных животных (рисунок 4.7, Б, В).

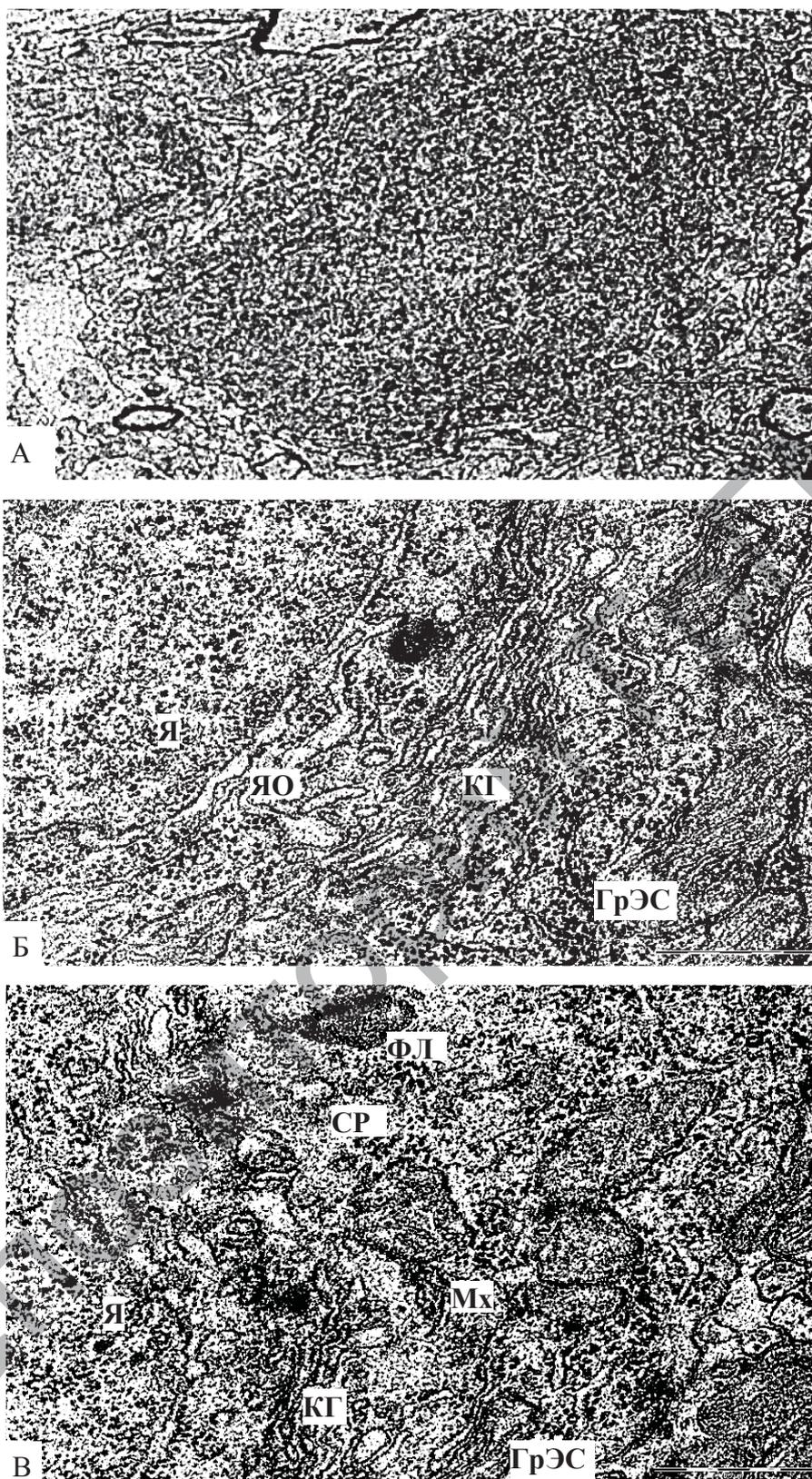
Гиперхромные сморщенные нейроны имеют темные складчатые ядра и осмиофильную цитоплазму со множеством складок (рисунок 4.8, А). В них наблюдаются дезорганизация и деструктивные изменения органелл. Цистерны ГрЭС и комплекса Гольджи еще более расширены по сравнению с гиперхромными несморщенными клетками. Преобладают свободные рибосомы, образующие обширные скопления. Митохондрии набухшие, с разрушенными кристами. В цитоплазме встречаются участки с гомогенным осмиофильным содержимым (рисунок 4.8, Б, В).

Во внутреннем пирамидном слое фронтальной коры мозга антенатально алкоголизированных крыс встречаются гипохромные, светлые клетки. Их перинуклеарное пространство расширено, цитоплазма бедна органеллами, почти не встречается ГрЭС, свободных рибосом мало. В цитоплазме имеются набухшие митохондрии с разрушенными кристами (рисунок 4.9).



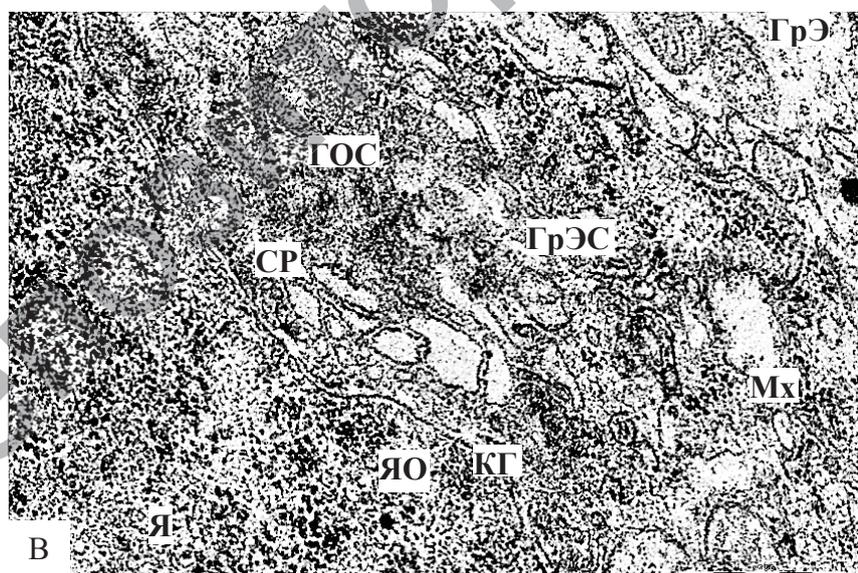
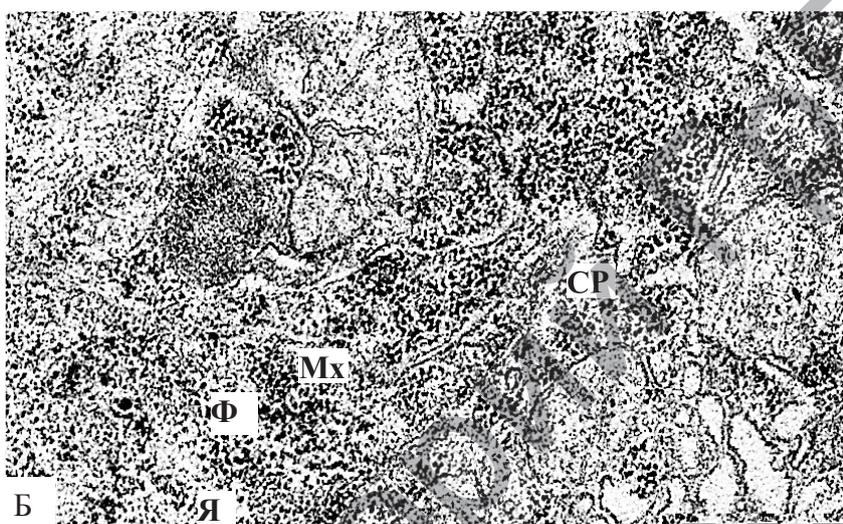
Ядро (Я), ядерная оболочка (ЯО), митохондрии (Мх), фаголизосома (ФЛ), свободные рибосомы (СР), комплекс Гольджи (КГ). Масштабный отрезок: А – 2 мкм, Б, В – 0,5 мкм. Электронограмма. Ув.: А – 8000, Б, В – 50000.

Рисунок 4. 6. – Нейроны внутреннего пирамидного слоя фронтальной коры контрольных 45-суточных крыс. А – общий вид нейрона. Б, В – фрагменты ядра и цитоплазмы



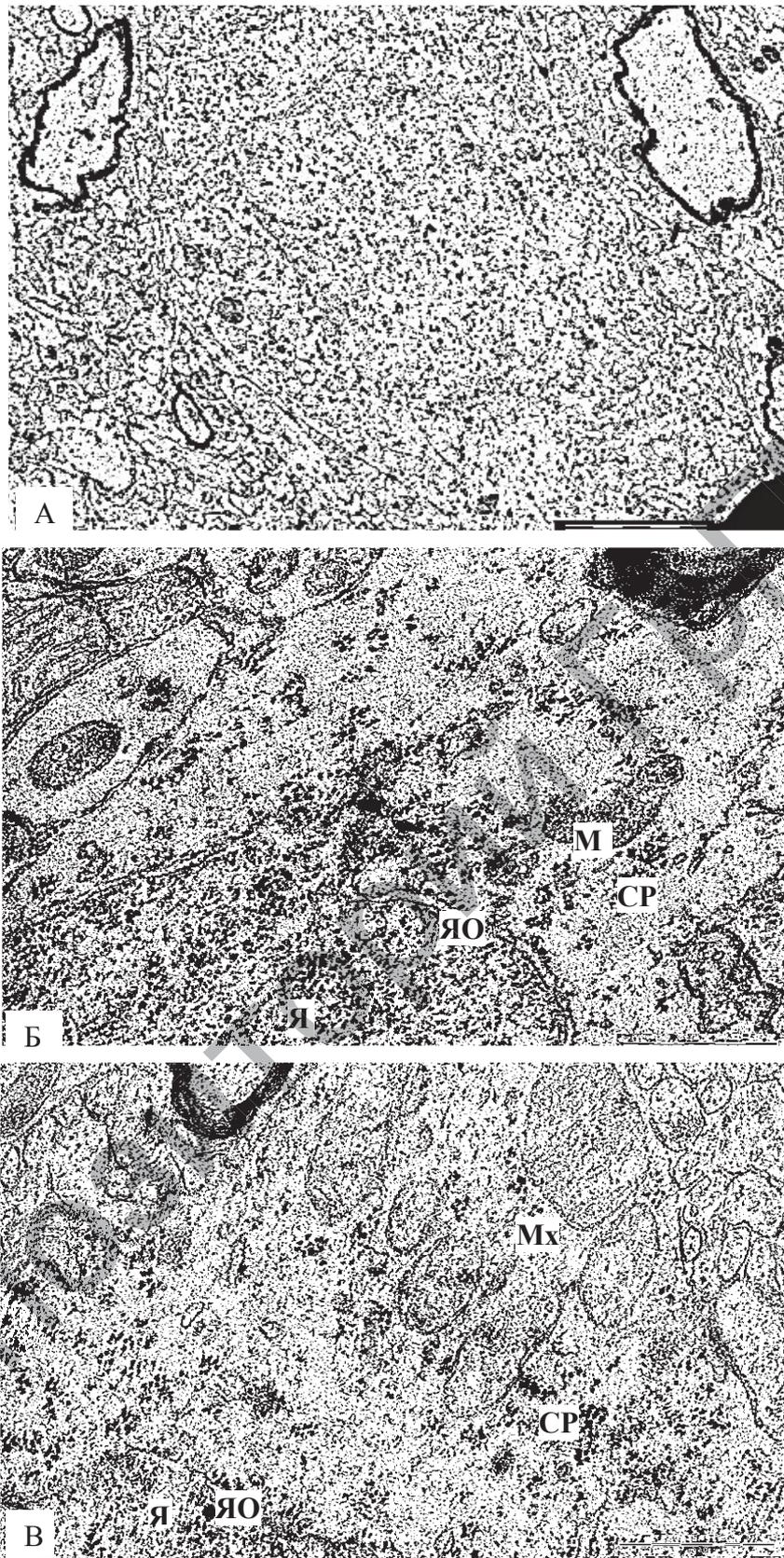
Ядро (Я), ядерная оболочка (ЯО), митохондрии (Мх), фаголизосома (ФЛ), свободные рибосомы (СР), комплекс Гольджи (КГ), гранулярная эндоплазматическая сеть (ГрЭС).
 Масштабный отрезок: А – 2 мкм, Б, В – 0,5 мкм. Электронограмма.
 Ув.: А – 8000, Б, В – 50000

Рисунок 4.7. – Гиперхромные нейроны внутреннего пирамидного слоя фронтальной коры 45-суточных крыс, подвергавшихся антенатальной алкоголизации. А – общий вид нейрона. Б, В – фрагменты ядра и цитоплазмы нейрона



Ядро (Я), ядерная оболочка (ЯО), митохондрии (Мх), фаголизосома (ФЛ), свободные рибосомы (СР), комплекс Гольджи (КГ), гомогенное осмиофильное содержимое (ГОС)
 Масштабный отрезок: А – 2 мкм, Б, В – 0,5 мкм. Электронограмма.
 Ув.: А – 8000, Б, В – 50000

Рисунок 4. 8. – Гиперхромные сморщенные нейроны внутреннего пирамидного слоя фронтальной коры 45-суточных крыс, подвергавшихся антенатальной алкоголизации. А – общий вид нейрона. Б, В – фрагменты ядра и цитоплазмы нейрона



Ядро (Я), ядерная оболочка (ЯО), митохондрии (Мх), свободные рибосомы (СР). Масштабный отрезок: А – 2 мкм, Б, В – 0,5 мкм. Электронограмма. Ув.: А – 8000, Б, В – 50000

Рисунок 4.9. – Гипохромные светлые нейроны внутреннего пирамидного слоя фронтальной коры 45-суточных крыс, подвергавшихся антенатальной алкоголизации. А – общий вид нейрона. Б, В – фрагменты ядра и цитоплазмы нейрона

У антенатально алкоголизованных животных на светооптическом уровне выявлено уменьшение числа нормохромных нейронов и повышение количества патологических форм нейронов (гипер-, гипохромных нейронов и клеток-теней) в 5-м слое коры мозга. Эти разные патологические формы нейронов на электронномикроскопическом уровне имели разную, часто противоположную ультраструктуру. Так, в сохранившихся нормохромных нейронах коры антенатально алкоголизованных крыс выявлена дезорганизация цистерн комплекса Гольджи, что может свидетельствовать о наличии застойных явлений в цитоплазме, точнее, по нашему мнению, – о нарушении аксонального транспорта веществ, синтезированных в перикарионах нейронов.

Гиперхромные нейроны имеют гораздо больше связанных, в особенности свободных, рибосом, что обеспечивает их гиперхромную окраску по Нисслю. При гистохимическом исследовании в цитоплазме гиперхромных нейронов выявлено повышенное содержание рибонуклеопротеинов (РНП). Это свидетельствует об интенсивном биосинтезе белка, особенно для собственных нужд клетки. Возможно, это способ адаптации пирамидных нейронов для компенсации функции погибших (10-25%) в результате антенатальной алкоголизации нейронов коры мозга. Гиперхроматофилия нейронов может характеризовать преобладание синтеза белка над его расходом, а сморщивание с дегидратацией цитоплазмы, возможно, в связи с нарушением водно-солевого обмена нейронов, что можно рассматривать как срыв адаптации, ведущий к последующей их гибели.

Совершенно иную ультраструктурную картину имеют гипохромные нейроны. В их цитоплазме крайне мало ГрЭС и свободных рибосом, в их мелких ядрах не видны ядрышки, в митохондриях плохо развиты кристы. Это свидетельствует о нарушении в них биосинтетических процессов и низкой функциональной активности гипохромных нейронов, что, вероятно, приводит к их превращению в клетки-тени и к гибели. Ультрамикроскопические нарушения: набухание митохондрий и разрушение их крист в цитоплазме нейронов, – соответствуют гистохимическим данным об угнетении в них активности окислительных ферментов, что говорит о снижении энергообеспечения клеток.

Пренатальная алкоголизация приводит к значительным качественным и количественным нарушениям развития органелл внут-

ренных пирамидных нейронов фронтальной коры в постнатальном онтогенезе. Установлено, что у крысят, подвергавшихся антенатальной алкоголизации, количества митохондрий на единицу площади цитоплазмы значительно меньше, чем в контроле. При этом размеры митохондрий не отличались от контроля, но они становятся более сферичными и менее вытянутыми, а количество и длина крист на 1 мкм^2 митохондрий были ниже (приложение 2, таблица 5). Набухание митохондрий и разрушение их крист в цитоплазме нейронов соответствуют нашим гистохимическим данным об угнетении в них активности маркерных окислительных ферментов (дегидрогеназ сукцината и восстановленного НАД), что свидетельствует о снижении энергообеспечения клеток.

У пренатально алкоголизированных крыс относительное количество свободных рибосом прогрессивно нарастает, а связанных – снижается, на 45-е сутки становясь в 5 раз меньше, чем в контроле. При этом соотношение свободных и связанных рибосом у них было в 10 раз меньше, чем у контрольных животных. Уменьшение количества связанных с ГрЭС рибосом и увеличение числа свободных рибосом свидетельствует о переключении биосинтеза белка для собственных нужд нейронов, необходимого для их выживания в неблагоприятных условиях. В опытной группе происходило значительное снижение протяженности цистерн гранулярной эндоплазматической сети (ГрЭС) на единицу площади цитоплазмы и их расширение. Значительно расширяются и цистерны комплекса Гольджи (приложение 2, таблица 5).

Относительное количество лизосом на единицу площади цитоплазмы и их размеры у пренатально алкоголизированных крыс значительно увеличены (приложение 2, таблица 5). Сходным образом в цитоплазме нейронов опытных крыс повышена и активность маркерного фермента лизосом КФ [Зиматкин, 2016б; Бонь, 2016а; Бонь, 2016б].

Таким образом, пренатальная алкоголизация приводит к значительным качественным и количественным нарушениям развития органелл внутренних пирамидных нейронов фронтальной коры в постнатальном онтогенезе. Так, происходит снижение относительного числа митохондрий, количества и длины их крист, что сопровождается снижением в цитоплазме этих нейронов активности маркерных ферментов митохондрий СДГ (фермента аэробного окисления углеводов в цикле Кребса) и НАДН-ДГ (митохондриального

фермента, участвующего в переносе электронов и являющегося важным связующим звеном между конечными продуктами распада углеродного скелета и дыхательной цепью). Это свидетельствует о прогрессирующем снижении функциональной активности митохондрий и энергетического обеспечения нейронов коры мозга крыс, перенесших пренатальную алкоголизацию.

Прогрессирующее нарастание относительного числа свободных рибосом и уменьшение числа связанных рибосом в нейронах опытной группы свидетельствует о преобладании биосинтеза белка для собственных нужд нейронов, необходимого для повышенного обновления поврежденных органелл и выживания нейронов в неблагоприятных условиях. Однако из-за сниженного синтеза белка на экспорт и его транспорта в терминали участие этих нейронов в деятельности коры мозга, по-видимому, будет уменьшено. Относительное количество лизосом на единицу площади цитоплазмы и их размеры увеличиваются в нейронах пренатально алкоголизированных крыс, что коррелирует с повышенной активностью в их цитоплазме маркерного фермента лизосом КФ и отражает нарастание процессов аутофагии в этих нейронах [Зиматкин, 2016б; Бонь, 2016б].

Глава 5

КЛЕТОЧНЫЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ АЛКОГОЛЬНОГО ПОРАЖЕНИЯ МОЗГА ПЛОДА

Клеточные и молекулярные механизмы поражения организма плода при антенатальной алкоголизации интенсивно исследуются. Они довольно сложны и включает многочисленные процессы и пути передачи сигналов. Некоторые из механизмов являются общими для мозга взрослого человека и для развивающегося мозга, в то время как другие зависят от стадии развития организма [Зиматкин, 2014]. В процессе онтогенеза алкоголь вызывает дефекты многих клеточных, нейрохимических и молекулярных процессов, происходящих во время развития мозга: нарушает функции нейронов и глии, изменяет регуляцию экспрессии генов и молекул, участвующих в межклеточных взаимодействиях, повышает образование свободных радикалов. Алкоголь действует на специфические белки рецепторов мембраны нейрона, например, GABA-A, ионные каналы (Ca²⁺ каналы L-типа) и сигнальные пути (например инсулина). Алкоголь воздействует на дофаминергическую мезолимбическую систему, что способствует формированию алкогольной зависимости. Эти эффекты могут лежать в основе широкого спектра поведенческих нарушений, вызванных этанолом [Alfonso-Loeches, 2011].

Влияние этанола на развитие стволовых нервных клеток мозга

В конце 1-го и в начале 2-го триместра эмбриогенеза человека из эмбриональных нервных стволовых клеток развиваются нейроны мозга, этанол же влияет на их созревание. Для этанола уязвимы также и микро-РНК (не кодирующие белок), которые управляют экспрессией генов [Miranda, 2012]. Этанол воздействует на эмбриональное развитие нервной системы, разрушает регуляторные связи микро-РНК, которые важны для процесса созревания нервных клеток [Balaraman, 2012].

Этанол оказывает влияние на стволовые нервные клетки (NSC), клетки-предшественницы глии (GCP) и клетки-предшественницы нейронов (NCP). Они были изолированы во 2-м триместре беременности человека для позитивной селекции с использованием магнитных микросфер, меченных антителами к

CD133 (NSC), A2B5 (GCP), или PSA-NCAM (NCP). Затем их подвергали воздействию раствора, содержащего 100 мМ этанола, в течение 120 часов. Культуры были изучены с помощью иммунофлуоресцентной микроскопии и Вестерн-блоттинга. Этанол способствовал формированию нейросфер NSC, GCP, и NCP. В контроле GCP дифференцируются, а GCP и NCP формируют нейросферы, значительно меньшие по размеру, чем в среде с этанолом [Vangipuram, 2010].

Аntenатальная алкоголизация в премиграционный период дестабилизирует транскрипционно активный катенин, инициируя тем самым апоптоз в клетках нервного гребня [Smith, 2014; Neural crest].

Этанол вызывает снижение пролиферации нейробластов и ингибирует циклин D1 и Rb фосфорилирование, что указывает на остановку клеточного цикла (цитостаз) [Riar, 2016. Ethanol induces].

Нарушение миграции нейробластов

Упорядоченная миграция нейробластов необходима для развития слоистых структур, таких как кора головного мозга. На начальных стадиях кортикогенеза транскрипционный фактор Pax6 отвечает за процессы радиальной миграции нейробластов и глии. Самок крыс за месяц до спаривания, во время беременности и в период лактации кормили жидкой пищей с добавлением 5,9% (м/м) раствора этанола. Кора головного мозга крыс была исследована с использованием иммуногистохимических методов для выявления виментина, нестина, S-100b, Pax6 в возрасте 12 суток эмбриогенеза и на 3-и сутки после рождения. Были обнаружены значительные морфологические дефекты, заметные задержки в миграции нейронов, снижение числа нейробластов, и снижение уровня виментина, нестина, S-100b и Pax6 в результате воздействия этанола на развивающийся мозг, нарушение миграции глии [Aronne, 2011].

Этанол нарушает нормальную миграцию клеток нервного гребня, нарушая экспрессию генов PDGFA, Vangl2 и рибосомальный биогенез [Smith, 2014; Neural crest].

Во время миграции нейронов этанол вызывает преждевременное преобразование радиальной глии в астроциты. В результате нарушается строение и архитектура постмиграционной коры головного мозга [Gressens, 1992. Ethanol-induced].

Пренатальное воздействие этанола изменяет расположение тангенциально мигрирующих ГАМКергических интернейронов в мозге плода, что вызывает необратимые aberrации развития коры мозга [Skorput, 2016].

Нарушение транскрипции и трансляции в мозге

Исследование полового хроматина детей с FASD установило дефекты метилирования ДНК, влияющие на развитие организма [Laufer, 2015; Associative DNA]. Происходит также изменение белков-гистонов, которые влияют на структуру хроматина [Ungerer, 2013].

В настоящее время проводится много экспериментальных исследований, направленных на изучение пренатального воздействия этанола на процессы транскрипции в мозге [Kleiber, 2012. Long-term]. Так, у мышей, подвергшихся пренатальному воздействию этанола, выявлены беспокойство, нарушение пространственной ориентации, а также умеренная задержка развития. В их мозге под действием этанола происходило нарушение экспрессии генов, детерминирующих когнитивные функции, тревожное поведение и колебания настроения (Lxat, Ache, Bcl2, Cul4b, Dkc1, Fbp, Sstr3, Otx2) [Kleiber, 2012. Long-term]. Потомство мышей, употреблявших во время беременности алкоголь, показало задержку появления неонатальных рефлексов. У мышей-подростков имеется нарушение процессов обучения и ориентировки в новых условиях, повышенная тревожность. На молекулярном уровне наблюдалось снижение экспрессии Glra 1 и Grin 2с генов [Kleiber, 2011].

В ходе исследования, проведенного на крысах, получавших жидкую пищу, содержащую 6,6% этанола, в течение периода, эквивалентного третьему триместру беременности человека, изучали воздействие этанола на информационную РНК в тканях мозга. Забор материала был произведен на 42-е и 72-е сутки после рождения. Эффекты этанола были оценены в полушариях головного мозга, мозжечке и гиппокампе. Результаты показали, что этанол имеет долгосрочные неблагоприятные последствия на иРНК в каждой из трех областей мозга. Наибольшие дефекты определены в гиппокампе [Tewari, 1992].

Выявлено, что в развивающихся клетках Пуркинье мозжечка интактных крыс идет активная экспрессия CREB-связывающего белка (СВР). Воздействие этанола в течение периода, эквивалент-

ного третьему триместру человеческой беременности, снижает уровень СВР. СВР является компонентом эпигенетических механизмов управления экспрессией генов в нейронах. Кроме того, этанол нарушает процесс ацетилирования гистонов H₃ и H₄ в мозжечке у крыс. Эти эффекты этанола могут быть ответственными за возникновение двигательного дефицита и дефектов координации движений [Guo, 2011. Alcohol].

С использованием двух отдельных линий эмбриональных стволовых клеток человека, проведено исследование, которое показало, что даже небольшие количества этанола (20 мМ) изменяет транскрипцию ионотропных субъединиц GABRB3. Изменения в экспрессии рецепторов влияют на развитие ЦНС и приводят к аномалиям мозга [Krishnamoorthy, 2011. GABRB3].

Уровни экспрессии β (1) и α (3) интегрина и фосфолипазы-сг (2) были значительно изменены в коре головного мозга плодов, чьи матери употребляли этанол во время беременности. Результаты показывают, что употребление алкоголя во время беременности даже при питании, обогащенном белками, минеральными веществами и витаминами, может повлиять на здоровье матери и плода и вызвать нарушения развития мозга плода [Di Nicolantonio, 2000; Weinberg, 1985; Rout, 2010].

Нарушения нейротрофических факторов в мозге

В результате хронического пренатального воздействия этанола снижается содержание нейротрофических факторов в тканях мозга эмбриона. Куриные эмбрионы подвергали хроническому воздействию этанола (около 30 мг/сут) с 4-х по 13-е сутки эмбрионального развития. На 16-е сутки был взят экстракт из тканей мозга. Нейротрофическая активность была значительно снижена в тканях, подвергавшихся воздействию этанола. Такие изменения могут лежать в основе некоторых аномалий ЦНС при алкогольном синдроме плода [Heaton, 1992. Ethanol; Yang, 2015].

В другом эксперименте беременные крысы получали алкоголь через желудочный зонд в дозе 0,4 или 6 г/кг/сут с 8-го до 20-го дня беременности. Крысят исследовали в возрасте 21 суток. Пренатальное воздействие алкоголя увеличило уровни фактора роста нервов в лобной коре (в группе животных, получавших высокие дозы этанола) и черве мозжечка (в группах, получавших и высокие, и низкие дозы). Уровень нейротрофического фактора мозга возрос в лобной

коре, затылочной коре и гиппокампе (в группах, получавших низкие дозы), а также увеличился уровень нейротрофина-3 в гиппокампе и черве мозжечка (в группе, получавшей высокие дозы). Данные результаты отражают компенсаторные последствия антенатальной алкоголизации, направленные на нивелирование негативных эффектов этанола [Heaton, 2000. Ethanol-induced; Ickes, 2000. Long-term; Parks, 2008].

С помощью иммуногистохимии изучены рецепторы нейротрофина p75 (p75 NTR) в сенсорно-моторной коре 10- и 20-суточных крысят, подвергавшихся воздействию этанола в течение первой недели постнатальной жизни. В обеих возрастных группах количество p75 NTR иммунореактивных нейронов было выше у подопытных животных по сравнению с контрольной группой. Увеличение иммунореактивных элементов было относительно более выраженным в двигательной, а не в соматосенсорной коре. Следовательно, анатомические и функциональные изменения, наблюдаемые в коре головного мозга при внутриутробном воздействии этанола, могут быть связаны с нейротрофинами и/или их рецепторами [Moore, 2004. Ethanol; Hasegawa, 2004. p 75; Toesca, 2003].

Развивающийся мозжечок особо уязвим к воздействию этанола. Этанол ингибирует рост аксонов нейронов зернистого слоя коры мозжечка. Рост аксонов в норме стимулируют Netrin-1, нейротрофический фактор глиальных клеток (GDNF) и адгезии L1 путем активации ФСК (Src киназы), сигнального белка Cas и выделения внеклеточной регулируемой киназы 1 и 2 (ERK1/2). Нейротрофический фактор (BDNF) стимулирует рост аксонов и активацию ERK1/2 без предварительной активации ФСК или Cas. Клинически значимая концентрация этанола ингибирует рост аксонов и активацию SFK-Cas-ERK1/2 пути, но не нарушает BDNF-индуцированный рост аксона или активацию ERK1/2. Эти результаты показывают, что ФСК, но не ERK1/2, является основной мишенью для этанол-индуцированного подавления роста аксона [Chen, 2012].

Нарушения развития нейротрансмиттерных систем мозга

Показано, что пренатальное воздействие этанола нарушает образование бензодиазепиновых рецепторов и развитие ГАМК-ергической системы мозга плода. Отставание в формировании бензодиазепиновых рецепторов и снижение их плотности у плодов на 8-15 неделях развития может быть рассмотрено как компенсаторная

реакция на воздействие этанола и как признак функциональной незрелости ГАМК-ергической системы мозга [Shushpanova, 2012; Vakhtin, 2015. Aberrant].

Крысам внутрижелудочно вводили этанол с 1-го по 22-й день беременности, а затем крысятам – от 2-го до 10-го дня после рождения. Под воздействием алкоголя содержание мет-энкефалина возросло в гипоталамусе и снизилось в центральном ядре миндалевидного тела. Результаты показывают, что сочетание дородовой и послеродовой алкоголизации изменяет уровень мет-энкефалина в конкретных регионах мозга. Эти изменения могут объяснить нарушения, возникающие в опиоидрегулируемом поведении (социальные игры, сексуальное поведение) под воздействием алкоголя [Lugo, 2006].

Исследование основных нейромедиаторов моноаминергических систем мозга и их метаболитов, активности катехол-О-метилтрансферазы (COMT) и состояния разных подтипов рецепторов дофамина (DA) в развивающемся мозге потомства от матерей, потреблявших алкоголь во время беременности и кормления, показало снижение активности всех исследованных моноаминергических систем с уменьшением уровня норадреналина и DA, а также иРНК и COMT, фермента метаболизма катехоламинов. В послеродовой период (на 4-, 10-, 17-й день) наблюдалось дальнейшее снижение активности системы DA, в частности, снижение отношения уровня DOPAC и DOPAC/DA в помете крыс, матери которых употребляли алкоголь в период беременности. Деятельность системы серотонина снижалась в послеродовой период, что было зарегистрировано на ранней стадии (4-й день жизни). Таким образом, активность системы серотонина изменялась на ранних стадиях развития (4-й день), в то время как ингибирование активности системы DA зарегистрирована на более поздних этапах (10-й день жизни) [Shabanov, 2012].

У потомства самок крыс, с 13-го по 18-й день беременности потреблявших этанол в составе жидкой диеты, наблюдалось нарушение развития норадренергической системы мозга (увеличен синтез и захват тирамина) [Thadani, 1977]. Кроме того, содержание норадреналина было снижено во всех структурах мозга, а в гипоталамусе оставалось пониженным даже через 26 недель после рождения. Содержание бета-эндорфина, катехоламинов, лей-энкефалина

и глутамата также было нарушено [Shoemaker, 1983; Howells, 2016. Reduced].

Возбуждающий нейротрансмиттер глутамат играет важную роль в функционировании ЦНС. Активирование одного из подтипов глутаматных рецепторов NMDA (N-methyl-D-aspartate) играет ключевую роль в процессе формирования синапсов. Пренатальная экспозиция этанола вызывает уменьшение числа NMDA рецепторов. Алкоголь, блокируя NMDA рецепторы, способствует развитию апоптозной нейродегенерации в переднем мозге, что может быть причиной уменьшения массы мозга, разного рода психических нарушений, а также снижения у потомства способности к обучению [Разводовский, 2005]. Алкоголь блокирует NMDA рецепторы, а хроническое его воздействие может привести к компенсаторному увеличению числа рецепторов и повышенному высвобождению глутамата, что способствует развитию толерантности [Grant, 1995]. Гиперактивность NMDA-рецепторов приводит к эксайтотоксической гибели клеток [Tsai, 1998].

Пренатальное воздействие алкоголя вызывает поражение ГАМКергической системы мозга. ГАМК является преимущественно тормозным нейромедиатором, поэтому влияние этанола возбуждает нейроны и нарушает пролиферацию, миграцию, дифференцировку клеток и процессы синаптогенеза [Isayama, 2009. Impact].

Хроническое пренатальное воздействие этанола вызывает нарушения дофаминергической системы мозга, которые сохраняются в течение длительного времени и влекут за собой расстройства поведения животных. Такого эффекта не наблюдается при введении этанола в период лактации. Даже однократное введение этанола (3 г/кг, перорально) на 4-й день беременности приводит к поражению дофаминергической системы мозга [Lucci, 1984. Specific; Ranbun, 1985]. При этом в стриатуме выявлено увеличение кругооборота дофамина на 50% и снижение количества участков связывания дофаминергических рецепторов [Lucci, 1983].

Беременных крыс подвергали воздействию этанола (25% раствор вводили внутривентриально в дозе 1,0, 2,0 или 4,0 г/кг массы тела с 8-х по 20-е сутки беременности), чтобы оценить взаимодействие метаболита этанола, ацетальдегида (AA) с эндогенными моноаминами до образования тетрагидроизохинолина или бетакарболина в тканях плода. После введения этанола концентрация AA в мозге плода значительно увеличилась (в 2,6 раза, 5,3 раза и

7,8 раза в группах, получавших 1,0, 2,0 и 4,0 г/кг этанола, соответственно). С помощью ВЭЖХ в мозге эмбрионов отмечено возрастание содержания 7-дигидрокси-1,2,3,4-тетрагидроизохинолина (сальсолинол), N-метил-сальсолинола и 1-метил-6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-бета-карболина. Определение методом ВЭЖХ с электрохимическим детектором уровня дофамина и 5-гидрокситриптамина в мозге плода не показало больших изменений по сравнению с контролем, в то время как уровни гомованилиновой и 5-гидроксииндол уксусной кислоты при введении высоких доз этанола (4,0 г/кг) значительно снизились. Большие дозы этанола (4,0 г/кг) ингибируют активность митохондриальной моноаминоксидазы на 51,3% по сравнению с контролем и снижают активность цепи ферментов клеточного дыхательного комплекса I на 61,2% по сравнению с контролем. Эти результаты свидетельствуют о том, что этанолиндуцированные изменения метаболизма моноаминов и накопление дофамина в виде изохинолинов и тетрагидро-бета-карболинов могут играть существенную роль в развитии дисфункций моноаминергических нейронных систем мозга [Мао, 2012. Increased; Naoi, 2004; Maruyama, 1992. N-methylation].

Рассматривается возможность того, что этанол напрямую ухудшает развитие серотонинергических нейронов. Исследования культур эмбриональных нейронов крысы показали, что 4-дневная экспозиция нейронов в среде, содержащей от 50 до 450 мг/дл этанола, не повлияла на содержание серотонина (5-НТ), поглощение 5-НТ и количество 5-НТ иммунопозитивных нейронов. Это противоречит результатам опытов *in vivo*. Данные результаты могут быть связаны с тем, что воздействие этанола в естественных условиях было более длительным и включало период раннего развития серотонинергических нейронов и их предшественников. Кроме того, различие может быть связано с этанол-индуцированными изменениями в организме матери или плода (например, состава аминокислот, уровня гормонов, факторов роста и т.д.), которые необходимы для нормального развития серотонинергической системы в естественных условиях [Eriksen, 2000; Morton, 2016].

Пренатальное воздействие этанола вызывает угнетение АТФазы, ацетилхолинэстеразы (АХЭ) и 5-нуклеотидазы в синаптических мембранах животных в возрасте 2 и 4 месяца [Guerra, 1987]. На 5-й день после рождения в 6-ти областях мозга было зафиксиро-

вано максимальное снижение активности мембраносвязанных ферментов (АХЭ, АТФ-аз) [Rudeen, 1985].

Нарушения антиоксидантной системы мозга

В гиппокампе и мозжечке крыс, подвергшихся воздействию этанола, был значительно увеличен уровень перекисного окисления липидов и окисления белков, а уровень эндогенного антиоксиданта глутатиона снизился [Brocardo, 2012. Anxiety]. Наблюдались также изменения изоферментного спектра енолазы и повышенная активность супероксиддисмутазы мозга [Котин, 1988. Биохимические изменения].

Активность Zn^{2+} - и Cu^{2+} -супероксиддисмутазы значительно снижается в коре головного мозга, гиппокампе и стволе мозга 14-дневных крыс, подвергшихся пренатальному воздействию этанола, что влечет за собой активацию свободно-радикального повреждения в мозге данных животных [Uzbekov, 1991; Drever, 2012. The expression]. С 8-х суток беременности C57BL6/J мышам внутрибрюшинно вводили алкоголь (0,03 мл/г) или физиологический раствор (контрольная группа). Забор материала осуществлялся на 18-е сутки. Мозг плодов анализировали на экспрессию иРНК супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы и каталазы с помощью ПЦР в режиме реального времени. Активность всех антиоксидантных ферментов была ниже в мозге плодов, перенесших антенатальную алкоголизацию, что может привести к угнетению клеточной защиты от повреждения свободными радикалами [Drever, 2012. The expression].

Нарушение обмена витамина А в мозге

Ретиноевая кислота (активная форма витамина А) участвует в регуляции развития нервной системы в эмбриогенезе, контролируя экспрессию генов. Ретинол дегидрогеназа – это фермент, необходимый для превращения витамина А (ретинола) в ретиноевую кислоту. В ходе исследования, проведенного на тканях головного мозга пренатально алкоголизированных крыс, было установлено, что этанол действует как конкурентный ингибитор ретинол дегидрогеназы, чем и можно объяснить аномалии головного мозга и черепно-лицевую дисморфию, возникающие при антенатальном воздействии этанола [Duester, 1991].

Эмбрионы крыс на разных сроках беременности и ткани их головного мозга были проанализированы на содержание ретинола, ядерных рецепторов ретиноевой кислоты и цитозольный уровень ретиноевой кислоты после антенатальной алкоголизации. Уровень ретинола в эмбрионах и тканях мозга был в 2-3 раза выше, чем в контрольной группе. Количество ядерных рецепторов ретиноевой кислоты снизилось у 10-суточных эмбрионов, а цитозольный уровень ретиноевой кислоты значительно возрос. Эти изменения свидетельствуют о возможной роли витамина А в патогенезе алкогольного синдрома плода [Grummer, 1993].

Нарушение кальций-связывающих белков в мозге

Alpha

С помощью иммуногистохимических методов изучали три кальций-связывающих белка (CaBPs): кальбиндин D28k, кальретинин и парвальбумин в мозжечке десятидневных крысят, подвергшихся пренатальному воздействию этанола. Число клеток, содержащих кальбиндин D28k и парвальбумин, снизилось во всех экспериментальных группах, в то время как кальретинин оставался во вставочных нейронах и его содержание возросло по сравнению с контрольной группой. В экспериментальных группах наблюдалось значительное снижение иммунореактивности кальбиндина D28k и парвальбумина, но иммунореактивность кальретинина возросла во вставочных нейронах [Wierzba-Bobrowicz, 2011. Differential]. Установлено, что после воздействия этанола в клетках Пуркинье снижалась активность Ca^{2+} -АТФ-азы [Dlugos, 2015], но не нарушает деятельность Ca-каналов клетки [Carta, 2006].

Нарушения липидного обмена в мозге

У новорожденных и 21-дневных крысят наблюдается увеличение содержания холестерина и включение в его фракцию меченой глюкозы в тканях головного и спинного мозга [Lalitha, 1988. Effects]. Отмечено также нарушение содержания фракций фосфолипидов и биогенных аминов, ответственных за регуляцию пролиферации клеток на ранних стадиях онтогенеза [Мельник, 1989. Некоторые]. Фосфатидилсерин участвует в регуляции функций мембран нейронов. У тех новорожденных крысят, которые подвергались внутриутробному воздействию этанола, отмечено снижение биосинтеза фосфатидилсерина в мозге. Данный эффект может по-

влек за собой нарушение функционирования нервных клеток и ЦНС в целом [Hu, 1992].

Хроническое воздействие этанола изменяет липидный состав клеточных мембран развивающегося головного мозга. Десять самок крыс кормили жидкой пищей, содержащей 6,6% этанола, в течение 3-х недель до спаривания, во время беременности и вскармливания до достижения потомством возраста 10 или 20 суток. На 10-е сутки было установлено снижение содержания липидов мембран, а на 20-й день содержание полиненасыщенных жирных кислот возросло. Эти результаты указывают на то, что этанол может быть причиной увеличения текучести мембран [Duffy, 1991. Changes].

Активация апоптоза в мозге

Пренатальная алкоголизация вызывает некротическую гибель нейронов в головном мозге крыс путем активации каспазы-3, катепсина В и цитохрома С [Kusat, 2016. The investigation].

Алкоголь-индуцированный апоптоз в неокортексе коррелирует в пространстве и времени с появлением активированной микроглии возле мертвых клеток. Одновременно с активацией микроглии происходит кратковременное повышение экспрессии провоспалительных факторов ФНО и IL-1 [Ahlers, 2015; Transient activation; Terasaki, 2016].

У грызунов мозжечок наиболее чувствителен к этанолу с 4-х по 6-е сутки после рождения. В несколько более позднем возрасте (7-е сутки после рождения) этот регион становится менее уязвимым к его воздействию. В данном исследовании изучались эффекты этанола на механизмы, связанные с деятельностью Bad, относящегося к типу Bcl-2 проапоптотических генов. В здоровых клетках Bad сохраняется в цитозоле, связываясь с цитозольными белками. При апоптозе Bad путем гетеродимеризации отделяется от этих белков и образует изолированные молекулы Bcl-XL. С использованием методов субклеточного фракционирования и Вестерн блотт анализа было проведено определение воздействия этанола у 4-6-суточных животных на внутриклеточную локализацию и протеолитическое расщепление Bad в мозжечке через два часа после воздействия этанола. У 7-суточных животных количество Bad, связанного с цитозольными белками, было выше, чем у младших крыс, а содержание Bcl-XL комплексов ниже [Siler-Marsiglio, 2005; Siler-Marsiglio, 2006].

Иммуногистохимические исследования на маркеры апоптоза выявили, что в результате воздействия этанола повышается активность caspase-3 и calbindin-D28k в клетках Пуркинье уже через 10-24 ч после введения этанола, что позволило предположить, что снижение количества клеток в коре мозжечка имеет природу митохондриально-опосредованного апоптоза и является защитным механизмом на окислительный стресс, возникающий в результате алкоголь-индуцированного повреждения митохондрий [Chen, 2012; Dikranian, 2005].

Беременным макакам на разных стадиях беременности (со 105-х по 155-е сутки) давали доступ к алкоголю на 8 ч ежедневно. Затем плоды извлекали с помощью кесарева сечения. В мозге наблюдалось 60-кратное увеличение апоптоза по сравнению с контролем. Предполагается, что многие из нейropатологических изменений и долгосрочных психоневрологических нарушений FASD можно объяснить апоптогенным действием алкоголя на мозг плода [Farber, 2010].

Нарушение синаптической пластичности в мозге

Установлено, что у клеток Пуркинье, подвергшихся антенатальному воздействию этанола, уменьшилось количество кальциевых каналов из-за снижения экспрессии гамма-изоформы протеинкиназы С. Кроме того, наблюдалось замедление прохождения импульса через синапсы клеток Пуркинье. Результаты исследований позволяют предположить, что такие аномалии являются основными причинами атаксии и двигательных нарушений, которые наблюдаются при алкогольном синдроме плода [Belmeguenai, 2008. Alcohol].

Чтобы определить потенциальный молекулярный субстрат для когнитивных дисфункций при антенатальной алкоголизации у крыс был измерен региональный уровень пресинаптических белков complexin I и II. Эти белки важны для обеспечения синаптической пластичности, необходимой для нормального протекания когнитивных процессов. Беременные самки крыс получали жидкую пищу (доля этанола составляла 36% от полученных калорий). Уровни complexin I, II и синаптофизина были измерены в лобной коре и гиппокампе с помощью метода ELISA. Обнаружены значительно более низкие уровни обоих complexin в префронтальной коре, по сравнению с контрольными животными. Эти данные показывают,

что пренатальное воздействие этанола вызывает селективную потерю белков complexin в лобной коре, что влечет за собой когнитивные дисфункции [Eastwood, 2005; Barr, 2005. Prenatal; Sawada, 2005].

На молекулярном уровне этанол нарушает синтез рецепторных белков, участвующих в синаптической передаче нейронов гиппокампа [Fontaine, 2016. Effects of prenatal].

Нарушение сигнальных путей инсулина

Этанол снижает выживаемость нейронов и нарушает их функции двумя основными путями: 1) подавляет сигналы инсулина, необходимые для жизнеспособности, метаболизма, формирования синапсов и производства ацетилхолина; 2) функционирует как нейротоксикант, вызывая оксидативный стресс, повреждение ДНК и митохондриальную дисфункцию. Этанол угнетает сигналы инсулина опосредованно, на уровне рецепторов инсулина (IR), нарушая связывание с рецептором, и повышает активность фосфатаз. В результате инсулиновая активация PI3K-Akt, которая выступает посредником обеспечения подвижности, энергетического обмена и пластичности нейронов, снижается. Нейротоксический эффект этанола способствует повреждению ДНК, вызывая митохондриальную дисфункцию и окислительный стресс. Таким образом, хроническое внутриутробное воздействие этанола приводит к состоянию инсулинорезистентности в ЦНС [de la Monte, 2010].

В экспериментальных моделях FASD гипоплазия мозжечка связана с нарушением сигнальных путей инсулина и инсулиноподобного фактора роста (IGF), которые опосредуют рост, пластичность, обмен веществ и функции нейронов. Для оценки роли нарушений сигнализации инсулина и IGF во время развития мозга антенатально алкоголизированным крысам на 2-й день после рождения вводили в полость желудочков мозга си-РНК, ориентированную на рецепторы инсулина (INR), IGF-1 рецепторы (IGF-1R) или IGF-2 рецепторы (IGF-2 R). На 20-е сутки после рождения у крыс наблюдались значительные нарушения двигательной функции, а гистологические исследования показали выраженную гипотрофию мозжечка и гипоплазию IGF-1R, и си-IGF-2R. Количественный RT-PCR анализ показал, что этанол широко ингибирует экспрессию инсулина, IGF-2 полипептидов, IGF-1 и IGF-2 рецепторов в мозгу. Результаты показывают, что основные нарушения в мозге при

FASD вызваны нарушениями в инсулин/IGF сигнализации [de la Monte, 2011. si-RNA; Aros, 2011. Effects].

В результате исследования, проведенного на мухах дрозофилах, также установлено, что поведенческие дефекты в значительной степени опосредованы влиянием этанола на сигнальные пути инсулина, а именно, снижением концентрации *Drosophila* инсулиноподобного пептида (Dilp) и экспрессии рецепторов инсулина [McClure, 2011].

Нейродегенерация

Крысам вводили этанол (2,5 г/кг подкожно) или физиологический раствор на 7-, 15- и 20-й день после рождения. Для оценки нейродегенерации использовали импрегнацию серебром, а иммуногистохимические методы использовали для обнаружения активированных каспаз 3-8 и 9 через 2, 4, 6, 8, 12 и 24 часа после введения этанола. Результаты показали, что нейродегенерация в центральном ядре миндалины происходит на 7-15-е сутки постнатального развития, а в грушевидной коре – на 7-, 15- и 20-е сутки. При этом выявлена активация каспазы 3 и 9, но не каспазы 8. Сделано заключение, что лимбическая система мозга чувствительна к пренатальному воздействию этанола, но каждый из ее элементов имеет свой период уязвимости в послеродовом периоде [Balaszczuk, 2011. Alcohol-induced].

В исследованиях на грызунах установлено, что этанол-индуцированная нейродегенерация связана с активацией микроглии и астроцитов [Saito, 2016. Ethanol-Induced].

Другие нарушения

Пренатальная алкоголизация оказывает влияние на степень связывания и распределения поверхностного конканавалин лектина (CON) в астроцитах и на ферментативную активность гликопротеина мембраны 5'-нуклеотидазы коры головного мозга крысы. Клетки для исследования были получены из контрольных плодов (без воздействия этанола) и из плодов, перенесших пренатальное воздействие этанола. Результаты показали, что пренатальное воздействие этанола значительно снизило способность астроцитов связывать CON, изменило поверхностное распределение рецепторов для этого лектина и снизило активность

5'-нуклеотидазы. Эти эффекты были более выражены в пролиферирующих клетках [Renau-Piqueras, 1992. Prenatal].

В экспериментах моделирования FASD на крысах установлена активация Na^+ , K^+ -АТФ-азы во фронтальной коре головного мозга [Stolakis, 2015; Exposure to ethanol]

Пренатальное воздействие этанола нарушает клеточный рост и дифференцировку *астроглии*, способствует снижению уровня глиофибрилярного кислого белка (маркер астроцитов) и экспрессии его гена. Нарушения глиии влекут за собой разные дефекты функционирования нервной системы [Vallés, 1996. Glial; Guerri, 1997; Guerri, 2001]. Микроцефалия при ФАС может быть обусловлена снижением пролиферации астроцитов. Задержкой развития олигодендроцитов и увеличением апоптоза предшественников олигодендроцитов можно объяснить нарушение миелинизации и гипоплазию мозолистого тела и передней спайки. Кроме того, пренатальная алкоголизация вызывает апоптоз микроглии. Учитывая же роль микроглии в синаптической передаче, это негативно влияет на пластичность мозга. Воздействие алкоголя на глиальные клетки является одной из причин ненормального развития нейронов, снижения их выживаемости и ненормальной цито- и миелоархитектоники мозга при ФАС [Wilhelm, 2016].

Пренатальное воздействие этанола вызывает снижение многих *дегидрогеназ* в гиппокампе 27-дневных крыс [Ullrich, 1980].

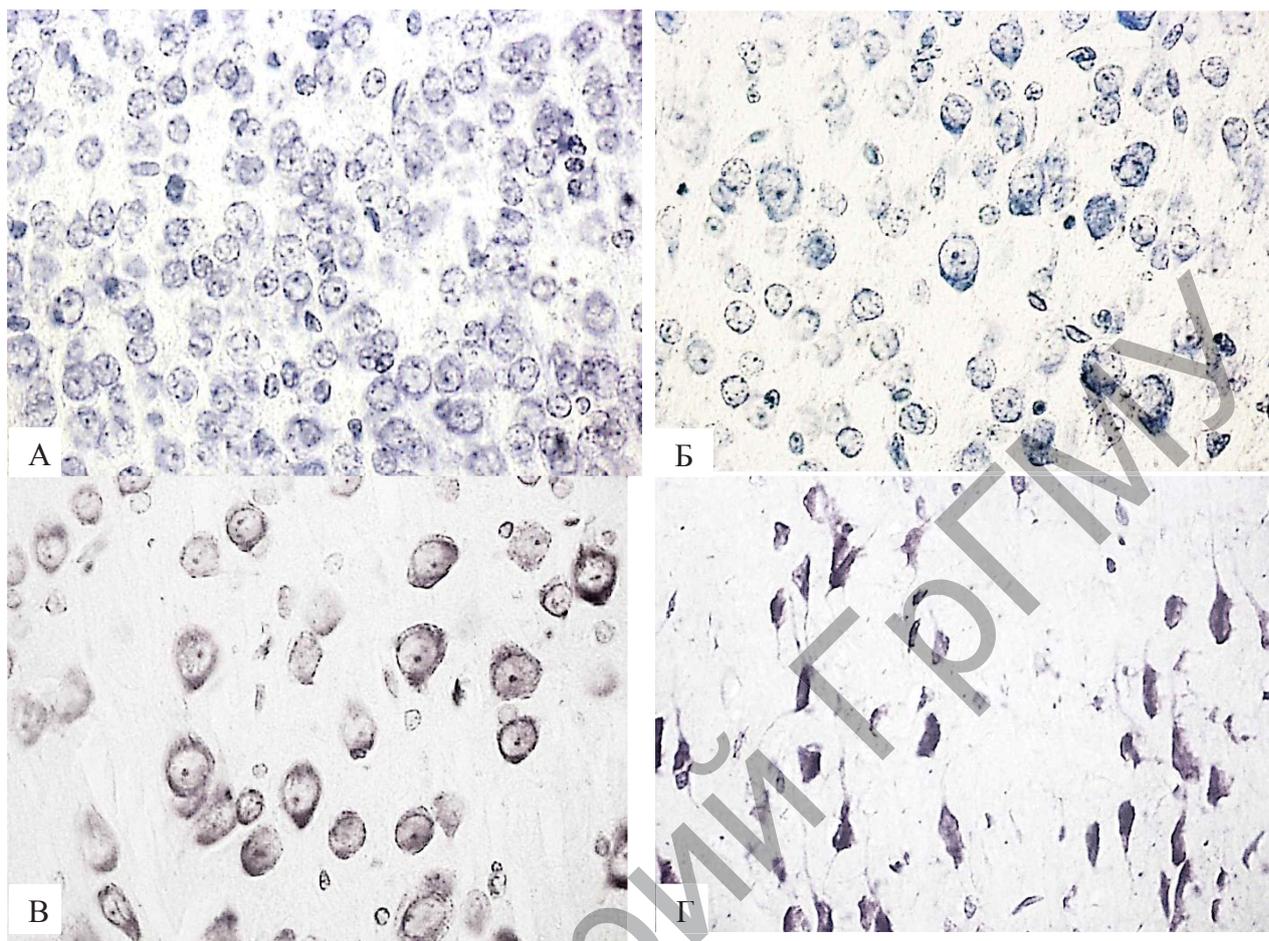
Проницаемость гематоэнцефалического барьера для меченых аминокислот и P^{32} нарушается под воздействием алкоголя, снижено включение меченых аминокислот в структуры белков большинства отделов мозга, особенно в гиппокампе. В водонерастворимой фракции белков угнетение синтеза было наиболее выражено [Майзелис, 1986].

Аntenатальное воздействие этанола вызывает снижение *ДНК* и *РНК* в мозгу лабораторных животных, что свидетельствует о тормозящем влиянии этанола на белоксинтезирующий аппарат мозга плода [Швец, 1987; Сорока, 1989].

Гистохимические изменения в мозге после антенатальной алкоголизации

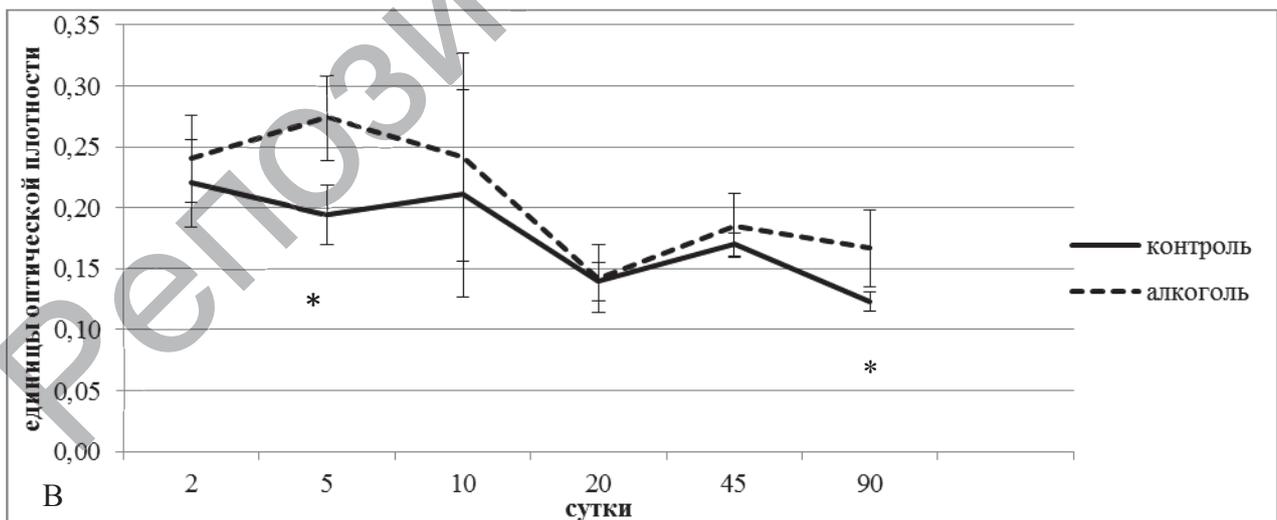
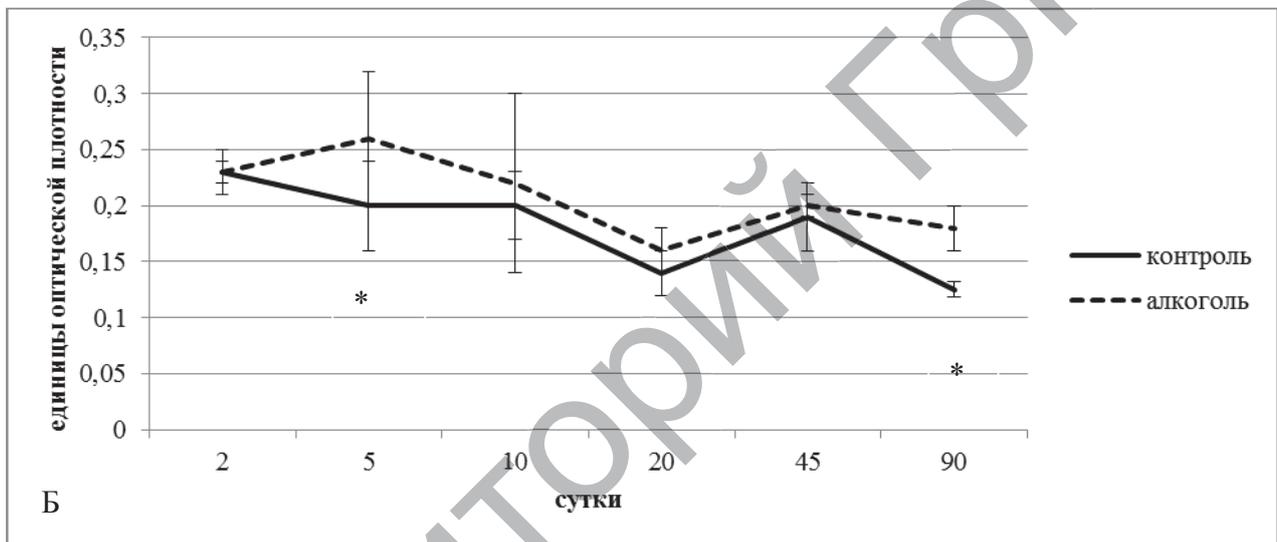
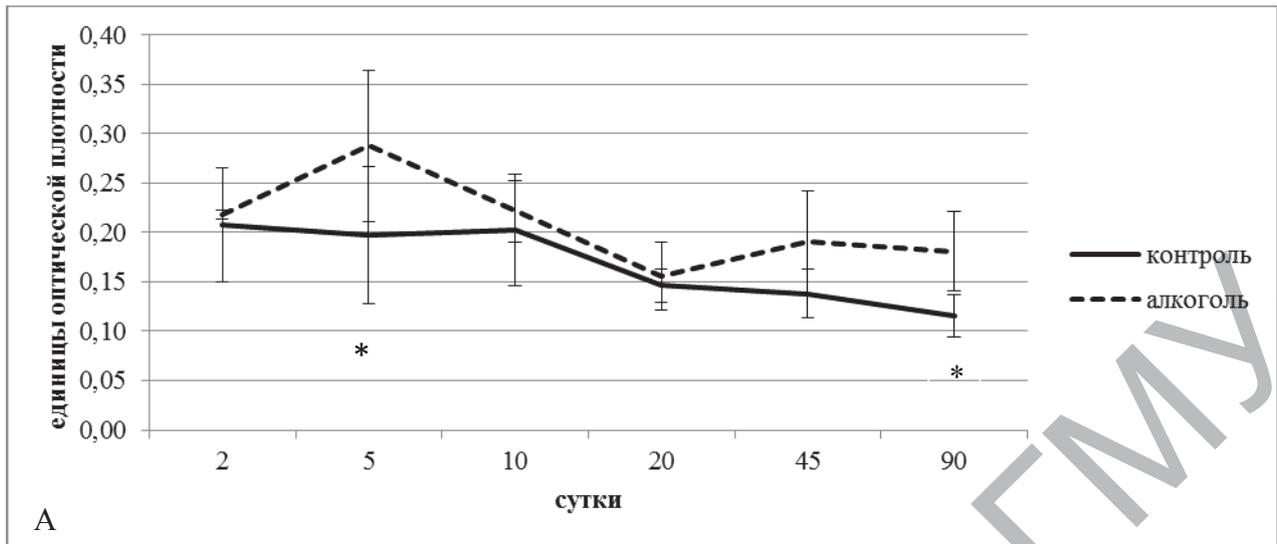
В наших собственных исследованиях установлено, что содержание рибонуклеопротеинов (РНП) в цитоплазме нейронов 5-го слоя изучаемых отделов коры алкоголизированных крыс достоверно повышено на 5-е (в цингулятной коре на 31%, во фронтальной – на 23%, в париетальной – на 21%) (рисунок 5.1, приложение 2, таблица 6) и 90-е сутки после рождения (в цингулятной коре – на 33%, во фронтальной – на 31% и в париетальной – на 25%) (рисунки 5.1, 5.2), что коррелирует с увеличением в эти сроки числа гиперхромных нейронов (например во фронтальной коре $r=0,86$ и $0,96$; $p<0,05$).

На 5-е сутки постнатального развития в цингулятной коре больших полушарий головного мозга потомства крыс, потреблявших этанол во время беременности, установлена тенденция к повышению активности, а на 20-е и 45-е сутки постнатального развития – статистически достоверное снижение активности НАДН-дегидрогеназы в цитоплазме нейронов (в цингулятной коре – на 10 и 31%, во фронтальной – на 10 и 25%, в париетальной – на 18 и 25%, соответственно) (рисунки 5.3, 5.4; приложение 2, таблица 7).



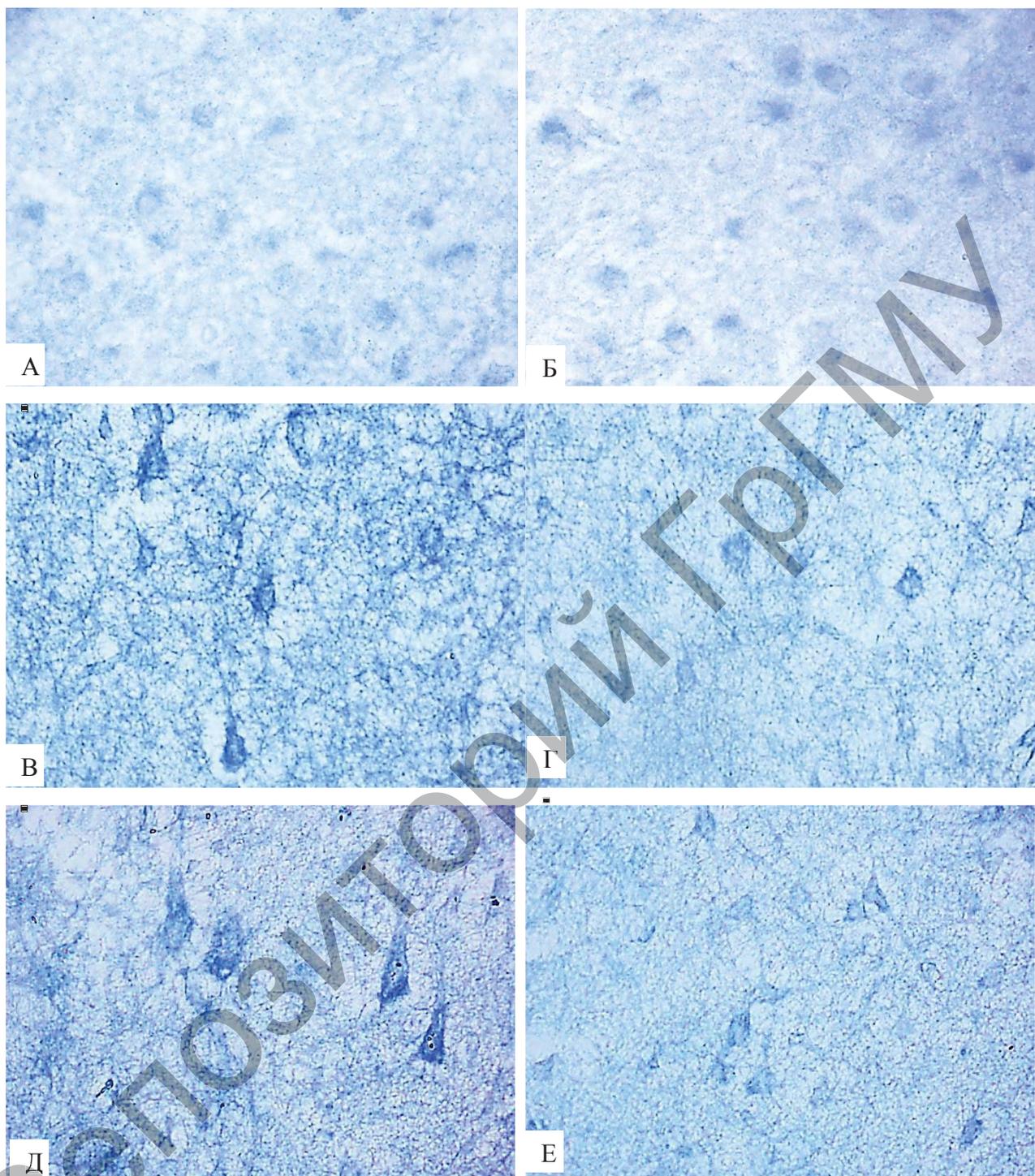
Окраска поЭйнарсону. Цифровая микрофотография. Ув. 400

Рисунок 5.1. – Нейроны 5-го слоя цингулятной коры контрольных крысят (А, В) и повышение содержания в них РНП у пренатально алкоголизированных крысят (Б, Г) на 5-е (А, Б) и 90-е (В, Г) сутки после рождения



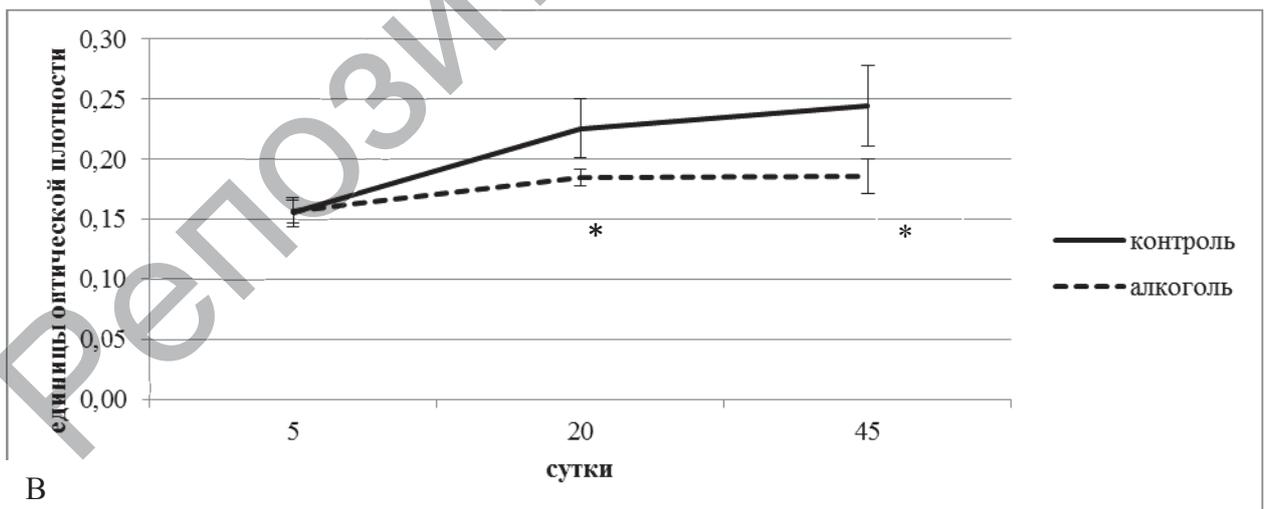
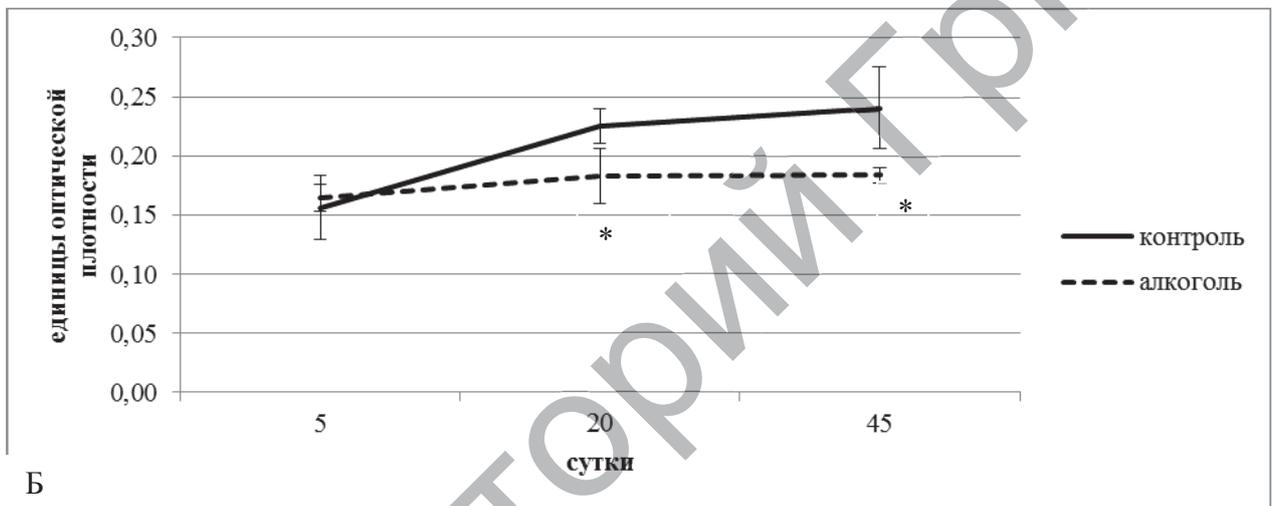
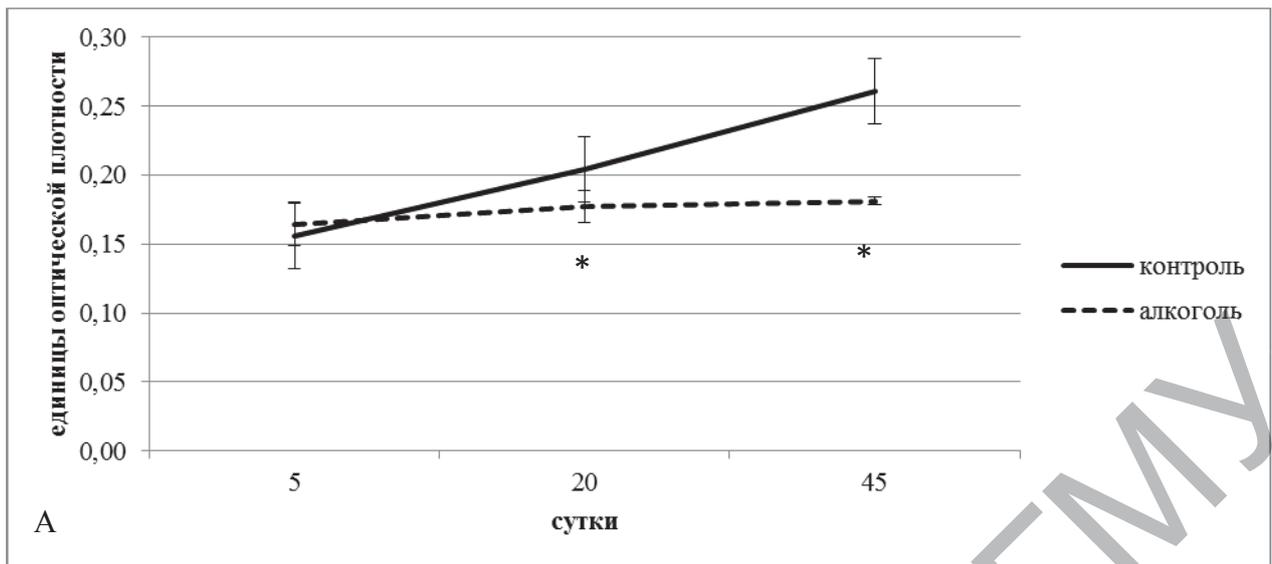
Me±IQR; * – p<0,05 по сравнению с контролем

Рисунок 5.2. – Динамика содержания РНП в цитоплазме нейронов 5-го слоя цингулятной (А), фронтальной (Б) и париетальной (В) коры мозга крыс в постнатальном онтогенезе



Окраска по Нахласу, Уокеру, Зелигману. Цифровая микрофотография. Ув. 400

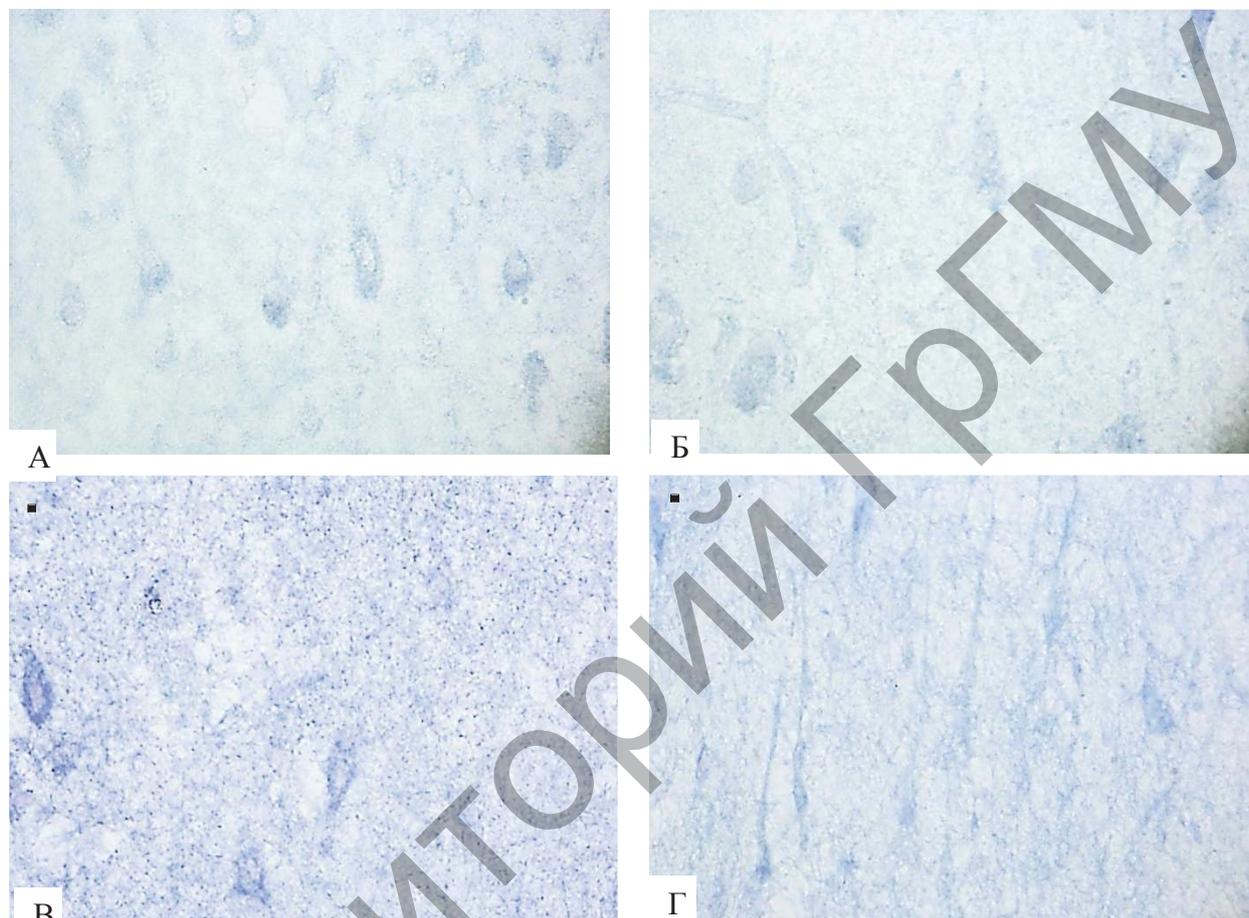
Рисунок 5.3. – Активность НАДН-ДГ в нейронах 5-го слоя фронтальной коры контрольных крысят (А, В, Д) и снижение ее у пренатально алкоголизированных крысят (Б, Г, Е) на 5-е (А, Б), 20-е (В, Г) и 45-е (Д, Е) сутки после рождения



Me±IQR; * – p<0,05 по сравнению с контролем

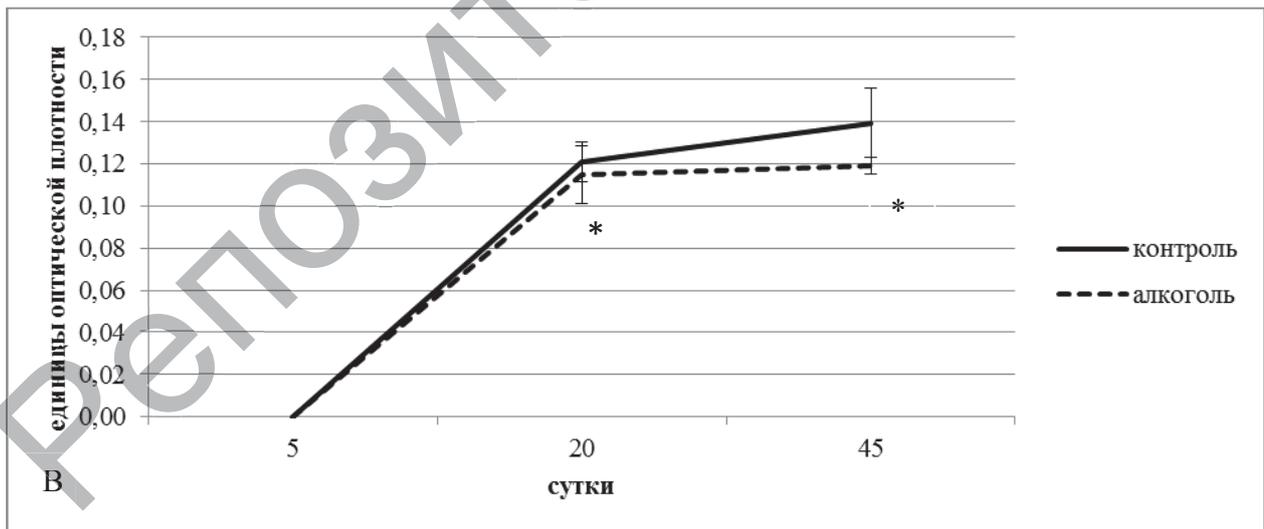
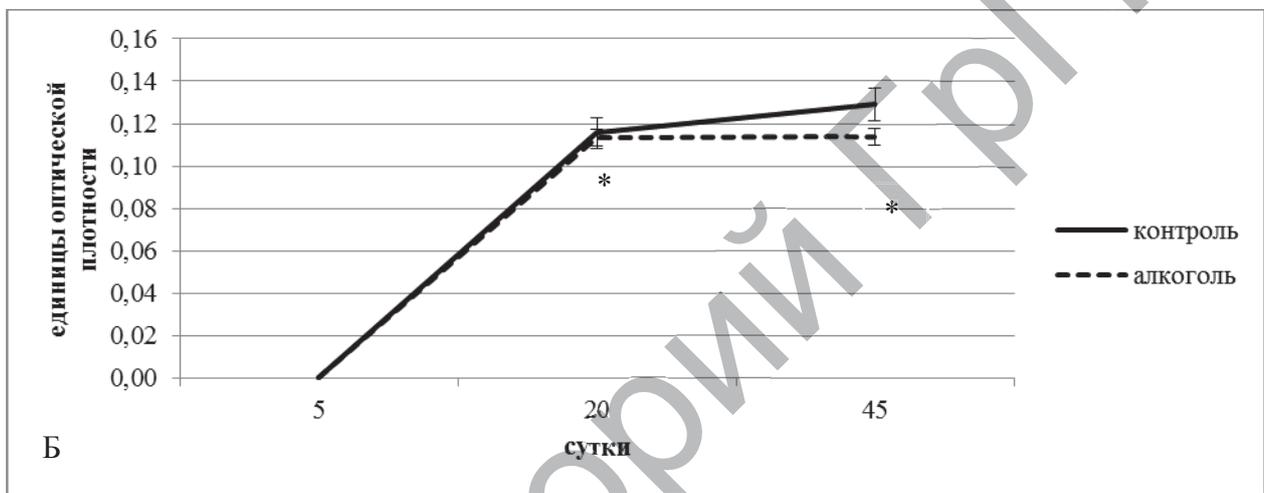
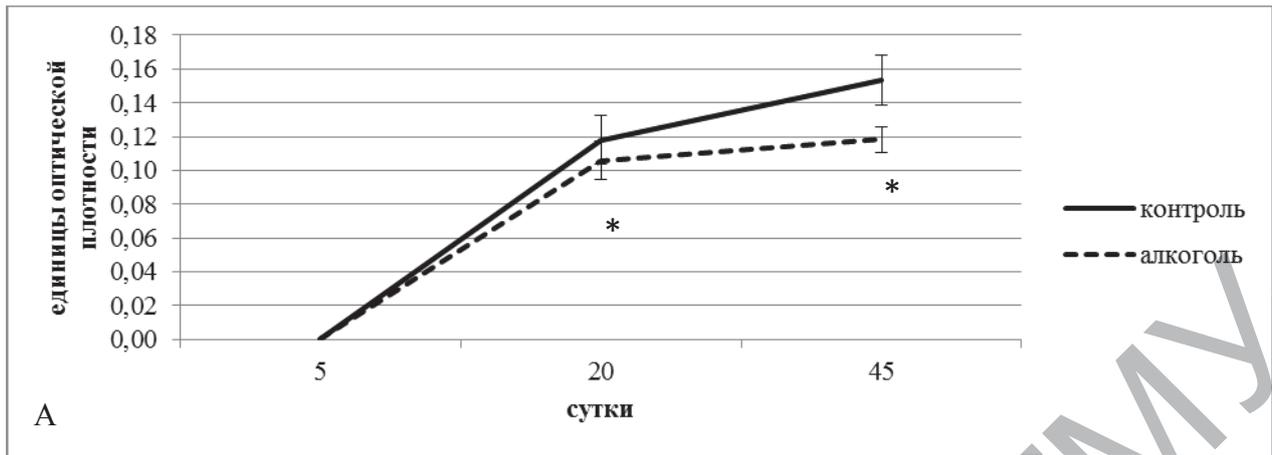
Рисунок 5.4. – Изменение активности НАДН-ДГ в нейронах 5-го слоя цингулярной (А), фронтальной (Б) и париетальной (В) коры мозга крыс в постнатальном онтогенезе

На 20-е сутки выявлена тенденция к снижению активности НАДФН-дегидрогеназы в цитоплазме нейронов коры крыс опытной группы, а на 45-е сутки снижение становится достоверным (в цингулятной коре – на 20%, во фронтальной – на 12%, в париетальной – на 15%) (рисунки 5.5, 5.6, приложение 2, таблица 7).



■ Окраска по Гесс, Скарпели, Пирсу. Цифровая микрофотография. Ув. 400

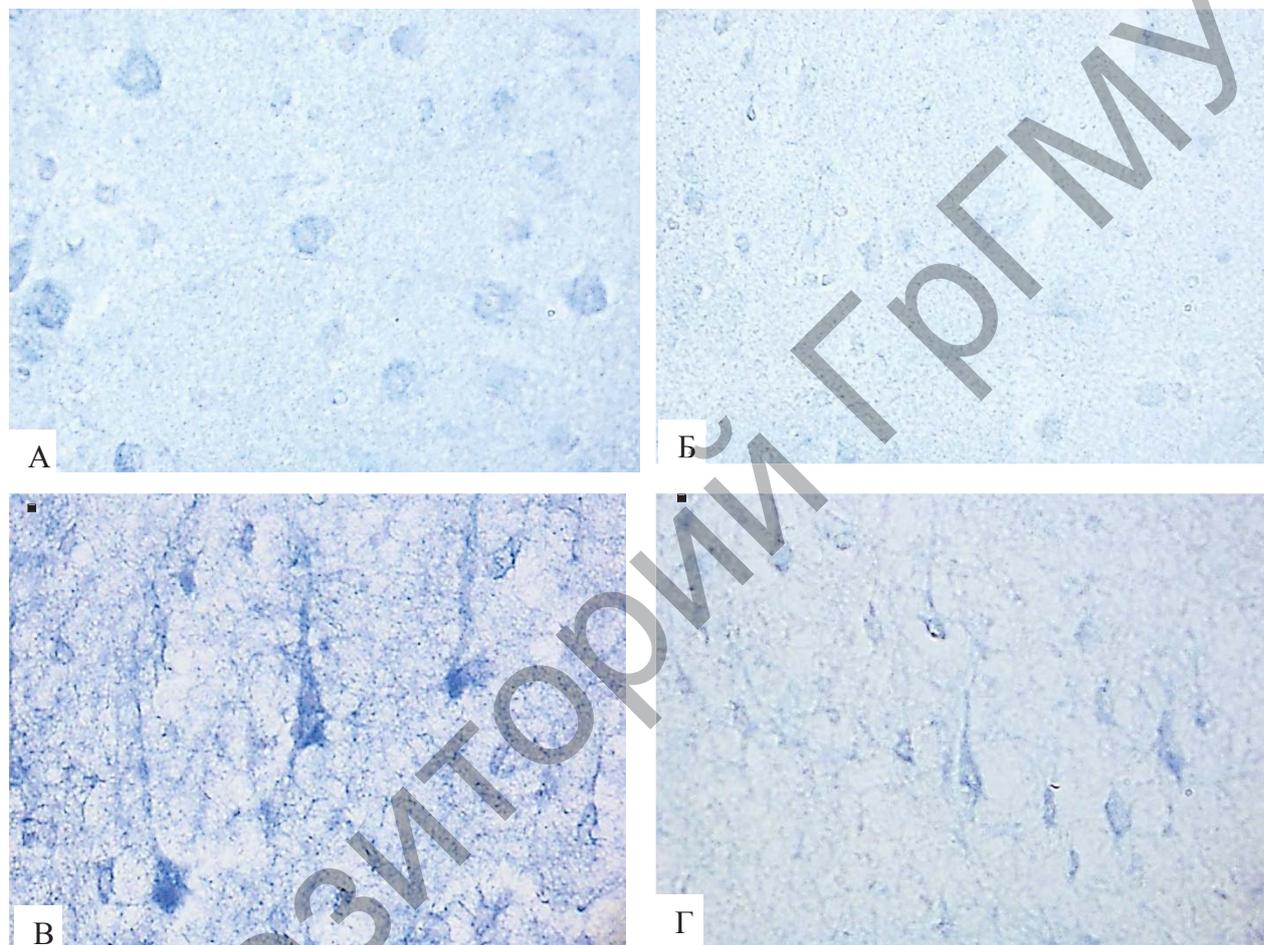
Рисунок 5.5. – Активность НАДФН-ДГ в нейронах 5-го слоя цингулятной коры контрольных крысят (А, В) и снижение ее у пренатально алкоголизированных крысят (Б, Г) на 20-е (А, Б) и 45-е (В, Г) сутки после рождения



Me±IQR; * – p<0,05 по сравнению с контролем

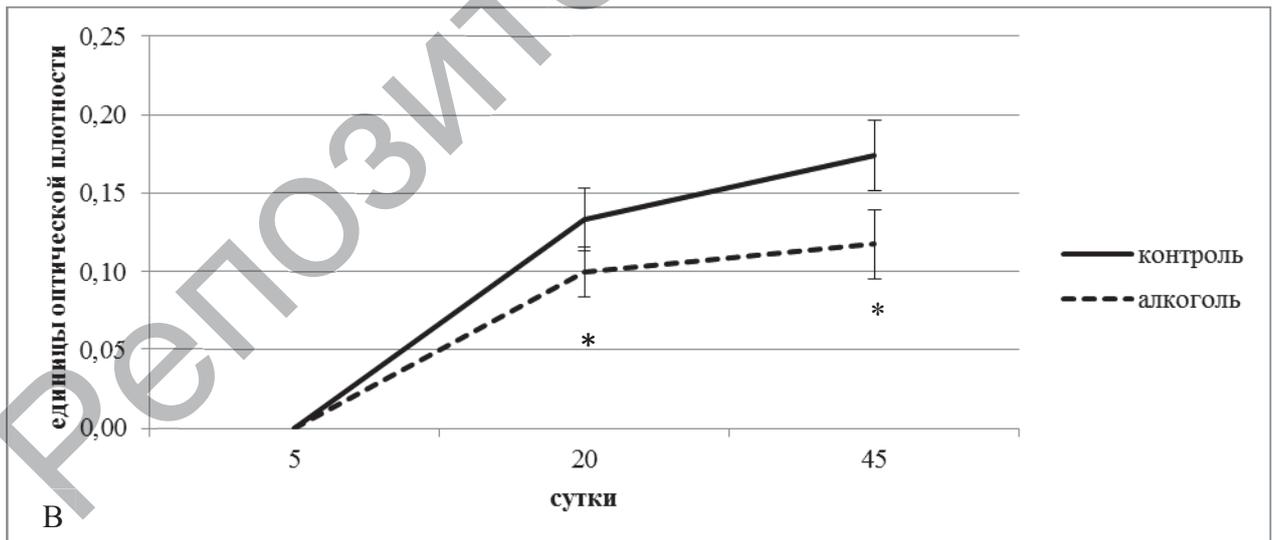
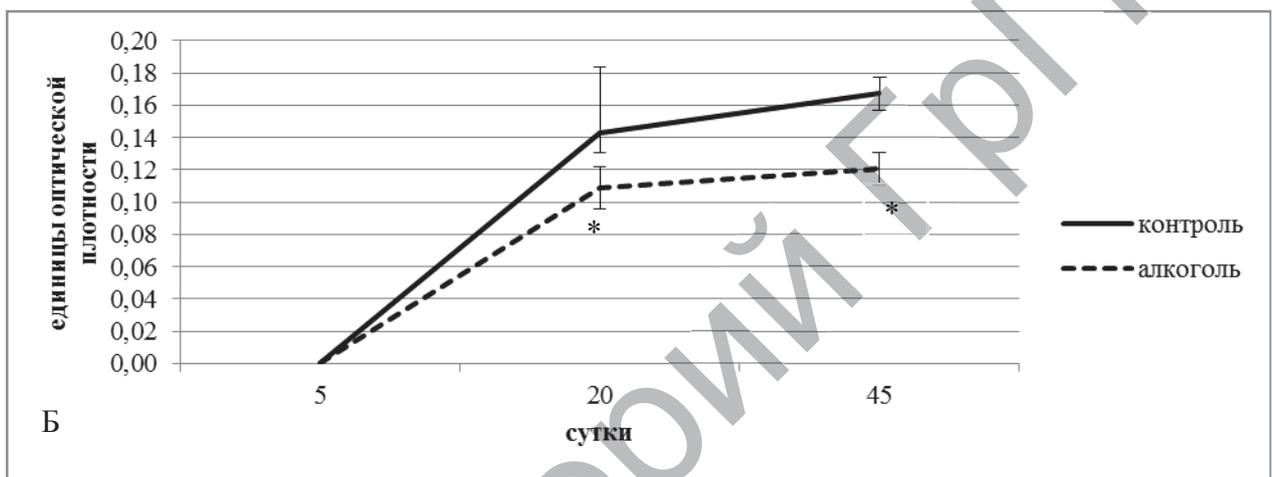
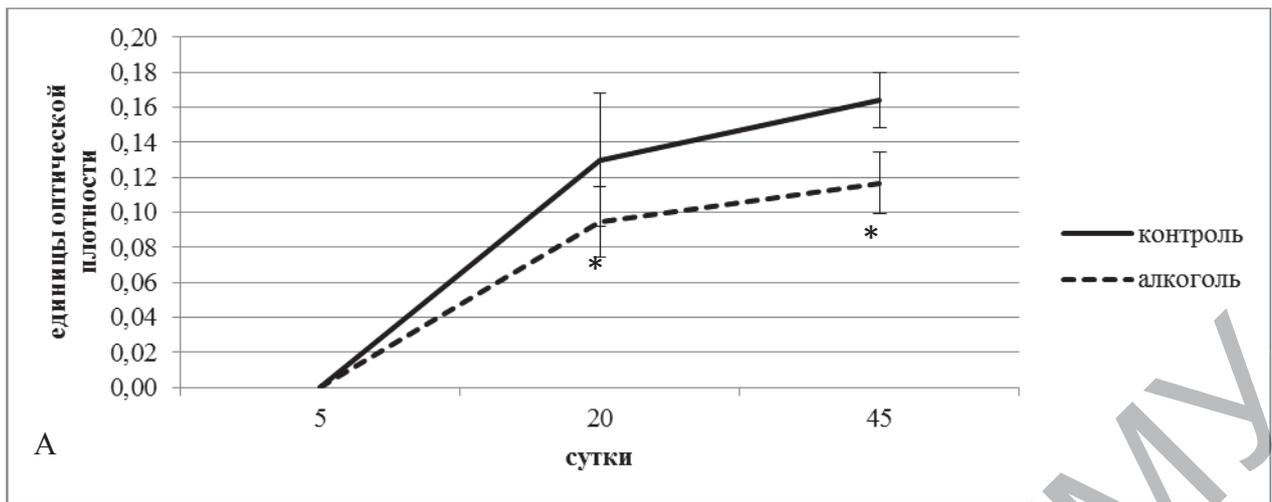
Рисунок 5.6. – Изменение активности НАДФН-ДГ в нейронах 5-го слоя цингулярной (А), фронтальной (Б), париетальной (В) коры мозга крыс в постнатальном онтогенезе

На 20-е и 45-е сутки постнатального развития выявлено статистически достоверное снижение активности СДГ в цитоплазме нейронов коры мозга потомства крыс, потреблявших алкоголь во время беременности (в цингулятной коре – на 31 и 27%, во фронтальной – на 21 и 29%, в париетальной – на 23 и 29%, соответственно) (рисунки 5.7, 5.8, приложение 2, таблица 7).



Окраска по Нахласу и др. Цифровая микрофотография. Ув. 400

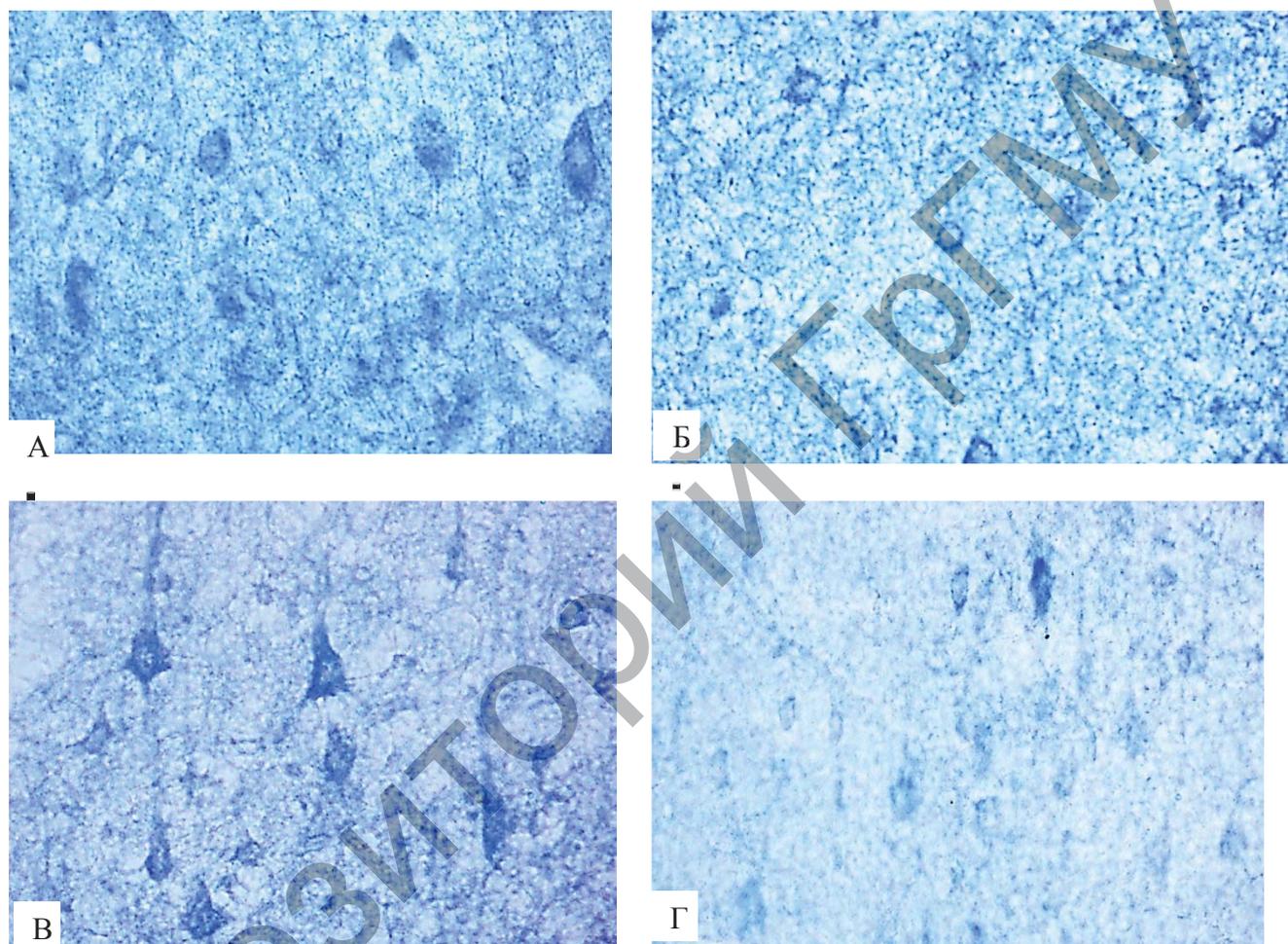
Рисунок 5.7. – Активность СДГ в нейронах 5-го слоя париетальной коры контрольных крысят (А, В) и снижение ее у пренатально алкоголизированных крысят (Б, Г) на 20-е (А, Б) и 45-е (В, Г) сутки после рождения



Me±IQR; * – p<0,05 по сравнению с контролем

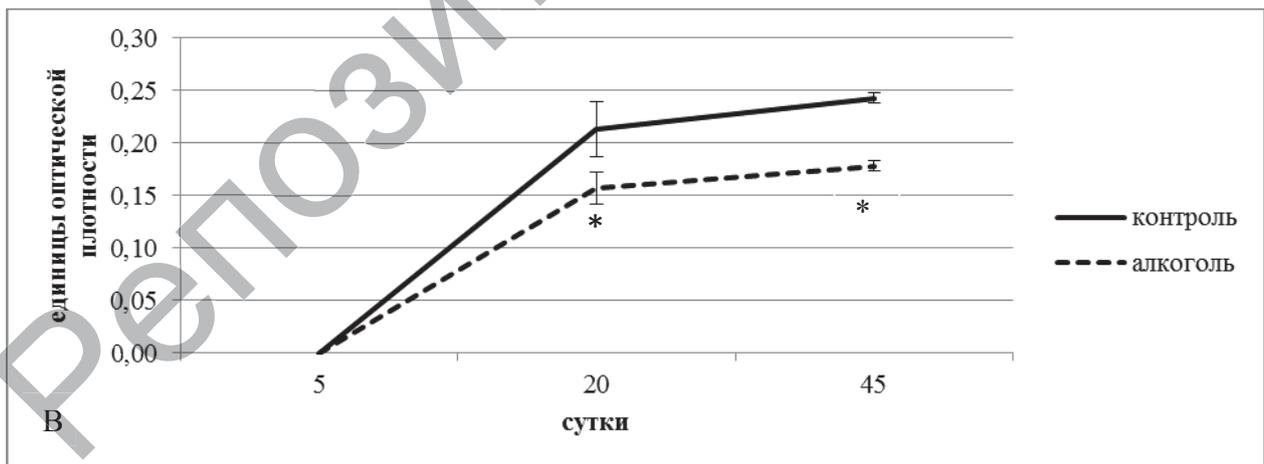
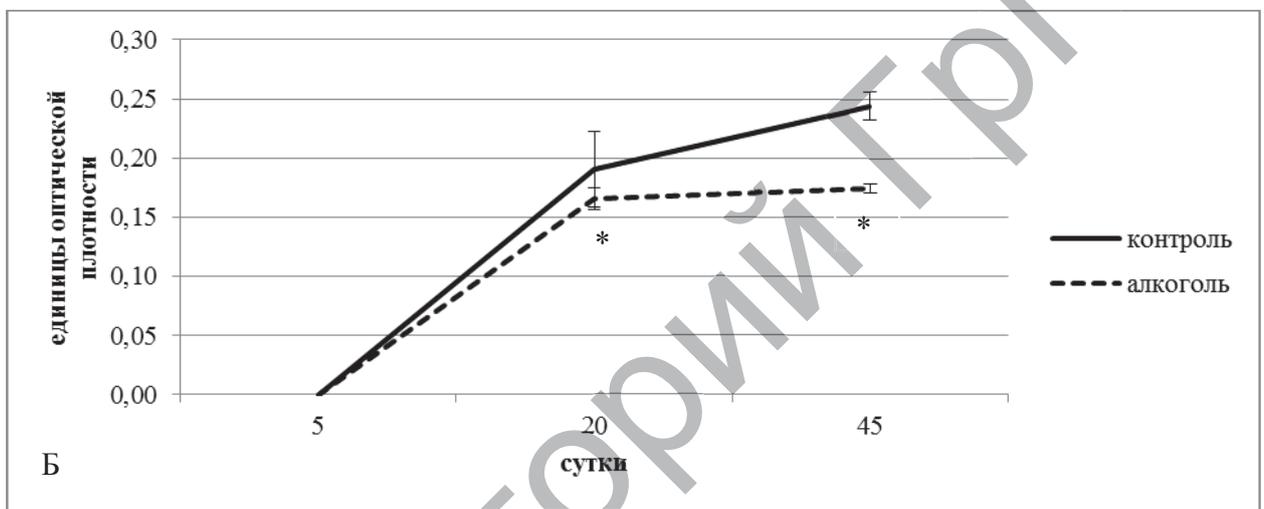
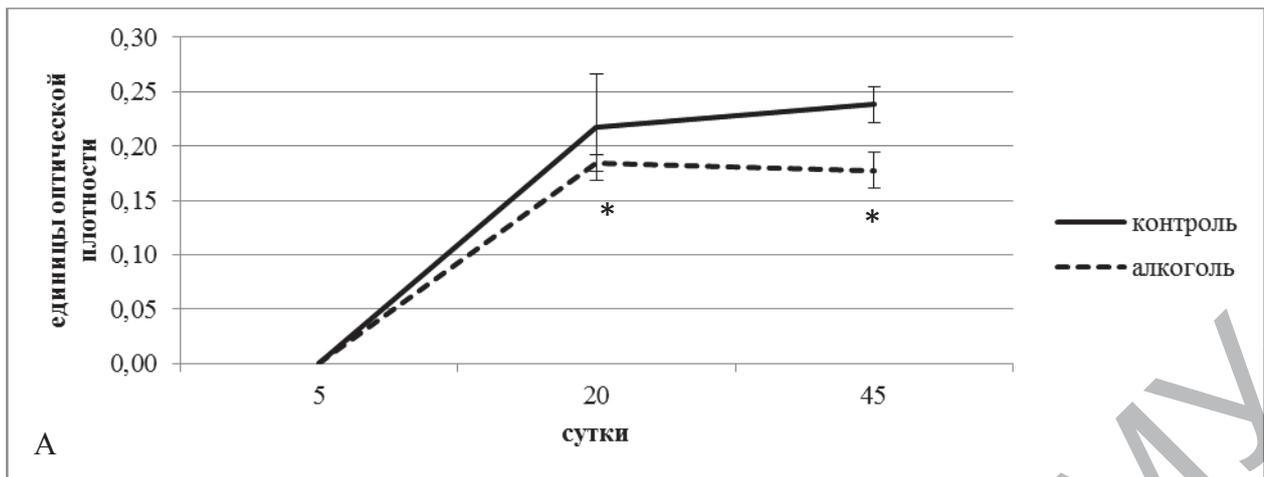
Рисунок 5.8. – Изменение активности СДГ в нейронах 5-го слоя цингулятной (А), фронтальной (Б), парietальной (В) коры мозга крыс в постнатальном онтогенезе

На 20-е и 45-е сутки постнатального развития установлено статистически достоверное снижение активности Г-6-Ф-ДГ в цитоплазме нейронов коры мозга крыс опытной группы (в цингулятной коре – на 18 и 25%, во фронтальной – на 16 и 29%, в париетальной – на 24 и 26%, соответственно) (рисунки 5.9, 5.10, приложение 2, таблица 7).



Окраска по Гесс, Скарпели, Пирсу. Цифровая микрофотография. Ув. 400

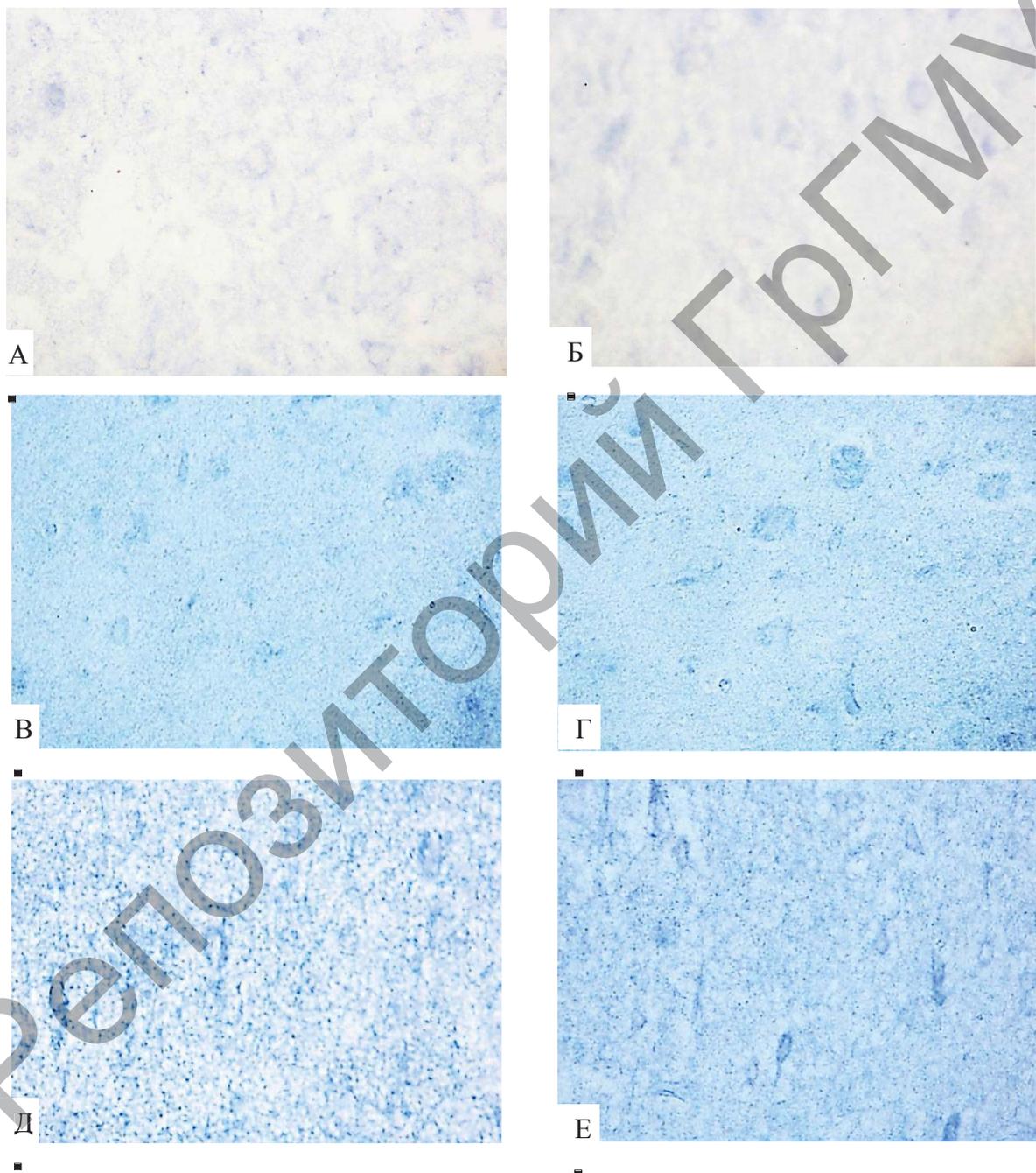
Рисунок 5.9. – Активность Г-6-Ф-ДГ в нейронах 5-го слоя цингулятной коры контрольных крысят (А, В) и снижение ее у пренатально алкоголизированных крысят (Б, Г) на 20-е (А, Б) и 45-е (В, Г) сутки после рождения



Me±IQR; * – p<0,05 по сравнению с контролем

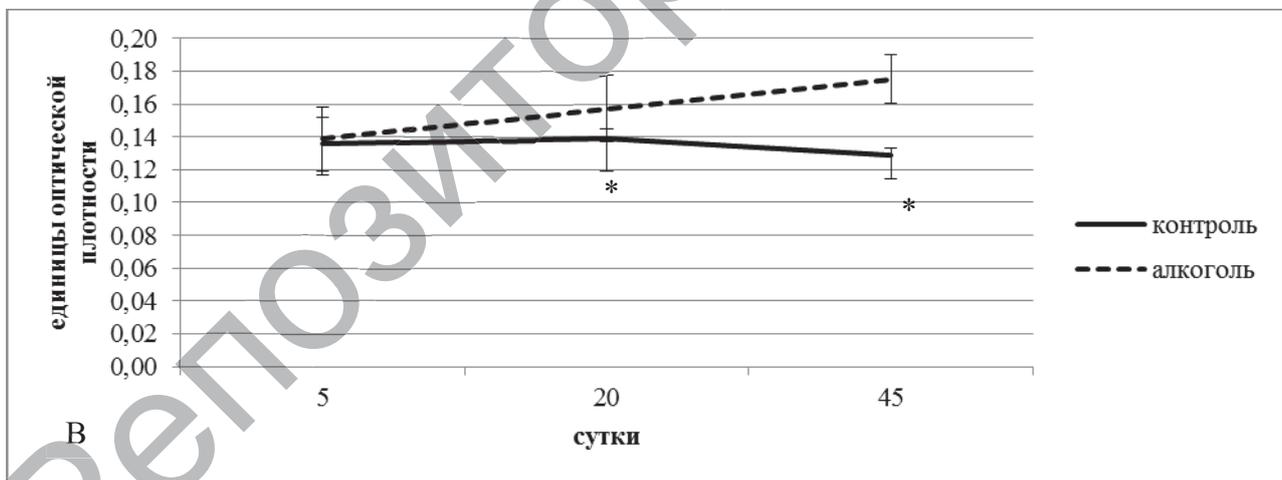
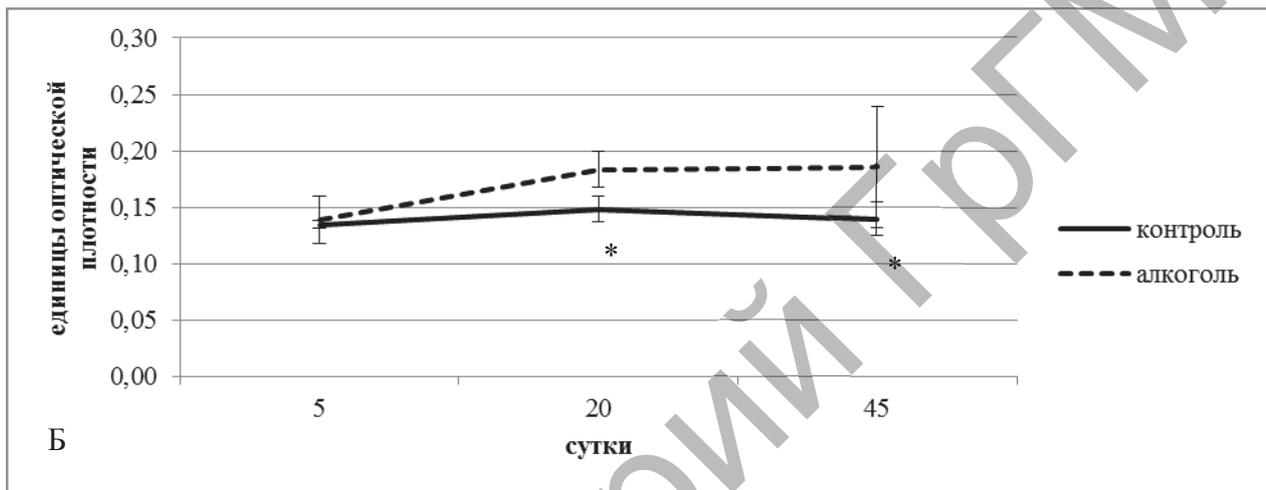
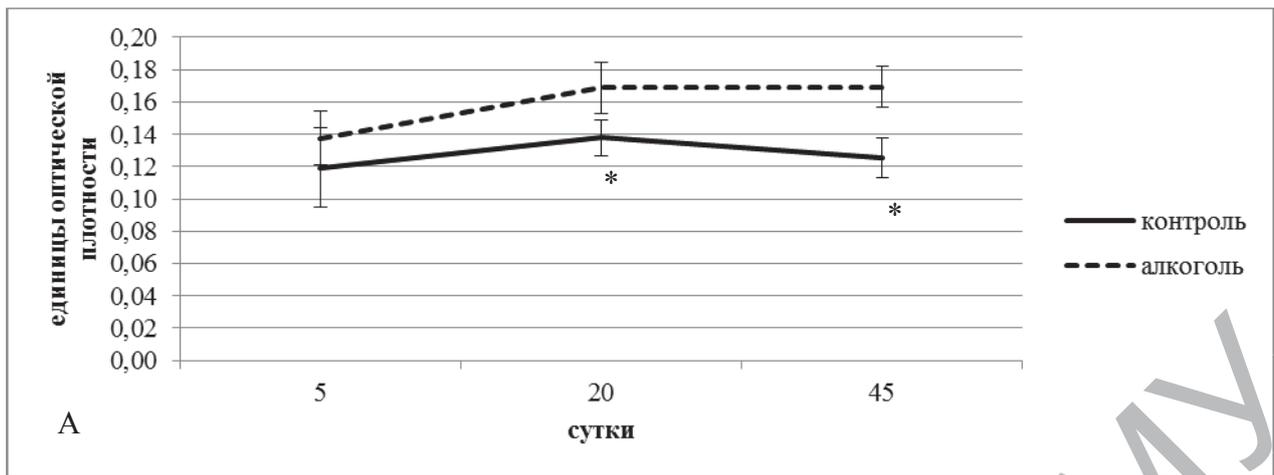
Рисунок 5.10. – Изменение активности Г-6-Ф-ДГ в нейронах 5-го слоя цингулятной (А), фронтальной (Б) и париетальной (В) коры мозга крыс в постнатальном онтогенезе

Происходит повышение активности ЛДГ. На 20-е и 45-е сутки постнатального развития выявлено статистически достоверное повышение активности ЛДГ в цитоплазме нейронов коры мозга крыс опытной группы (в цингулятной коре – на 18 и 26,5%, во фронтальной – на 17 и 22%, в париетальной – на 12,5 и 26%, соответственно) (рисунки 5.11, 5.12; приложение 2, таблица 7).



Окраска по Гесс, Скарпели, Пирсу. Цифровая микрофотография. Ув. 400

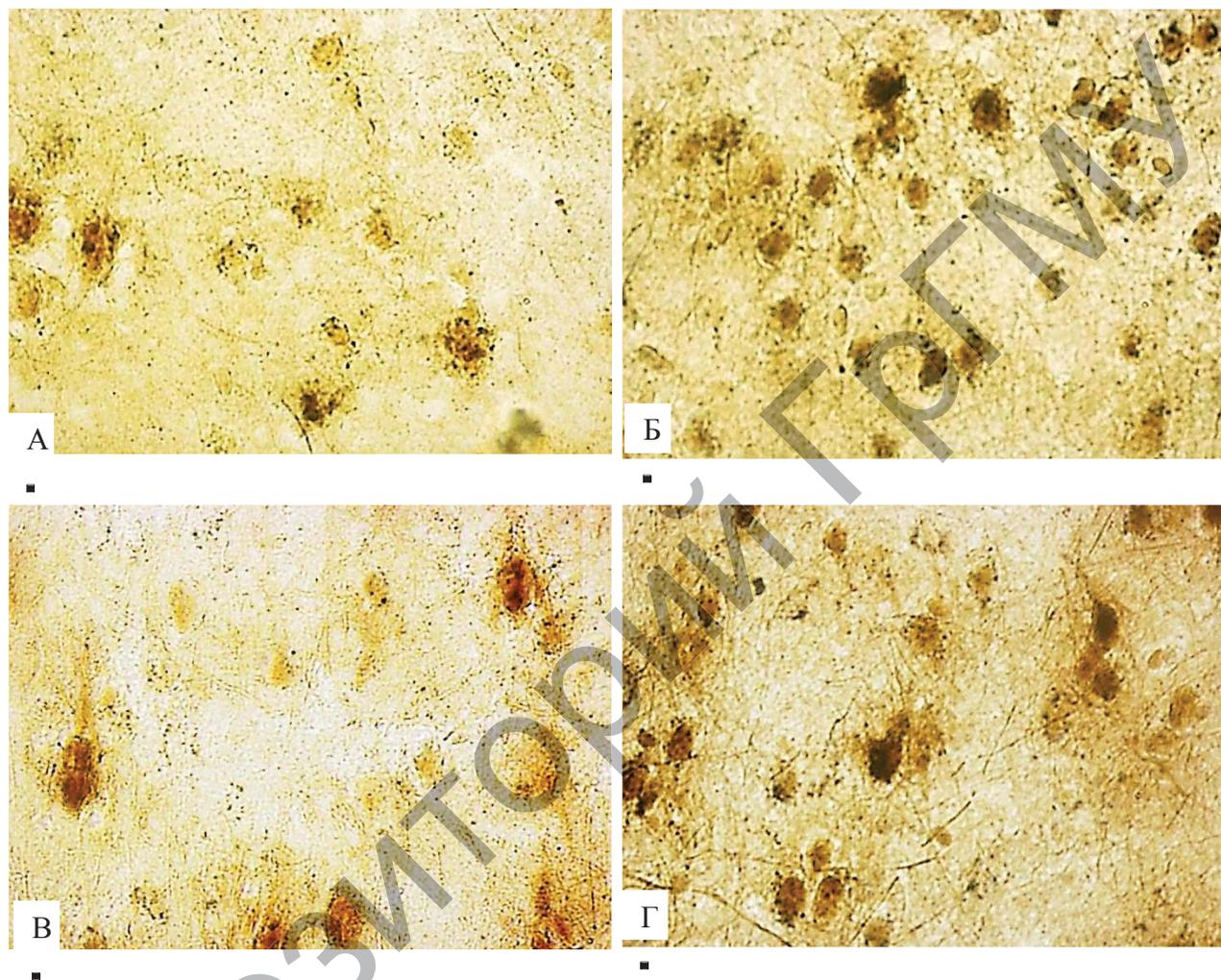
Рисунок 5.11. – Активность ЛДГ в нейронах 5-го слоя фронтальной коры контрольных крысят (А, В, Д) и повышение ее у пренатально алкоголизованных крысят (Б, Г, Е) на 5-е (А, Б), 20-е (В, Г) и 45-е (Д, Е) сутки после рождения



Me±IQR; * – p<0,05 по сравнению с контролем

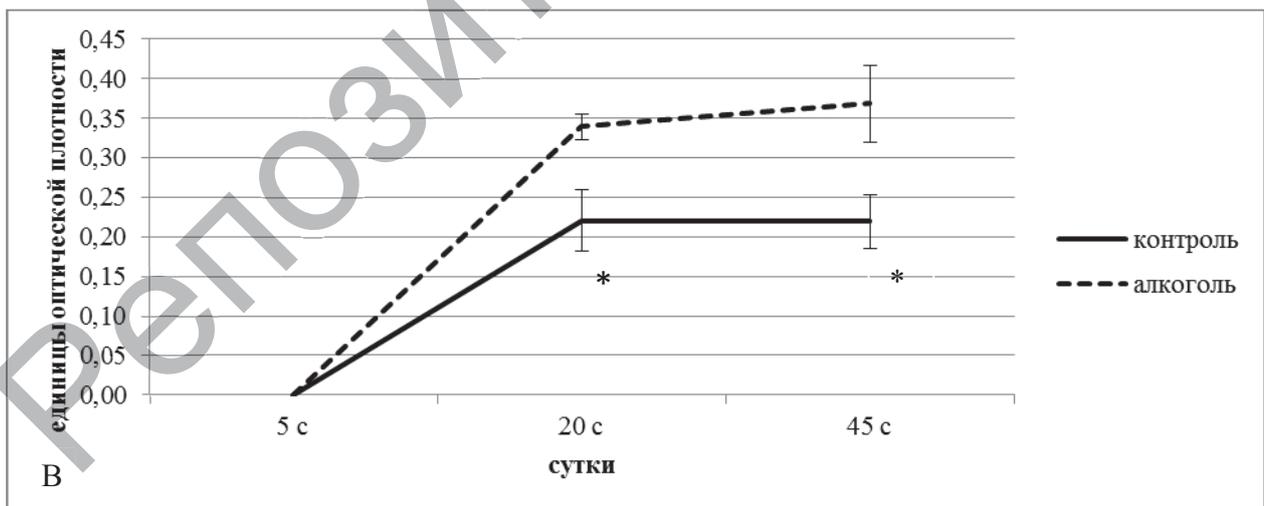
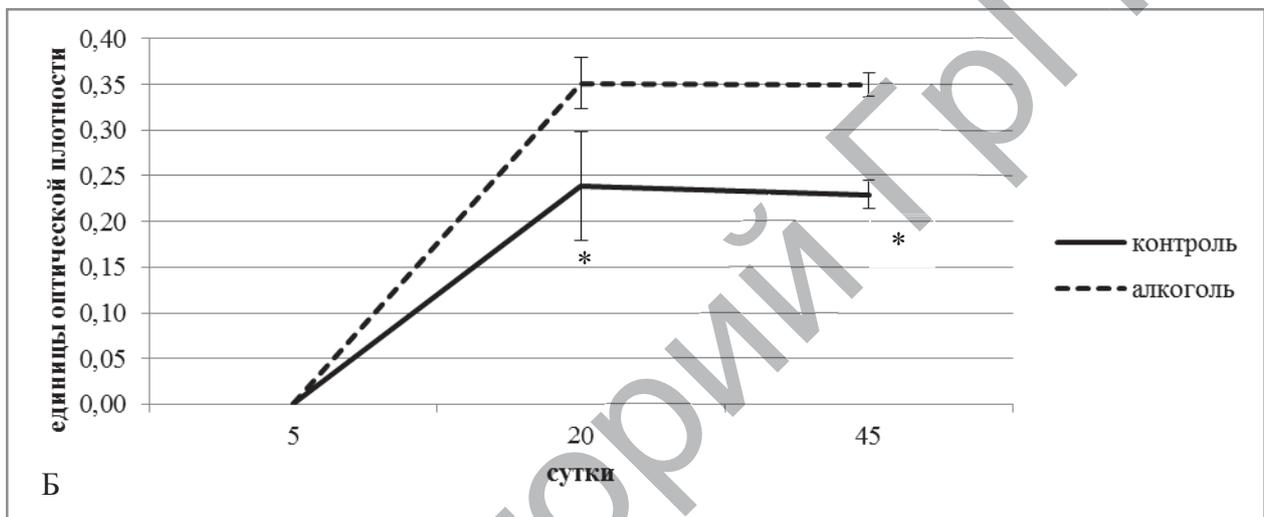
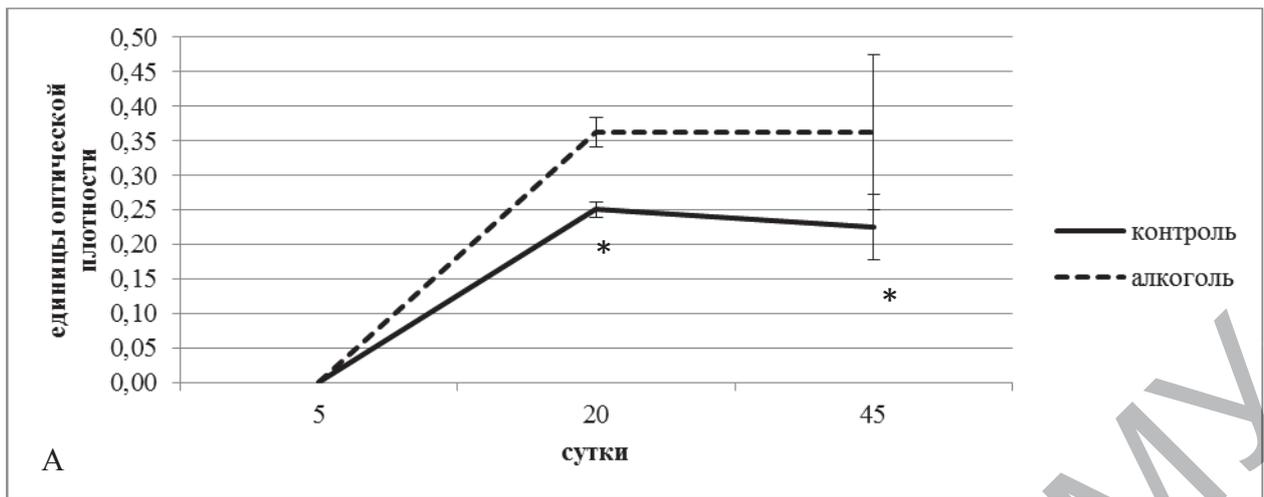
Рисунок 5.12. – Изменение активности ЛДГ в нейронах 5-го слоя цингулярной (А), фронтальной (Б), и париетальной (В) коры мозга крыс в постнатальном онтогенезе

На 20-е и 45-е сутки постнатального развития установлено статистически достоверное повышение активности КФ в цитоплазме нейронов мозга крыс опытной группы (в цингулятной коре – на 31 и 39%, во фронтальной – на 31 и 34%, в париетальной – на 35 и 41%) (рисунки 5.13, 5.14; приложение 2, таблица 7).



Окраска по Гомори. Цифровая микрофотография. Ув. 400

Рисунок 5.13. – Активность КФ в нейронах 5-го слоя париетальной коры контрольных крысят (А, В) и повышение ее у пренатально алкоголизированных крысят (Б, Г) на 20-е (А, Б) и 45-е (В, Г) сутки после рождения



Me±IQR; * – p<0,05 по сравнению с контролем

Рисунок 5.14. – Изменение активности КФ в нейронах 5-го слоя цингулятной (А), фронтальной (Б) и париетальной (В) коры мозга крыс в постнатальном онтогенезе

В целом пренатальная алкоголизация приводит к перестройке метаболизма нейронов коры мозга: в цитоплазме нейронов опытных животных происходит снижение активности маркерного фермента митохондрий, СДГ – фермента аэробного окисления углеводов в цикле Кребса, НАДН-ДГ – митохондриального фермента, участвующего в переносе электронов и являющегося важным связующим звеном между конечными продуктами распада углеродного скелета и дыхательной цепью, НАДФН-ДГ – фермента, отражающего интенсивность протекания внемитохондриальных энергетических процессов, а также Г-6-Ф-ДГ – внемитохондриального фермента, связанного с пентозофосфатным путем. При этом происходит компенсаторное возрастание активности ЛДГ – показателя интенсивности анаэробного гликолиза. Активация КФ – маркерного фермента лизосом – отражает усиление процессов аутофагии, направленных на удаление поврежденных мембран и органелл в нейронах [Бонь, 2016а; Pirs, 1960]. Данные изменения свидетельствуют о нарушениях углеводно-энергетического обмена и функциональной активности нейронов коры мозга на 20-е и 45-е сутки постнатального развития, что может лежать в основе остановки роста и гибели этих нейронов, наблюдаемых в предыдущих исследованиях.

Полагают, что антенатальная алкоголизация снижает выживаемость нейронов и нарушает их функции, вызывая окислительный стресс, повреждение ДНК и митохондриальную дисфункцию, а также подавление сигналов инсулина, необходимых для обеспечения жизнеспособности, метаболизма, формирования синапсов и синтеза ацетилхолина [de la Monte, 2011]. Выявленные морфофункциональные изменения нейронов коры головного мозга могут лежать в основе известных неврологических и поведенческих нарушений у животных после антенатальной алкоголизации: слуховой дисфункции, задержки речи, неспособности к обобщению и обучению, когнитивных, сенсомоторных и эмоциональных расстройств [Зиматкин, 2014; Зиматкин, 2016].

Иммуногистохимические изменения в мозге после антенатальной алкоголизации

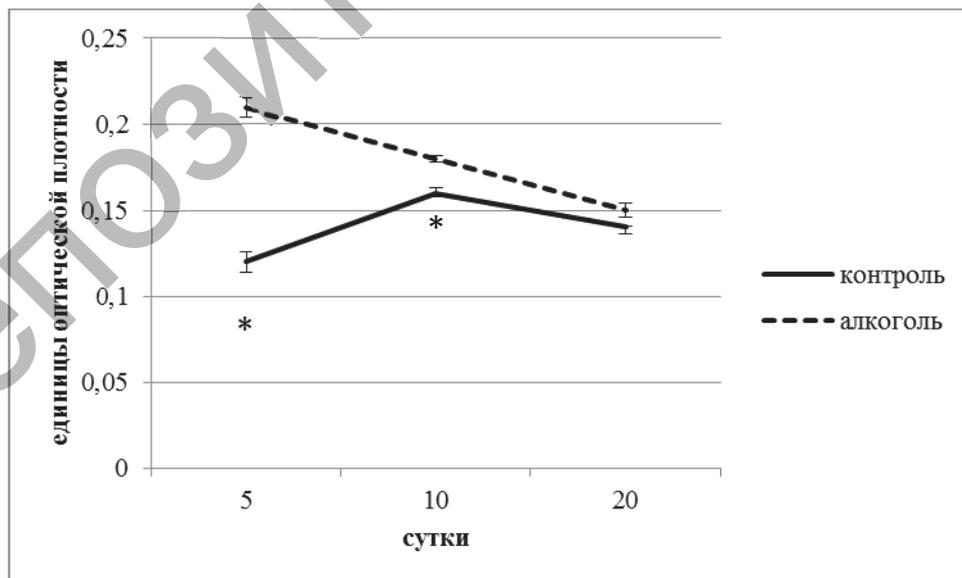
На 5-е сутки после рождения иммунореактивность даблкортина (DCX) в коре головного мозга контрольных животных была выражена лишь в нейропиле (в растущих отростках нейронов), а в перикарионах нейроцитов она оставалась низкой. У антенатально алкоголизованных животных более высокая экспрессия DCX выявлялась в перикарионах, а в нейропиле заметно уступала таковой в контроле (рисунки 5.15, 5.16; приложение 2, таблица 8). Это указывает на незрелость нейронов и запаздывание развития их отростков.

На 10-е сутки постнатального развития низкая иммунореактивность DCX определялась в перикарионах, умеренная – в нейропиле. При этом в перикарионах нейронов опытных животных она была достоверно выше, а в нейропиле – ниже, чем в контроле (рисунки 5.15, 5.16; приложение 2, таблица 8). На 20-е сутки после рождения определялась слабая экспрессия DCX, и она уже существенно не различается в перикарионах и нейропиле контрольной и опытной групп (рисунки 5.15, 5.16; приложение 2, таблица 8).



Экспрессия DCX. Цифровая микрофотография. Ув. 400

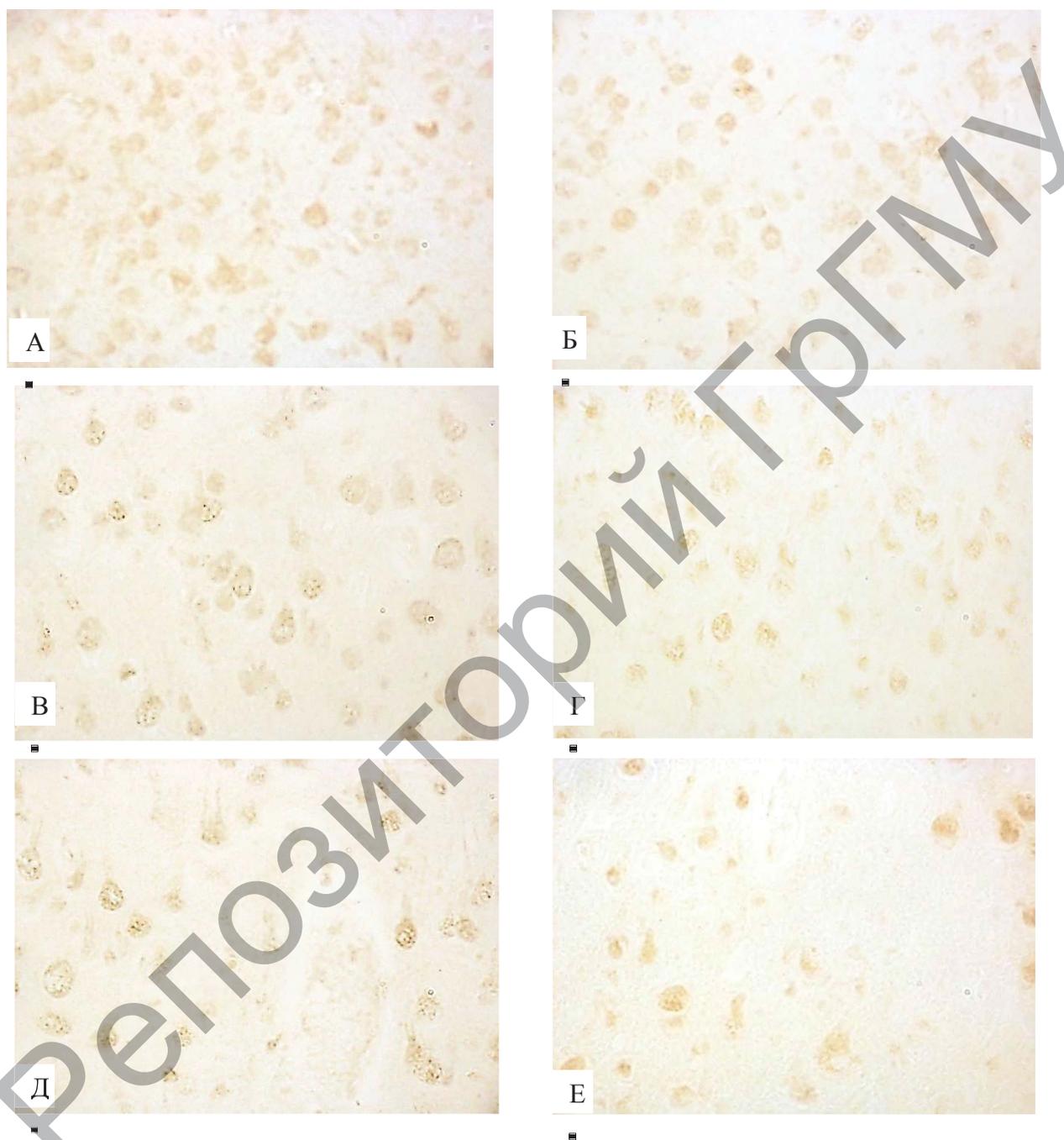
Рисунок 5.15. – Нейроны 5-го слоя фронтальной коры контрольных крысят (А, В, Д) и повышение экспрессии DCX у пренатально алкоголизированных крысят (Б, Г, Е) на 5-е (А, Б), 10-е (В, Г) и 20-е (Д, Е) сутки после рождения



Me±IQR; * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем

Рисунок 5.16. – Изменение экспрессии DCX в перикарионах нейронов 5-го слоя фронтальной коры мозга крыс в разные сроки после рождения

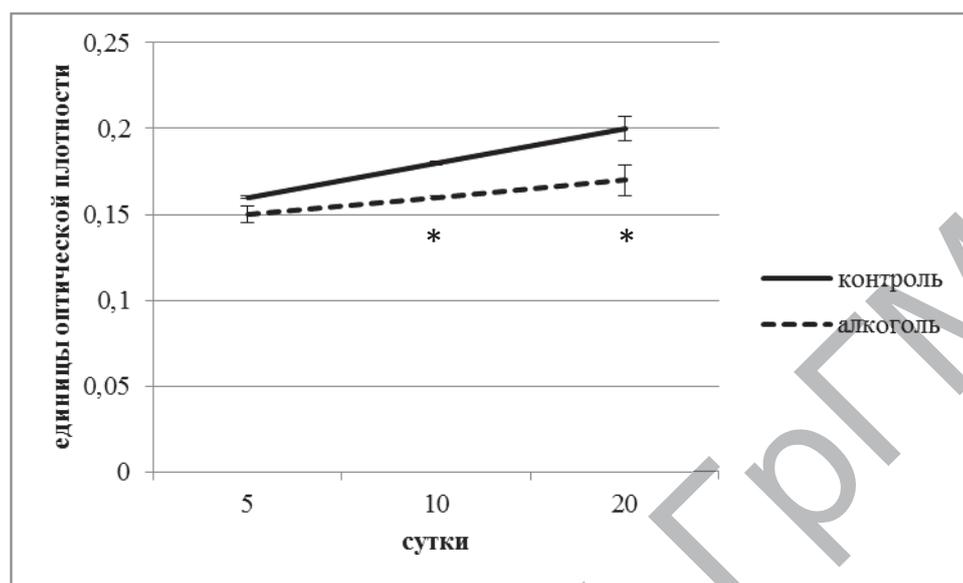
Экспрессия белка NeuN в период с 5-х по 20-е сутки постнатального развития у контрольных животных несколько возрастала в перикарионах нейронов, но была ниже у антенатально алкоголизированных крысят (рисунки 5.17, 5.18; приложение 2, таблица 9).



Экспрессия NeuN. Цифровая микрофотография. Ув. 400

Рисунок 5.17. – Нейроны 5-го слоя фронтальной коры контрольных крысят (А, В, Д) и снижение экспрессии NeuN у пренатально алкоголизированных крысят (Б, Г, Е) на 5-е (А, Б), 10-е (В, Г) и 20-е (Д, Е) сутки после рождения

Это подтверждается литературными данными о том, что алкоголь нарушает процесс созревания нейронов в эмбриогенезе [Gressens, 1992. Ethanol-induced, Arrone].

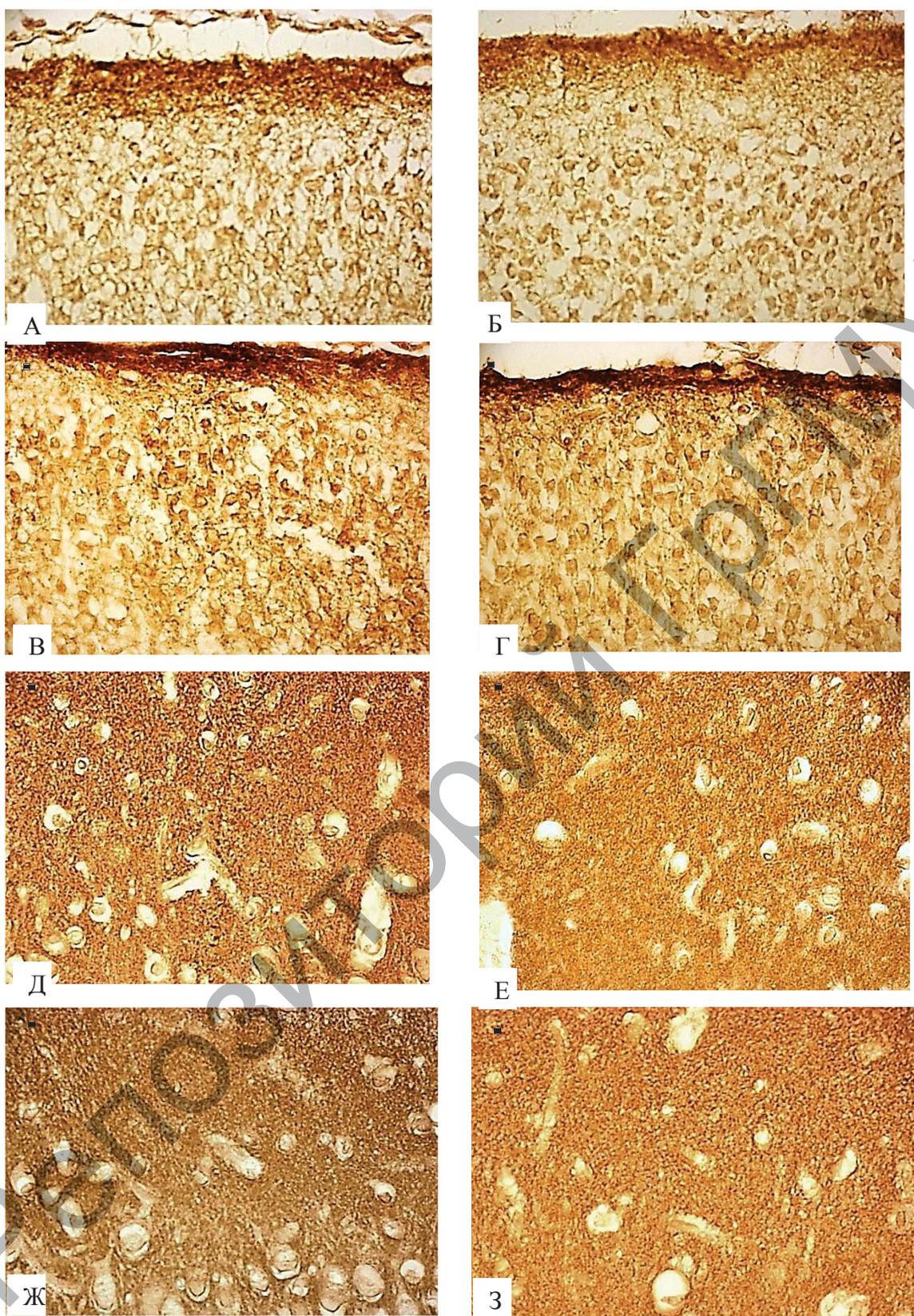


Me±IQR; * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем

Рисунок 5.18. – Изменение экспрессии NeuN в перикарионах нейронов 5-го слоя фронтальной коры мозга крыс в разные сроки после рождения

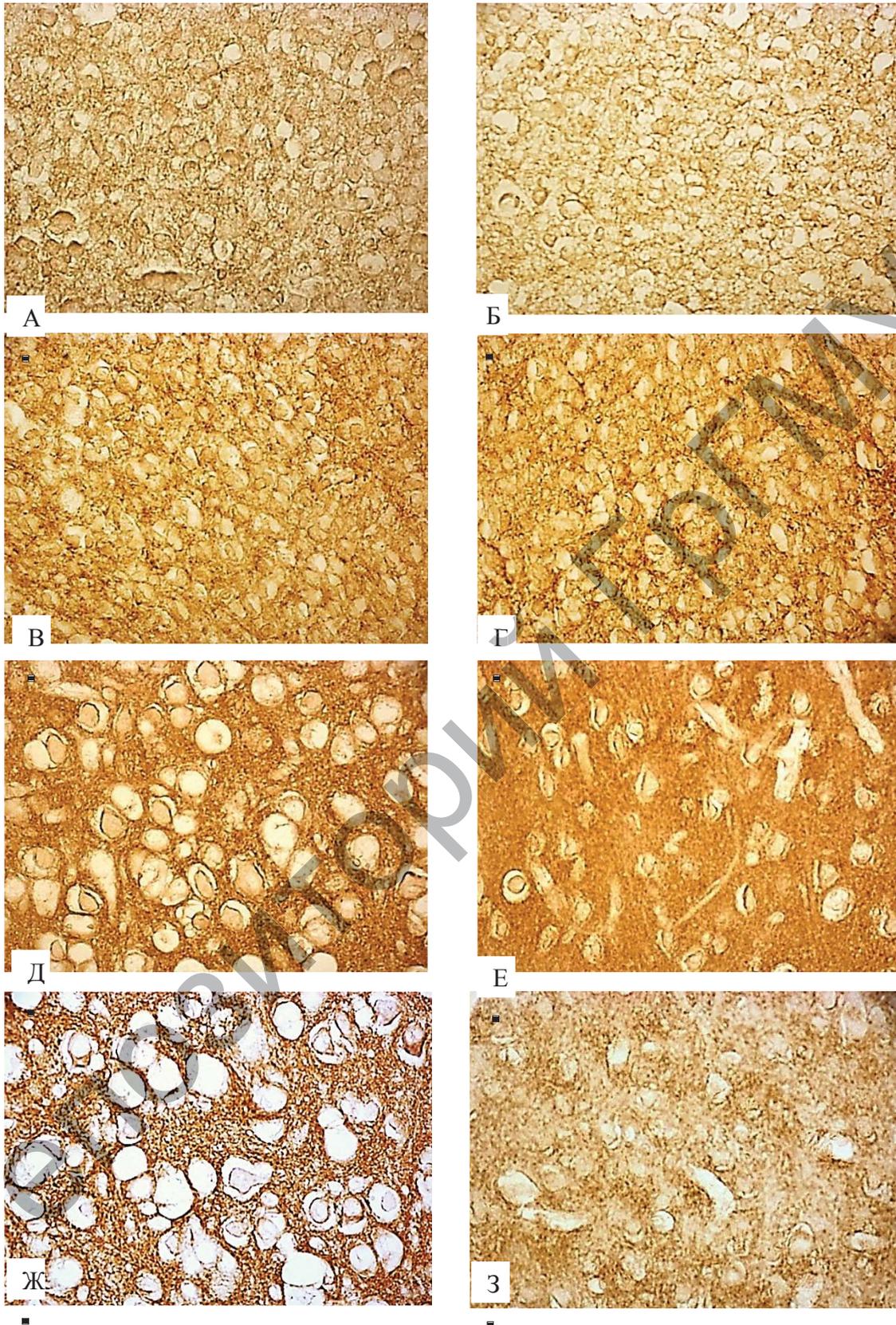
В 5-м слое фронтальной коры как у контрольных, так и у опытных животных в постнатальном онтогенезе наблюдалось прогрессивное нарастание экспрессии синаптофизина (СФ).

Так, на 5-е сутки после рождения иммунореактивность СФ в нейропиле нейронов 1-го и 5-го слоев у антенатально алкоголизированных животных заметно уступала таковой в контроле. На 10-е сутки постнатального развития иммунореактивность СФ в пределах 1-го слоя коры опытных животных была достоверно ниже, чем в контроле. При этом в нейропиле нейронов 5-го слоя достоверных различий не наблюдалось. На 20-е и 45-е сутки после рождения экспрессия СФ в нейропиле нейронов как 1-го, так и 5-го слоев фронтальной коры мозга антенатально алкоголизированных крыс была существенно ниже, чем в контрольной группе (рисунки 5.19, 5.20, 5.21, 5.22; приложение 2, таблица 10, 11). Это указывает на запаздывание синаптогенеза.



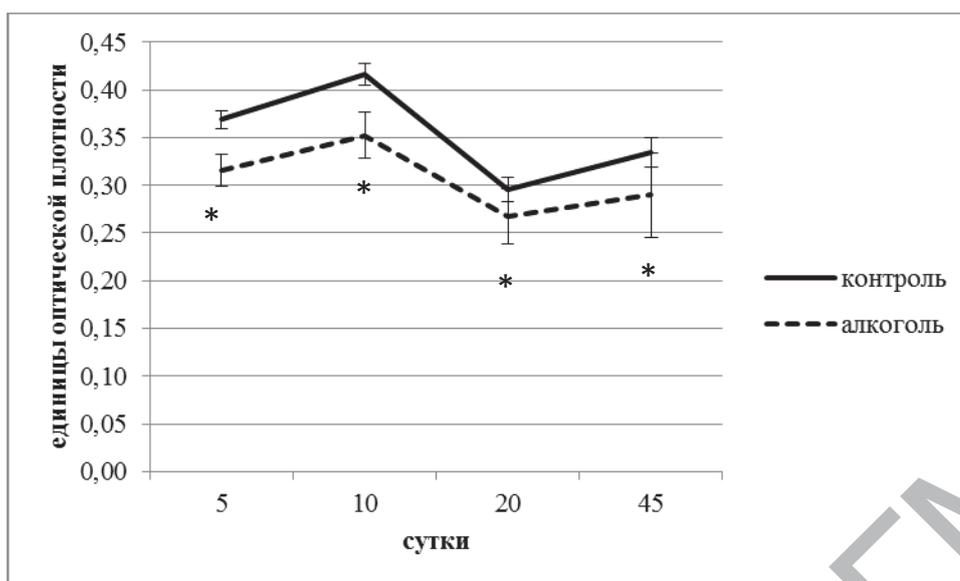
Экспрессия СФ. Цифровая микрофотография. Ув. 400

Рисунок 5.19. – Нейроны 1-го слоя фронтальной коры контрольных крысят (А, В, Д, Ж) и снижение экспрессии СФ у пренатально алкоголизированных крысят (Б, Г, Е, З) на 5-е (А, Б), 10-е (В, Г), 20-е (Д, Е) и 45-е (Ж, З) сутки после рождения



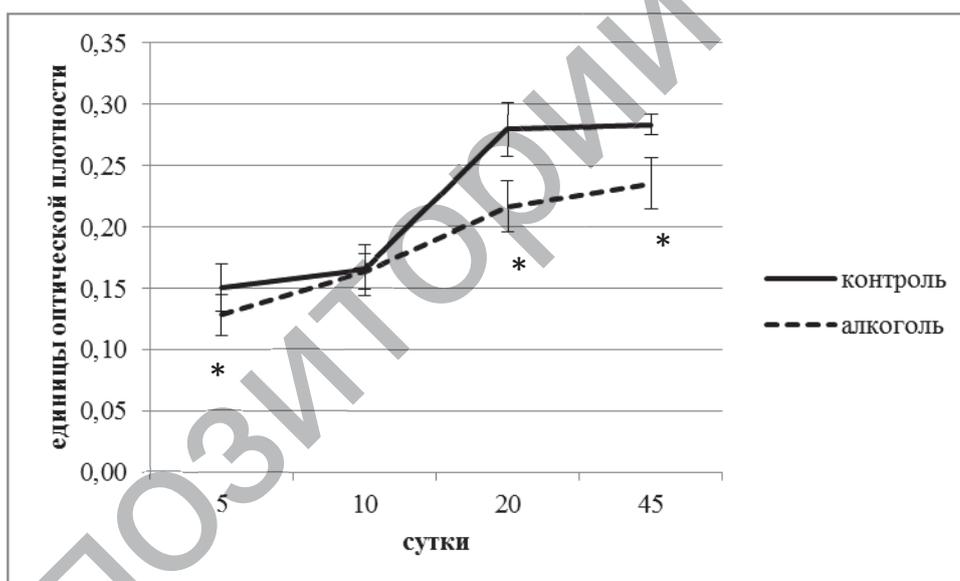
Экспрессия СФ. Цифровая микрофотография. Ув. 400

Рисунок 5.20. – Нейроны 5-го слоя фронтальной коры контрольных крысят (А, В, Д, Ж) и снижение экспрессии СФ у пренатально алкоголизированных крысят (Б, Г, Е, З) на 5-е (А, Б), 10-е (В, Г), 20-е (Д, Е) и 45-е (Ж, З) сутки после рождения



Me±IQR; * – p<0,05 по сравнению с контролем

Рисунок 5.21. – Изменение экспрессии СФ в молекулярном слое фронтальной коры мозга крыс в разные сроки после рождения



Me±IQR; * – p<0,05 по сравнению с контролем

Рисунок 5.22. – Изменение экспрессии СФ в 5-м слое фронтальной коры мозга крыс в разные сроки после рождения

Таким образом, экспрессия DCX в нейронах коры головного мозга крыс с 5-х по 20-е сутки постнатального развития у интактных животных низка, а у опытных животных на 5-10-е сутки она была повышенной, и только к 20-м суткам уменьшалась до контрольного уровня. Это свидетельствует о задержке развития и отставании созревания нейронов коры мозга у антенатально алкоголизированных крыс. Напротив, в нейропиле у них экспрессия DCX

на 5-10-е сутки становилась меньше, констатируя отставание развития отростков нейронов [Бонь, 2016в]. Это соответствует данным литературы о том, что даблкортин экспрессируется незрелыми нейронами в период развития мозга и лишь позднее идентифицируется в растущих отростках нейронов [Friocourt, 2003].

NeuN связан с созреванием нейронов, так как он экспрессируется в ядрах и перинуклеарной цитоплазме большинства зрелых нейронов ЦНС на поздних этапах их дифференцировки, и не выявляется в незрелых нервных клетках [Mullen, 1992]. Нами установлено, что экспрессия белка NeuN с 5-х по 20-е сутки постнатального развития постепенно закономерно возрастает в нейронах коры мозга всех животных, но в нейронах опытных крыс этот процесс заторможен, что подтверждает задержку развития и замедление созревания нейронов у антенатально алкоголизированных крыс.

Экспрессия СФ в нейропиле нейронов 5-го слоя фронтальной коры головного мозга крыс с 5-х по 45-е сутки постнатального развития постепенно закономерно возрастает, что связано с прогрессивным синаптогенезом, особенно в период с 10-х по 20-е сутки постнатального развития. В то же время повышение экспрессии СФ на 5-10-е сутки и ее снижение – на 20-е и 45-е сутки постнатального развития в пределах молекулярного слоя может быть связано с понижением плотности синапсов в нейропиле в процессе быстрого роста толщины молекулярного слоя коры в постнатальном онтогенезе. Экспрессия СФ в изучаемых слоях фронтальной коры мозга антенатально алкоголизированных крыс заметно снижена, что указывает на задержку формирования синаптических пузырьков и синаптогенеза в целом. Полученные результаты в целом соответствуют литературным данным, согласно которым пренатальная алкоголизация вызывает снижение уровня экспрессии пресинаптических белков complexin I и II в префронтальной коре [Eastwood, 2005; Barr, 2005. Prenatal; Sawada, 2005].

Выявленные нарушения синаптогенеза нейронов коры головного мозга могут лежать в основе известных неврологических и поведенческих нарушений (слуховой дисфункции, неспособности к обобщению и обучению, когнитивных, сенсомоторных и эмоциональных расстройств), обнаруживаемых у потомства животных, потреблявших алкоголь во время беременности [Зиматкин, 2013].

Выводы. Таким образом, антенатальное воздействие алкоголя вызывает значительные и разнообразные нарушения клеточных и

молекулярно-генетических механизмов развития и жизнедеятельности мозга, лежащие в основе морфологических и функциональных изменений ЦНС при алкогольном синдроме плода.

Аntenатальная алкоголизация вызывает глубокие и разнообразные нарушения метаболизма нейронов коры головного мозга в постнатальном онтогенезе. Так, выявленное снижение активности СДГ свидетельствует о торможении аэробного окисления углеводов в цикле Кребса, Г-6-Ф-ДГ – об угнетении пентозофосфатного пути, НАДН-ДГ и НАДФН-ДГ – о торможении митохондриальных и немитохондриальных энергетических процессов, соответственно. Напротив, после антенатальной алкоголизации в цитоплазме нейронов коры мозга крыс происходит увеличение активности маркерного фермента лизосом КФ, что указывает на усиление процессов аутофагии, а также фермента ЛДГ, что свидетельствует об усилении поздних этапов гликолиза, протекающих в анаэробных условиях и необходимых для компенсаторного поддержания жизнедеятельности нейронов [Бонь, 2016а].

Таким образом, потребление крысами этанола во время беременности приводит к замедлению развития (созревания) нейронов коры головного мозга у потомства, что проявляется в торможении снижения экспрессии маркера незрелости нейронов (даблкортина), отставании экспрессии маркера зрелости нейронов (NeuN), и формирования синаптических контактов нейронов фронтальной коры головного мозга, что проявляется отставанием экспрессии маркера синаптогенеза (СФ) в нейропиле 1- и 5-го слоев коры мозга. Выявленные нарушения носят долгосрочный характер и сохраняются на 45-е сутки постнатального развития [Бонь, 2016в].

Глава 6

ПАТОГЕНЕЗ НАРУШЕНИЙ В МОЗГУ ПРИ АНТЕНАТАЛЬНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ АЛКОГОЛЯ

Несмотря на большое количество данных, указанных выше, о нарушениях, возникающих при антенатальной алкоголизации у плода на молекулярном, клеточном, органном, системном и организменном уровнях, а также после рождения, на социальном уровне (в результате поведенческих, неврологических нарушений и при взаимодействии с другими людьми), целостное представление о взаимосвязях между этими многочисленными нарушениями и о патогенезе ФАС отсутствует. В настоящей главе мы попытаемся на уровне современных знаний, с учётом мнений других учёных, концептуально подойти к этому вопросу и представить собственное видение патогенеза ФАС.

Патогенез ФАС нельзя объяснить одним механизмом. По мнению большинства исследователей, ведущими факторами в патогенезе ФАС является *сам алкоголь*, а также его метаболит – *ацетальдегид (АА)* [Hamby-Mason, 1997]. Эти агенты оказывают как общетоксическое, так и специфическое действие на эмбрион. Введение АА беременным животным практически полностью воспроизводит симптоматику ФАС. Характерно, что уровень АА в крови матери, потребляющей этанол, значительно возрастает в конце беременности и во время лактации, оказывая повреждающее воздействие на мозг плода [Gordon, 1985. Prenatal alcohol].

По нашим представлениям, первоначальной причиной повышенной чувствительности организма плода, особенно его мозга, к действию алкоголя является повышенная этанолюкисляющая способность мозга плода в сочетании с пониженной активностью во всех его структурах альдегиддегидрогеназы (АльДГ). В результате свободно поступающий из крови матери в организм плода алкоголь быстро окисляется до токсического АА, который не удаляется АльДГ и в больших концентрациях накапливается в тканях мозга, вызывая их повреждение.

Наиболее выраженный эмбриотоксический эффект этанол, в особенности его метаболит АА, оказывают в период интенсивного деления клеток плода. В этой связи наиболее опасный период беременности в плане возникновения ФАС – первый триместр. В это

время происходит процесс органогенеза и клетки зародыша наиболее уязвимы к действию алкоголя и АА.

Одним из механизмов тератогенного воздействия алкоголя на ранних этапах эмбриогенеза является *повреждение молекул L1*, отвечающих за нормальную миграцию развивающихся клеток [Matsun, 1996]. Токсическое воздействие алкоголя в первые три недели беременности приводит к «клеточной смерти», сопровождающейся грубыми пороками развития ЦНС, сердца, почек и других органов плода и часто является причиной его внутриутробной гибели. *Клеточная смерть* может быть следствием двух механизмов – некроза, как реакции на прямое повреждающее действие алкоголя, и апоптоза. Число клеток, погибших по одной из этих моделей, зависит от длительности воздействия алкоголя и его дозы. Апоптоз является запрограммированным саморазрушением клетки, которое может запускаться токсическим влиянием этанола [Cartwright, 1998]. Алкоголь может запускать механизмы апоптоза путем блокады защитных эффектов фактора роста нервных клеток и инсулиноподобного фактора роста.

Алкоголь нарушает *экспрессию гена bcl-2*, который ингибирует апоптоз и таким образом запускает программу клеточной смерти. Исследование влияния алкоголя на экспрессию генов в критические периоды развития плода – перспективное направление исследования патогенеза ФАС [Разводовский, 2005]. Эмбриотоксические эффекты алкоголя на более поздних сроках беременности обусловлены воздействием на нейроэндокринные и нейрохимические процессы, повышением проницаемости гематоэнцефалического барьера, угнетением биосинтеза белка в мозге [Майзелис, 1983].

Появление у потомства под влиянием алкоголя специфических уродств указывает на их мутационную природу, что подтверждается экспериментальными исследованиями [Заблудовский, 1989]. *Повреждение генома* половых и зародышевых клеток может наблюдаться на любой стадии их развития. Основные мутагенные эффекты связывают с токсическим метаболитом алкоголя АА, который способен повреждать ДНК и увеличивать частоту мутаций [Sreenathan, 1982].

Аntenатальная алкогольная интоксикация сопровождается *окислительным стрессом*, активацией процессов перекисного окисления липидов. Свободнорадикальные механизмы играют важную роль в патогенезе ФАС. Активные формы кислорода в моз-

ге плода вызывают окислительное повреждение клеточных макромолекул (липидов, белков и нуклеиновых кислот). При этом свободные радикалы, взаимодействуя с ДНК, структурно модифицируют ее, что приводит к изменению экспрессии генов, вероятно, через немутагенные механизмы. Кроме того, свободные радикалы повреждают клеточные мембраны, а также мембраны органелл клетки, в частности митохондрий [Beal, 1997, Wells, 2016. Fetal oxidative].

Дефицит нутриентов антиоксидантов, таких как витамины А, Е, фолиевая кислота, железо, цинк, селен, также является важным механизмом мутагенеза. Снижение уровня *ретиноловой кислоты* (дериват витамина А) на фоне пренатальной алкоголизации способствует апоптозу клеток, что является причиной краниолицевого дисморфизма [Deltour, 1996].

Еще не до конца изучено *участие железа* в формировании FASD. В исследованиях на животных выяснено, что пренатальное воздействие алкоголя вызывало более тяжелые дефекты у тех из них, чьи матери имели низкое содержание железа в крови [Rufer, 2012].

При антенатальной алкоголизации повреждаются все органы и системы организма человека и животных, но в наибольшей степени страдает нервная система, особенно головной мозг [Зиматкин, 2014].

Механизмы алкогольного повреждения головного мозга плода

Этанол нарушает развитие стволовых нервных клеток мозга. В конце первого и в начале второго триместра из эмбриональных нервных стволовых клеток развиваются нейроны мозга, а этанол отрицательно влияет на их созревание. Для этанола уязвимы также и микро-РНК (не кодирующие белок), которые управляют экспрессией генов [Miranda, 2012; Balaraman, 2012]. Этанол оказывает влияние на стволовые нервные клетки, клетки-предшественницы глии и клетки-предшественницы нейронов, которые были изолированы во втором триместре беременности человека [Vangipuram, 2010].

Алкоголь нарушает миграцию нейробластов, что особо важно для развития слоистых структур, таких как кора головного мозга. После длительной алкоголизации самок у плодов и новорожденных крыс были обнаружены значительные морфологические дефекты, заметные задержки в миграции нейронов, снижение числа нейро-

бластов, и снижение уровня виментина, нестина, S-100b и Pax6, регулирующих радиальную миграцию нейробластов и глии [Aronne, 2011]. Во время миграции нейронов этанол вызывает преждевременное преобразование радиальной глии в астроциты. В результате нарушается строение и архитектура постмиграционной коры головного мозга [Gressens, 1992. Ethanol-induced].

Алкоголь нарушает процессы транскрипции и трансляции в мозге. Так, у мышей, подвергшихся пренатальному воздействию этанола, в мозге происходило нарушение экспрессии генов, детерминирующих когнитивные функции, тревожное поведение и колебания настроения (Lxat, Ache, Bcl2, Cul4b, Dkc1, Fbp, Sstr3, Otx2) [Kleiber, 2012. Long-term]. Потомство мышей, употреблявших во время беременности алкоголь, показало задержку появления неонатальных рефлексов. У мышей-подростков были выявлены нарушения процессов обучения и ориентировки в новых условиях, повышенная тревожность. На молекулярном уровне наблюдалось снижение экспрессии Glra 1 и Grin 2c генов [Kleiber, 2011].

У крыс, подвергавшихся действию алкоголя в 1-10-е сутки после рождения, на 42-е и 72-е сутки обнаружены нарушения иРНК в полушариях головного мозга, мозжечке, особенно в гиппокампе [Tewari, 1992]. Воздействие этанола в этот период (эквивалентный третьему триместру человеческой беременности), снижает уровень CREB-связывающего белка, который является компонентом эпигенетических механизмов управления экспрессией генов в нейронах. Кроме того, этанол нарушает процесс ацетилирования гистонов H3 и H4 в мозжечке у крыс. Эти эффекты этанола могут быть ответственными за возникновение двигательного дефицита и дефектов координации движений [Guo, 2011. Alcohol]. Аномальная экспрессия генов в клетках коры головного мозга может лежать в основе дефектов обучения, памяти и поведения после пренатальной алкоголизации [Abbott, 2016. The Impact].

С использованием двух отдельных линий эмбриональных стволовых клеток человека проведено исследование, которое показало, что даже небольшие количества этанола (20 мМ) изменяют транскрипцию ионотропных субъединиц GABRB3. Изменения же в экспрессии рецепторов влияют на развитие ЦНС и приводят к аномалиям мозга [Krishnamoorthy, 2011. GABRB3]. Уровни экспрессии β и α интегрин и фосфолипазы-С были значительно изменены в

коре головного мозга плодов, чьи матери употребляли этанол во время беременности [Di Nicolantonio, 2000; Rout, 2010].

Алкоголь нарушает нейротрофические факторы в мозге. В результате хронического пренатального воздействия этанола снижается их содержание в тканях мозга эмбриона. Такие изменения могут лежать в основе некоторых аномалий ЦНС при алкогольном синдроме плода [Heaton, 1992. Ethanol].

Пренатальное воздействие алкоголя увеличило уровни фактора роста нервов в лобной коре (в группе животных, получавших высокие дозы этанола) и черве мозжечка (в группах у животных, получавших и высокие, и низкие дозы). Уровень нейротрофического фактора мозга возрос в лобной коре, затылочной коре и гиппокампе (в группах, животные в которых получали низкие дозы), а также в черве мозжечка (в группе, где применены высокие дозы). Данные результаты отражают компенсаторные последствия антенатальной алкоголизации, направленные на нивелирование негативных эффектов этанола [Heaton, 2000. Ethanol-induced; Ickes, 2000. Long-term].

В сенсомоторной коре 10- и 20-суточных крысят, подвергавшихся воздействию этанола в течение первой недели постнатальной жизни, возросло количество нейронов, содержащих рецепторы к нейротрофину р75, особенно в двигательной коре. Следовательно, анатомические и функциональные изменения, наблюдаемые в коре головного мозга при внутриутробном воздействии этанола, могут быть связаны с нейротрофинами и/или их рецепторами [Moore, 2004. Ethanol; Hasegawa, 2004. p 75; Toesca, 2003].

Развивающийся мозжечок является особо уязвимым к воздействию этанола. Этанол ингибирует рост аксонов нейронов зернистого слоя коры мозжечка, который в норме стимулируют Netrin-1, нейротрофический фактор глиальных клеток (GDNF) и адгезии L1, путем активации ФСК (Src киназы), сигнального белка Cas и выделением внеклеточной регулируемой киназы 1 и 2 (ERK1/2). Клинически значимая концентрация этанола ингибирует рост аксонов и активацию SFK-Cas-ERK1/2 пути, но не нарушает BDNF-индуцированной рост аксона или активацию ERK1/2. Эти результаты показывают, что ФСК, но не ERK1/2, является основной мишенью для этанолиндукцированного подавления роста аксона [Chen, 2012].

Пренатальное воздействие этанола нарушает развитие нейротрансмиттерных систем мозга. Так, установлено образование бен-

зодиазепиновых рецепторов и развитие ГАМК-ергической системы мозга плода. Отставание в формировании бензодиазепиновых рецепторов и снижение их плотности у плодов на 8-15 неделях развития может быть рассмотрено как компенсаторная реакция на воздействие этанола и как признак функциональной незрелости ГАМК-ергической системы мозга [Shushranova, 2012]. Пренатальное воздействие алкоголя вызывает поражение ГАМКергической системы мозга. ГАМК является преимущественно тормозным нейромедиатором, поэтому влияние этанола возбуждает нейроны и нарушает пролиферацию, миграцию, дифференцировку клеток и процессы синаптогенеза [Isayama, 2009. Impact].

Сочетание дородовой и послеродовой алкоголизации изменяет уровень мет-энкефалина в гипоталамусе и миндалине. Это может объяснить нарушения, возникающие в опиоид-регулируемом поведении (социальные игры, сексуальное поведение) под воздействием алкоголя [Lugo, 2006].

В развивающемся мозгу потомства матерей, потреблявших алкоголь во время беременности и кормления, установлено снижение активности всех исследованных моноаминергических систем с уменьшением уровня норадреналина и дофамина, а также иРНК и СОМТ – фермента метаболизма катехоламинов [Shabanov, 2012].

У потомства самок крыс, с 13-го по 18-й день беременности потреблявших этанол в составе жидкой диеты, наблюдалось нарушение развития норадренергической системы мозга (увеличен синтез и захват тирамина). Кроме того, содержание норадреналина снижено во всех структурах мозга, а в гипоталамусе остается пониженным даже через 26 недель после рождения [Detering, 1980, 1981]. Содержание бета-эндорфина, катехоламинов и лей-энкефалина также было нарушено [Shoemaker, 1983].

Хроническое пренатальное воздействие этанола вызывает нарушения дофаминергической системы мозга, которые сохраняются в течение длительного времени и влекут за собой расстройства поведения животных. Даже однократное введение этанола (3 г/кг, перорально) на 4-й день беременности приводит к поражению дофаминергической системы мозга [Lucci, 1984. Specific; Ranbun, 1985]. При этом в стриатуме выявлено увеличение кругооборота дофамина на 50% и снижение количества участков связывания дофаминергических рецепторов [Lucci, 1983]. Этого эффекта не наблюдается при введении этанола в период лактации.

После введения этанола (25% раствор вводили внутривентрикулярно в дозе 1,0, 2,0 или 4,0 г/кг массы тела с 8-е по 20-е сутки беременности) концентрация ацетальдегида в мозгу плода значительно увеличилась (в 2,6, 5,3 и 7,8 раза, соответственно). С помощью ВЭЖХ в мозге эмбрионов отмечено возрастание содержания 7-дигидрокси-1,2,3,4-тетрагидроизохинолина (сальсолинол), N-метил-сальсолинола и 1-метил-6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболина. Большие дозы этанола (4,0 г/кг) ингибируют активность митохондриальной моноаминоксидазы на 51,3% по сравнению с контролем и снижают активность цепи ферментов клеточного дыхательного комплекса I на 61,2% по сравнению с контролем. Эти результаты свидетельствуют о том, что этанолиндукцированные изменения метаболизма моноаминов и накопление дофамина в виде изохинолинов и тетрагидро-β-карболинов могут играть важную роль в развитии дисфункций моноаминергических нейронных систем мозга [Mao, 2012. Increased; Maruyama, 1992. N-methylation].

Возбуждающий нейротрансмиттер глутамат важен в функционировании ЦНС. Активирование одного из подтипов глутаматных рецепторов NMDA (N-methyl-D-aspartate) играет ключевую роль в процессе формирования синапсов. Алкоголь, блокируя NMDA рецепторы, способствует развитию апоптозной нейродегенерации в переднем мозге, что может стать причиной уменьшения массы мозга, разного рода психических нарушений, а также снижения способности к обучению у потомства [Разводовский, 2005]. Алкоголь блокирует NMDA рецепторы, а хроническое его воздействие может привести к компенсаторному увеличению числа рецепторов и повышенному высвобождению глутамата, что способствует развитию толерантности к этанолу. Гиперактивность NMDA-рецепторов приводит к эксайтотоксической гибели клеток [Tsai, 1998].

В гиппокампе и мозжечке крыс, подвергшихся воздействию этанола, был значительно увеличен уровень перекисного окисления липидов и окисления белков, а уровень эндогенного антиоксиданта глутатиона снизился [Brocardo, 2012. Anxiety]. Активность Zn²⁺- и Cu²⁺ супероксиддисмутазы значительно снижается в коре головного мозга, гиппокампе и стволе мозга 14-дневных крыс, подвергшихся пренатальному воздействию этанола, что влечет за собой активацию свободно-радикального повреждения в мозге данных животных [Uzbekov, 1991]. Активность всех антиоксидантных фер-

ментов была ниже в мозге плодов, перенесших антенатальную алкоголизацию. Это может уменьшать защиту клеток от повреждения свободными радикалами [Drever, 2012. The expression].

Ретиноевая кислота – активная форма витамина А – участвует в регуляции развития нервной системы в эмбриогенезе, контролируя экспрессию генов. Ретинол дегидрогеназа – это фермент, необходимый для превращения витамина А (ретинола) в ретиноевую кислоту. В ходе исследования, проведенного на тканях головного мозга пренатально алкоголизированных крыс, выяснено, что этанол действует как конкурентный ингибитор ретинол дегидрогеназы, чем и можно объяснить аномалии головного мозга и черепнолицевую дисморфию, возникающие при антенатальном воздействии этанола. Уровень ретинола в эмбрионах и тканях мозга после антенатальной алкоголизации был в 2-3 раза выше, чем в контрольной группе, а количество ядерных рецепторов ретиноевой кислоты – ниже. Эти изменения свидетельствуют о возможной роли витамина А в патогенезе алкогольного синдрома плода [Grummer, 1993].

Alpha

В мозжечке десятидневных крысят, подвергшихся пренатальному воздействию этанола, выявлено нарушение содержания кальций-связывающих белков: кальбиндина D28k, кальренина и парвальбумина [Wierzba-Bobrowicz, 2011. Differential].

У новорожденных крысят, подвергавшихся внутриутробному воздействию этанола, отмечено снижение биосинтеза фосфатидилсерина в мозге. Данный эффект может повлечь за собой нарушение функционирования нервных клеток и ЦНС в целом [Hu, 1992].

Хроническое воздействие этанола изменяет липидный состав клеточных мембран развивающегося головного мозга, увеличение содержания в них полиненасыщенных жирных кислот. Следовательно, этанол может стать причиной увеличения текучести мембран [Duffy, 1991. Changes].

Изучались эффекты этанола на механизмы, связанные с деятельностью Bad, относящегося к типу Bcl-2 проапоптотических генов. В здоровых клетках Bad сохраняется в цитозоле, связываясь с цитозольными белками. При апоптозе Bad путем гетеродимеризации отделяется от этих белков и образует изолированные молекулы Bcl-XL. Воздействие этанола у 4-6-суточных грызунов приводит к увеличению количества Bad, связанного с цитозольными белками, а

содержание Bcl-XL комплексов ниже [Siler-Marsiglio, 2005; Siler-Marsiglio, 2006].

Беременным макакам на разных стадиях беременности (со 105-х по 155-е сутки) давали доступ к алкоголю на 8 ч ежедневно. Затем плоды извлекали с помощью кесарева сечения. В мозге наблюдалось 60-кратное увеличение апоптоза по сравнению с контролем. Предполагается, что многие из нейropатологических изменений и долгосрочных психоневрологических нарушений FASD можно объяснить апоптогенным действием алкоголя на мозг плода [Farber, 2010].

Установлено, что у клеток Пуркинье, подвергшихся антенатальному воздействию этанола, уменьшилось количество кальциевых каналов из-за снижения экспрессии гамма-изоформы протеинкиназы С. Кроме того, наблюдалось замедление прохождения импульса через синапсы клеток Пуркинье. Результаты позволяют предположить, что данные аномалии являются основными причинами атаксии и двигательных нарушений, которые наблюдаются при алкогольном синдроме плода [Servais, 2007].

При антенатальной алкоголизации у крыс был измерен региональный уровень пресинаптических белков complexin I и II. Эти белки важны для обеспечения синаптической пластичности познания, необходимой для нормального протекания когнитивных процессов. Беременные самки крыс получали жидкую пищу (доля этанола составляла 36% от полученных калорий). Выявлены более низкие уровни обоих complexin I и II в префронтальной коре по сравнению с аналогичным показателем у контрольных животных. Следовательно, пренатальное воздействие этанола вызывает селективную потерю белков complexin в лобной коре, что влечет за собой когнитивные дисфункции [Eastwood, 2005; Barr, 2005. Prenatal; Sawada, 2005].

В экспериментальных моделях FASD гипоплазия мозжечка связана с нарушением сигнальных путей инсулина и инсулиноподобного фактора роста (IGF), которые опосредуют рост, пластичность, обмен веществ и функции нейромедиаторов. На 20-е сутки после рождения у крыс наблюдались значительные нарушения двигательной функции, а гистологические исследования показали выраженную гипотрофию мозжечка и гипоплазию IGF-1R, и си-IGF-2R. Этанол широко ингибирует экспрессию инсулина, IGF-2 полипептидов и IGF-1 и IGF-2 рецепторов в мозге. Результаты показы-

вают, что основные нарушения в мозге при FASD вызваны нарушениями в инсулин/IGF сигнализации [de la Monte, 2011. si-RNA; Aros, 2011. Effects].

Крысам вводили этанол (2,5 г/кг подкожно) или физиологический раствор на 7-, 15- и 20-й день после рождения. Результаты показали, что нейродегенерация в центральном ядре миндалины происходит на 7-15-е сутки постнатального развития, а в грушевидной коре – на 7-, 15- и 20-е сутки. Установлена активация каспазы 3 и 9, но не каспазы 8. Сделано заключение, что лимбическая система мозга чувствительна к пренатальному воздействию этанола, но каждый из ее элементов имеет свой период уязвимости в послеродовом периоде [Balaszczuk, 2011. Alcohol-induced].

Пренатальное воздействие этанола значительно снизило способность астроцитов связывать конканавалин лектин, изменило поверхностное распределение рецепторов для данного лектина и снизило активность 5'-нуклеотидазы. Эти эффекты были более выражены в пролиферирующих клетках [Renau-Piqueras, 1992. Prenatal].

Пренатальное воздействие этанола нарушает клеточный рост и дифференцировку астроглии, способствует снижению уровня глиофибрилярного кислого белка (маркер астроцитов) и экспрессии его гена. Нарушения глии влекут за собой разного рода дефекты функционирования нервной системы [Guerra, 1997; Guerra, 2001].

Гипоксия является одним из механизмов патогенетического воздействия этанола на развивающийся мозг плода. Вместе с тем в одном из опытов показано, что гипоксия мозга при этом может и не развиваться. Доза этанола 1,75 г/кг у беременных овец привела к увеличению мозгового кровотока плода на 37% по сравнению с таковым показателем в контрольной группе. Наибольшее увеличение кровотока зафиксировано в этанол-чувствительном мозжечке, где оно возросло на 44% по сравнению с контрольной группой [Parnell, 2007. Chronic].

Этанол снижает выживаемость нейронов и нарушает их функции двумя основными путями: 1) подавляет сигналы инсулина, необходимые для жизнеспособности, метаболизма, формирования синапсов и производства ацетилхолина; 2) функционирует как нейротоксикант, вызывая оксидативный стресс, повреждение ДНК и митохондриальную дисфункцию. Этанол угнетает сигналы инсулина опосредованно, на уровне рецепторов инсулина (IR), нарушая связывание с рецептором, и повышает активность фосфатаз. В ре-

зультате инсулиновая активация PI3K-Akt, которая выступает посредником обеспечения подвижности, энергетического обмена и пластичности нейронов, снижается. Нейротоксический эффект этанола способствует повреждению ДНК, вызывая митохондриальную дисфункцию и окислительный стресс. Таким образом, хроническое внутриутробное воздействие этанола приводит к состоянию инсулинорезистентности в ЦНС [de la Monte, 2010].

Окислительная теория алкогольного поражения мозга плода

Хорошо известно, что обмен веществ в развивающемся мозге значительно отличается от метаболизма в зрелом, дефинитивном мозге. Это предполагает и возрастные особенности окисления в нём спиртов и альдегидов. Первым метаболитом этанола в организме животных и человека является ацетальдегид (АА). Он опосредует многие, в особенности токсические эффекты алкоголя на развивающийся организм. Основным ферментом, окисляющим, обезвреживающим АА в организме, является альдегиддегидрогеназа (АльДГ) [Зиматкин, 2006, 2008].

Большое сходство тератогенного и нейротропного действия АА с таковым у этанола в результате потребления алкоголя матерью во время беременности указывает на возможное участие уксусного альдегида в патогенезе алкогольного синдрома плода и нарушений в мозге [Sreenathan, 1982]. Установлено, что хроническое ингаляционное воздействие АА на уровне ПДК (5 мг/м³; до беременности и в период беременности у крыс) вызывает значительное уменьшение числа особей в помете и веса потомства [Таскаев, 1986]. Прямое эмбриотоксическое и тератогенное действие на эмбрионы крыс, культивируемых с 10-го дня развития в искусственной питательной среде, возникает уже при концентрации АА 0,01 мг/мл и выражается, в частности, в недоразвитии мозговых пузырей и нервной трубки. Для этанола токсическая концентрация гораздо выше, 0,5 мг/мл [Кирющенко, 1986]. При этом следует учитывать, что при экспозиции с этанолом он может окисляться тканями плода до АА, который и опосредует токсическое действие этанола. Однако для доказательства возможности прямого действия самого этанола следует подтвердить его эффекты на фоне действия ингибиторов алкогольокисляющих ферментов.

В ряде работ установлена возможность проникновения АА в организм плода в случае употребления алкоголя матерью. При этом в крови плода содержание АА составляет 1/4 от его содержания в крови матери [Gordon, 1985], а на 21-й день беременности или на фоне действия цианамиды – даже 70% [Guerra, 1984]. Установлено, что сама плацента человека, окисляя этанол, нарабатывает АА, который затем поступает в кровь плода, что может объяснить более ранние данные этих же авторов о том, что после введения АА матери содержание его в крови плода составляет лишь 2 μM , после введения этанола – 12 μM , а после совместного введения этанола и ацетальдегида – даже 20 μM .

Наиболее значительными представляются данные о том, что из-за пониженной альдегидокисляющей способности организма матери в конце беременности, особенно в период лактации, уровень АА после введения стандартной дозы этанола в крови матери был, соответственно, в 4 и 17 раз выше обычного [Gordon, 1985]. Причем, если в мозге матери содержание АА было в 2 раза ниже, чем в крови, то в мозге и крови плода – примерно одинаковым. Это, по мнению авторов, свидетельствует об образовании уксусного альдегида непосредственно в мозгу плода из этанола, который беспрепятственно переходит из организма матери в организм плода. Другой причиной тому может быть высокая проницаемость ГЭБ для альдегидов из-за известной низкой активности АльДГ (субстрат АА) в барьерных структурах мозга плода [Зиматкин, 1990]. Значительное накопление АА при окислении этанола в мозгу плодов и новорожденных можно объяснить не только повышенной активностью каталазы, но и пониженной активностью фермента утилизации АА – АльДГ в нейронных и барьерных структурах мозга в эти периоды онтогенеза [Зиматкин, 1990].

В опытах *in vitro* показано токсическое действие АА на клетки среднего мозга, выделенные у эмбрионов в возрасте 9,5 дней. При этом рост и развитие самих эмбрионов под действием АА значительно нарушались [Lee, 2005. Neurotoxic].

Убедительное подтверждение значительной роли АА в опосредовании антенатальных эффектов этанола – работы Бояджиевой [1988] и Ali and Persand [1988], в которых продемонстрировано потенцирование разными ингибиторами АльДГ, вызывающими накопление АА, эмбриотоксического действия этанола.

Особенности окисления этанола в развивающемся мозгу

Показано, что в гомогенатах перфузированного мозга новорожденных крыс (16 ч после рождения) активность каталазы в 4 раза, а накопление ацетальдегида (АА) из этанола – в 2 раза выше, чем у взрослых животных [Gill, 1992. Enzymatic].

Исследованы особенности метаболизма этанола в мозгу плодов крыс (17-19-й дни эмбриогенеза) и пятидневных крысят [Hamby-Mason, 1995]. Показано, что накопление АА при окислении этанола у плодов почти в два раза больше, чем у взрослых, и значительно угнетается азидом натрия (почти полностью) и аминотриазолом (на 50%), – ингибиторами каталазы, – но не ингибитором АДГ пиразолом. При этом активность каталазы в мозгу плодов была в 4 раза выше, а содержание белка каталазы (вестерн-блот анализ) в два раза выше, чем у взрослых. В процессе онтогенеза активность каталазы мозга постепенно снижалась: 17>19 дни эмбриогенеза >5-й день после рождения>взрослые. Авторы попытались объяснить причину повышенной экспрессии каталазы в развивающемся мозгу тем, что каталаза может играть важную роль в защите развивающегося мозга от окислительного стресса в условиях, когда антиоксидантная система его еще не сформирована [Hamby-Mason, 1995].

Через 1, 3 и 6 ч после перорального введения этанола беременным крысам (в дозе 4 г/кг) уровень АА в мозгу плодов был почти в два раза выше, чем в мозгу матери. К сожалению, уровень АА в крови в этой работе не определялся, поэтому не ясно происхождение АА: проникновение из крови или образование на месте. Кроме того, активность каталазы мозга через 1-6 ч после введения этанола значительно повышалась как у беременных самок, так и их плодов. После преинкубации гомогенатов мозга с этанолом (40 мМ в течение 1 ч при 37°С), активность каталазы у плодов и взрослых возрастает, соответственно, в 1,5 и 2 раза [Hamby-Mason, 1995].

После внутрижелудочного (через канюлю) введения этанола крысятам в дозе 5-6 г/кг/день на 4-й и 5-й день после рождения активность каталазы у них в мозгу возросла в 1,5 раза, а содержание АА – в 3-4 раза по сравнению с изокалорийным контролем. При этом введение аминотриазола полностью предупреждало прирост АА и угнетало активность каталазы ниже контрольного уровня. После этой двухдневной алкоголизации у крысят иммуногистохимически в коре мозга обнаружены аддукты АА с белками. Учитывая высокую тератогенность АА, авторы считают, что из-за интен-

сивного окисления этанола в самом мозгу плодов даже нерегулярное потребление алкоголя матерью может вызывать значительные ацетальдегид-опосредованные нарушения в развивающемся мозгу [Hamby-Mason, 1995]. Такое значительное накопление АА при окислении этанола в мозгу плодов и новорожденных можно объяснить не только повышенной активностью каталазы, но и пониженной активностью фермента утилизации АА-АльДГ в нейронных и барьерных структурах мозга в эти периоды онтогенеза [Зиматкин, 1990].

Исследование окисления этанола в мозгу плодов человека проведено на кафедрах фармакологии и педиатрии медицинской школы Вашингтонского университета [Person, 2000. Enzymic]. Сразу после извлечения плодов (56-122-го дня эмбриогенеза) образцы неперфузированного мозга тщательно промывали в 0,25 М сахарозе/10 мМ калий-фосфатном буфере (рН7,4) для максимального удаления крови и замораживали в жидком азоте. Изучали также мозг плодов крыс на 19-й день эмбриогенеза. Установлено, что субклеточные фракции, полученные после двукратного часового центрифугирования гомогенатов мозга при $104 \text{ тыс} \times g$ (по-видимому – это микросомальная фракция), проявляли в присутствии НАДФН значительную этанолокисляющую активность. Она убывала в следующем порядке: печень крысы > мозг взрослой крысы > мозг плода человека > мозг плода крысы, и отсутствовала при удалении НАДФН из инкубационной среды [Person, 2000. Enzymic]. Показано, что пиразол (2 мМ) значительно (на 88%) угнетал накопление АА при окислении этанола в мозгу плода человека. При этом он не оказывал влияния на утилизацию АА.

Характерно, что у человека и крысы в полных гомогенатах эмбрионального мозга этанолокисляющая активность (без добавления ко-факторов) была даже выше, чем в эмбриональной печени и взрослом мозгу крысы. Добавление НАДФ (4 мМ) увеличивало этанолокисляющую активность в 7 раз, добавление H_2O_2 – в 5 раз, а добавление НАД – всего в 2 раза. Предварительное нагревание гомогенатов мозга (100°C , 10 мин.) полностью подавляло этанолокисляющую активность, что указывает на ферментативный характер процесса. Установлено, что Км процесса около 15 мМ [Person, 2000. Enzymic].

CO и отсутствие O_2 угнетало этанолокисляющую активность гомогенатов мозга почти на 60%, пиразол не оказывал влияния, а

азид натрия угнетал процесс на 80% [Person, 2000. Enzymic]. Это предполагает значительный вклад цитохрома P450 2E1 и каталазы в данный процесс и отсутствие участия АДГ. Однако участие каталазы сомнительно, так как преинкубация гомогенатов мозга с каталазой (для удаления эндогенной H₂O₂), так же как добавление экзогенной гидроперекиси, не активировало процесс окисления этанола и не влияло на способность азида натрия угнетать процесс. Вклад цитохрома P450 2E1 также можно поставить под сомнение по той причине, что добавление в среду НАДФ не усиливало угнетающего эффекта азида натрия. Кроме того, азид натрия (в конечной концентрации 0,1 мМ) на 88% угнетал элиминацию АА. Напротив, добавление НАД усиливало угнетающий эффект пиразола с 3 до 68%. Когда O₂ удаляли из инкубационной среды путём насыщением среды азотом, этанолокисляющая активность (по накоплению АА) снижалась на 80%. Следовательно, O₂ необходим для окисления этанола в эмбриональном мозгу человека. Добавление в среду соединений, продуцирующих гидроперекись, увеличивало этанолокисляющую активность мозга плода человека, вероятно, из-за замещающего O₂ действия H₂O₂ [Person, 2000. Enzymic].

По мнению авторов, высокая способность гомогенатов мозга окислять этанол и накапливать АА (при отсутствии кофакторов) плодов человека может объяснять действие этанола на развивающийся мозг. Добавление пиразола и СО не угнетало этот процесс, что свидетельствует о незначительном вкладе АДГ и цитохрома P450. Азид натрия и удаление из гомогената эндогенной гидроперекиси не угнетали окисление этанола, что исключает участие каталазы. Неферментативное окисление этанола исключается тем, что предварительное нагревание гомогенатов полностью подавляет данный процесс [Person, 2000. Enzymic].

Таким образом, этанолокисляющая активность развивающегося мозга как крысы, так и человека значительно повышена. В совокупности эти данные могут объяснить повышенную чувствительность развивающегося мозга к алкоголю и указывают на один из возможных механизмов патогенеза алкогольного синдрома плода.

В литературе имеются сведения о низкой скорости элиминации АА целым 12-дневным зародышем крысы (1,8 нМ/мг/мин.). Обнаружена также лишь низкая транскрипция иРНК АльДГ в тканях плода человека: в печени плода она составляет 1/5 дефинитивного уровня, а в коре мозга не определялась вовсе [Braun, 1987.

Human]. Уровни активности митохондриальной АльДГ мозга мышей в 1-60-е дни постнатального развития очень низки [Ujjwal, 1988]. В работе Horton A.A. (1980) изучена динамика активности митохондриальной АльДГ печени крыс в онтогенезе: в антенатальном периоде она крайне низка – составляет не более 1/40 дефинитивного уровня, к 10-му дню после рождения – 1/10 и возрастает вплоть до 96-го дня.

Активность альдегиддегидрогеназы в развивающемся мозгу

Нами проведено сравнительное гистохимическое исследование активности основного ацетальдегидокисляющего фермента, альдегиддегидрогеназы (АльДГ) в структурах мозга крыс в онтогенезе: на 14-, 17-, 22-й день антенатального и 1-, 5-, 10-, 20-, 40-, 60-й день, через 6 месяцев и 2 года постнатального развития. Первым днем беременности считали день обнаружения сперматозоидов во влагалищных мазках. На каждый срок исследования брали по 3-8 плодов или крысят от разных самок. Начиная с 60-дневного возраста, исследовали только крыс-самцов [Зиматкин, 1990].

В результате проведенного исследования установлено, что активность АльДГ А в барьерных структурах ЦНС (эпендимоциты сосудистых сплетений, эпендимоциты, выстилающие желудочки мозга) в антенатальном периоде составляет лишь 10-30% от уровня взрослых животных. Затем она постепенно возрастает: на 10-е сутки после рождения составляет 40-45%, ещё достоверно отличаясь от дефинитивного уровня (в этот период в коре мозга впервые начинают выявляться кровеносные капилляры на фоне нервной ткани), и лишь к 40-м суткам достигает уровня взрослых животных.

В нейронах разных отделов мозга активность АльДГ А вплоть до 10-го дня постнатального развития составляет 45-70%, достоверно отличаясь от её уровня у взрослых животных, затем резко возрастает и уже на 20-е сутки в большинстве структур приближается к уровню контрольных животных (80-95%). Затем в зернистых клетках мозжечка она возрастает выше уровня взрослых животных (40-е сутки), а потом (60-е сутки) становится несколько ниже.

Низкая активность АльДГ А в барьерных структурах мозга в антенатальном периоде онтогенеза объясняет отсутствие так характерного для взрослых животных концентрационного градиента для АА между кровью и мозгом [Clarke, 1986b. Pharmacokinetics]. Очень низкая активность АльДГ А в структурах мозга плода объяс-

няет и причину высокой чувствительности мозга к повреждающему действию АА [Sreenathan, 1982], уровень которого в крови матери, потребляющей этанол, значительно возрастает в конце беременности и в период лактации [Gordon, 1985].

Поскольку АльДГ способна обезвреживать токсичные альдегидные продукты перекисного окисления липидов (ПОЛ), полученные данные также объясняют повышенную чувствительность развивающегося мозга ко многим повреждающим факторам, в механизме действия которых лежит активация ПОЛ [Узбеков, 1987].

На 1-5-е сутки постнатального развития мы наблюдали отчетливое снижение активности АльДГ. Это можно объяснить следующим образом: сам акт рождения является мощным стрессорным фактором, а острый стресс значительно угнетает АльДГ мозга у взрослых животных [Зиматкин, 2008]. С другой стороны, факторы, вызывающие резкое снижение активности АльДГ в организме матери в период лактации [Gordon, 1985], могут, поступая с молоком, также угнетать этот фермент у новорожденных.

Четкое возрастание активности АльДГ с 10-го по 20-й день постнатального развития хорошо коррелирует с функциональным созреванием мозга, с известной активацией в этот же период ферментов энергетического метаболизма, особенно пируватдегидрогеназы мозга крыс, являющейся важнейшим источником эндогенного АА в мозгу [Немеря, 1988. Неокислительная]. При исследовании на 15-й день постнатального развития, как и у взрослых животных, обнаружена высокая положительная корреляция между распределением среди структур мозга активности АльДГ и НАДН ДГ, что может указывать на тесную связь АльДГ с интенсивностью общих обменных процессов развивающегося мозга.

Установленная динамика альдегидокисляющей способности мозга, по-видимому, связана с изменениями метаболизма и функции, процессами пролиферации и дифференцировки изученных структур в разные периоды формирования ЦНС. Вместе с тем она может отражать уровень устойчивости этих структур мозга к повреждающему действию экзогенного АА, поступающего в организм непосредственно или в виде его метаболического предшественника – этанола. Важная роль АльДГ в защите развивающегося организма от алкогольных повреждений убедительно подтверждена в работе [Бояджиева, 1988], где установлено потенцирование эм-

бриотоксического и тератогенного действия этанола при его совместном применении с ингибитором АльДГ – метранидозолом.

Таким образом, в ЦНС плодов активность АльДГ довольно низка (~40% дефинитивного уровня); она достигает уровня взрослых животных лишь к 20-40-му дню после рождения. Это отражает особенности метаболизма и может обуславливать известную низкую устойчивость развивающегося мозга к повреждающему действию этанола вместе с АА, или того или иного по отдельности [Зиматкин, 1990].

Этанол – биологически относительно инертное вещество, он оказывает токсическое действие на мозг плода опосредованно, через его первый метаболит в организме (ацетальдегид). Высокая чувствительность мозга плода к алкоголю обусловлена повышенной активностью этанолаксилирующих ферментов мозга плода (в частности каталазы) и низкой активностью основного фермента, окисляющего АА, – альдегиддегидрогеназы. Это приводит к повышенному образованию в мозгу АА из этанола и пониженному его удалению из тканей мозга. Кроме того, низкая активность АльДГ в барьерных структурах мозга плода облегчает проникновение АА из крови в мозг в условиях повышенного его образования из этанола в периферических тканях плода, плаценте и в организме матери, особенно в конце беременности, что создаёт условия для накопления и проявления его токсического действия в мозге плода. В совокупности полученные данные могут объяснить повышенную чувствительность развивающегося мозга к алкоголю и указывают на один из возможных механизмов патогенеза алкогольного синдрома плода.

В опосредовании эффектов этанола и АА нельзя исключить роль метаболитов самого АА: продукта его окисления с помощью АльДГ (ацетата), продукта активации ацетата (аденозина) и продукта конденсации АА с дофамином (сальсолинола). Многочисленные эффекты этих соединений показаны в мозгу взрослых, но пока не продемонстрированы в развивающемся мозгу. В рамках данной теории можно объяснить также известное врождённое патологическое влечение к алкоголю у животных и людей, подвергавшихся антенатальной алкоголизации. Это явление может быть связано с возникающей у новорожденных в результате прекращения действия этанола недостаточностью эндогенного АА, ацетата, сальсолинола, аденозина и других метаболитов, которая устраняется при потреблении алкоголя.

Глава 7

ПРОФИЛАКТИКА И ЛЕЧЕНИЕ ПОСЛЕДСТВИЙ АНТЕНАТАЛЬНОЙ АЛКОГОЛИЗАЦИИ

Специфическое лечение последствий антенатальной алкоголизации в настоящее время не разработано. Существуют лишь попытки экспериментальной профилактики и лечения [Пальчик, 2013; Зиматкин, 2014]. Единственный и самый надежный способ предотвратить FAS/FASD – полное воздержание от алкоголя во время беременности и грудного вскармливания [O'Connor, 2001].

Профилактика FASD требует многоуровневых профилактических мероприятий, обеспечивающих реальные возможности для скрининга и мониторинга употребления алкоголя во время детородного возраста [Parker, 2010. Psychological; O'Connor, 2001].

Последствия употребления алкоголя во время беременности можно предотвратить, усилия же должны начинаться с точной идентификации женщин, которые употребляют алкоголь во время беременности. Следует регулярно проверять всех беременных женщин на употребление алкоголя с использованием проверенных инструментов и постоянно проводить работу по информированию о негативных эффектах этанола [Jones, 2013].

Женщины в Кимберли (Западная Австралия) успешно выступали за ограничение доступности алкогольных напитков в 2007 г. В 2009 г. они разработали стратегию диагностики и профилактики FASD и обеспечили поддержку родителям и опекунам пострадавших детей. Для успешной профилактики FASD необходимо сотрудничество работников здравоохранения с населением, объединение усилий для распространения информации о вреде алкоголя, проведения скрининга и ранней диагностики [Fitzpatrick, 2012. The Lililwan].

Распространенность FASD чрезвычайно высока в нескольких провинциях Южной Африки, однако уровень знаний о вреде материнского потребления алкоголя остается низким. В двух районах оценивали эффективность мер по повышению осведомленности о вреде пьянства и изменению отношения к нему во время беременности. Распространенность FASD, уровень знаний матерей о вреде алкоголизма, употребление алкоголя были исследованы в двух городах провинции, до и после мероприятий, которые включали информирование о FASD с использованием местных средств массо-

вой информации и переговоры по укреплению здоровья в медицинских учреждениях. Начальный уровень осведомленности матерей о вреде алкоголя и распространенность FASD – 8,9% (72/809). После проведения информационных мероприятий уровень знаний значительно увеличился, а распространенность FASD снизилась до 5,7% (43/751, $P=0,02$). Предполагается, что универсальная профилактика может снизить распространенность FASD среди населения на 30%. Эти усилия должны сопровождаться лечением алкогольной зависимости, чтобы снизить появление более тяжелых форм FASD [Chersich, 2012. Universal].

Проведено исследование эффективности программа «Первые шаги» (по образцу Parent-Child Assistance Program) для профилактики FASD. Был выполнен ретроспективный анализ данных по 70 участникам программы «Первые шаги». Клиенты относились к группе высокого риска развития FASD по потреблению алкоголя, кроме того, имели низкий уровень благосостояния, анамнез был отягощен токсикоманией, проблемами психического здоровья, преступной деятельностью. Беременность, как правило, была незапланированной. При выходе из программы многие участники воздерживались от употребления алкоголя и/или наркотиков, наступало улучшение психического состояния. В целом программа «Первые шаги» продемонстрировала перспективные результаты по профилактике FASD для женщин из группы риска [Rasmussen, 2012. The effectiveness].

Риск развития FASD, в дополнение к приему алкоголя во время беременности, также повышают низкий уровень образования, депрессия и психологический дистресс матери. Данный контингент женщин требует повышенного внимания со стороны работников здравоохранения [Davies, 2011. Developmental; O'Connor, 2001].

Существует необходимость в обучении работников здравоохранения вопросам диагностики, лечения и профилактики FASD. В Нью-Джерси проведен опрос знаний о FASD среди работников здравоохранения. Группы опрошенных включали медсестер, социальных работников, консультантов, терапевтов, диетологов, физиотерапевтов и специалистов по трудотерапии. Результаты показали, что большинство работников здравоохранения в Нью-Джерси обладают базовыми знаниями о FASD и влиянии алкоголя на ребенка в утробе матери. Они также были осведомлены о важности ранней диагностики в снижении вторичной инвалидности. Исследователи,

тем не менее, выявили области, требующие повышения уровня знаний в некоторых профессиональных группах. Таким образом, просветительская деятельность должна проводиться среди медицинских работников, занимающихся профилактикой, диагностикой и лечением FASD [Brimacombe, 2008. Fetal; Caley, 2010; Brems, 2010. Training].

В штате Вашингтон для диагностики и профилактики FASD создана сеть клиник. В них разработаны программы скрининга и методы сбора данных для оценки групп и степеней риска среди беременных, а также инструменты и методы для оценки эффективности первичных мер профилактики. Перекрестное исследование, проведенное с целью определения распространенности фетального алкогольного синдрома у детей, родившихся между 1993 и 1998 годами, показало снижение распространенности материнского употребления алкоголя ($P < 0,001$). Распространенность ФАС также снизилась ($P < 0,03$). Эти наблюдения подтверждают эффективность профилактических мероприятий в штате Вашингтон [Astley, 2010].

Среди 3348 медицинских работников в штате Вашингтон были распространены образовательные ресурсы для повышения уровня знаний о FASD. Шесть месяцев спустя среди 1483 человек из участвующих в проекте был проведен контроль знаний. Авторы использовали RE-AIM рамки (достижения, эффективность, принятие, реализация и техническое обслуживание) для оценки проекта. Образовательные ресурсы способствовали увеличению (на 31%) доли медицинских работников, которые регулярно предоставляют беременным женщинам информацию о последствиях употребления алкоголя во время беременности [Payne, 2011. RE-AIM].

Лечение нарушений у детей, вызванных антенатальной алкоголизацией

В настоящее время не существует специфического средства для лечения FASD [Vaglenova, 2008. Aniracetam]. Это объясняется тем, что ведущим первичным пороком, вызванным внутриутробным действием алкоголя, является «статическая энцефалопатия». Данный факт означает, что нарушения носят постоянный характер и в развитии мозга улучшение маловероятно. Поэтому на современном этапе не существует методов коррекции полученных врожденных церебральных повреждений. Более того, не представляется возможным говорить о реабилитации. Скорее речь должна идти об

абилитации, процессе частичного обретения функции, происходящего на фоне изначального патологического отклонения от физиологических норм развития ЦНС. Цель абилитации – достижение ребенком по возможности более высокой функциональной активности, ущербной от рождения. Это предусматривает лечебно-педагогическую коррекцию двигательной, психологической и речевой сферы в раннем возрасте [Шилка, 2009; Coles, 2009].

Наиболее проблематичны в плане терапевтических подходов у детей с ФАС – ликвидация задержки внутриутробного развития, лицевых отклонений, снижения темпов весоростовых показателей, изменений со стороны ЦНС. Нарушения зрения или слуха, а также воспитание в условиях искусственно обедненной среды (отсутствие новых и разнообразных зрительных и слуховых стимулов в сочетании с дефицитом общения со взрослыми) отрицательно сказываются на психическом развитии ребенка. С целью коррекции нервно-психического развития (тонкой моторики, общей моторики, речевого развития и т.п.) проводятся занятия в «сенсорной комнате». Были отмечены хорошая реакция пациентов на комплекс процедур и положительные сдвиги в становлении общей моторики и речи.

Педагогическая абилитация таких детей играет решающую роль в их психофизическом развитии, личностном становлении и в обеспечении жизнедеятельности в целом, хотя это относится к более старшим возрастным группам. Если отклонения со стороны ЦНС корригируются только в абилитационном плане, то имеется ряд состояний, ассоциированных с ФАС (пороки сердца, органов зрения, слуха, почек и т.д.), которые подлежат реабилитационным воздействиям по рекомендациям профильных специалистов [Малахова, 2012].

Существующая терапия для детей с FASD включает коррекцию поведения и речи, профессионального обучения. Успех этих процедур может быть улучшен путем учета особенностей и потребностей конкретных детей с FASD. Например, хотя многим из них назначают стимуляторы для лечения симптомов дефицита внимания и гиперактивности, однако у данных препаратов имеются негативные побочные эффекты, поэтому их следует назначать с осторожностью [O'Connor, 2011. Encyclopedia].

В первые дни после рождения у детей с ФАС может наблюдаться синдром отмены алкоголя, который проявляется тремором, гиперрефлексией, плохим сном, затруднением сосания и глотания,

угнетением дыхания. Это состояние требует интенсивной терапии [Разводовский, 2005].

Семьи несут основную ответственность за воспитание детей с FASD [O Connor, 2001]. Родители часто должны обеспечивать больший уход за ними, чем за их здоровыми сверстниками [Streissguth, 2004].

Данные исследований показывают, что правильное воспитание может привести к ощутимому улучшению состояния ребенка [Olson, 2007. Efficacy; Paley, 2009] и снижению риска вторичной инвалидности [Niccols, 2005]. Различные государственные программы обеспечивают помощь в воспитании детей с FASD [Jiricowic, 2010]. Так, например, в Канаде существует и эффективно функционирует программа помощи родителям, чьи дети пострадали от пренатального воздействия алкоголя [Hume, 2008. Key]. В США проводятся аналогичные мероприятия, финансируемые Центром по контролю и профилактике заболеваний. Они сосредоточены на воспитании детей дошкольного и школьного возраста с PAE или FASD. Кроме того, есть специализированные образовательные группы и консультации для родителей [Bertrand, 2009; Olson, 2007. Efficacy]. Следует также обратить внимание на коррекцию сопутствующих негативных психосоциальных факторов [Pottie, 2008].

Ниже предлагаются практические шаги для повышения эффективности реабилитации детей с FASD:

1. Провести многогранную, с учетом культурных особенностей, образовательную кампанию повышения уровня знаний о FASD.
2. Поощрение и поддержка родителей, воспитывающих детей с FASD.
3. Провести всеобъемлющий обзор существующих программ коррекции для оценки и выявления пробелов.
4. Оценить все текущие и будущие общественные программы поддержки родителей и семей.
5. Обучение и консультирование родителей.
6. Разработка новых социальных программ поддержки родителей и семей, воспитывающих детей FASD.
7. Стандартизация медицинской помощи при FASD [Olson, 2007a. Responding].

Предлагаются следующие советы по воспитанию в семье детей с FASD:

1. Концентрация на сильных сторонах ребенка и его талантах.
2. Принятие ограничений ребенка.
3. Последовательность во всем (дисциплине, в школе, поведении).
4. Использование стабильных процедур, которые не меняются ежедневно.
5. Использование визуальных помощников, музыки и практических действий в обучении ребенка.
6. Использование положительного подкрепления (похвала, стимулы).
7. Частое повторение [Mitchell, 2002; O'Connor, 2007. A controlled; Kable, 2007].

Мультидисциплинарная бригада для оказания медицинской помощи детям с FASD может включать педиатра, отоларинголога, иммунолога, невролога, психиатра (детского психиатра и психолога, школьного психолога), офтальмолога, пластического хирурга, эндокринолога, гастроэнтеролога, диетолога, генетика, логопеда, профессионального психотерапевта, физиотерапевта [Mitchell, 2002; O'Connor, 2007. A controlled; Kable, 2007].

Разработана программа «тренеров семей», которая помогает семьям и опекунам, воспитывающим детей с FASD. Наставники в программе информируют их о FASD, выступают защитниками их гражданских прав. Семьи, участвующие в программе, сообщили о высоком качестве этой работы [Mitchell, 2002; Leenaars, 2012. The impact].

Медикаментозное лечение детей с FASD

Нейролептики и стимуляторы. Стимуляторы используются для нивелирования симптомов гиперактивности, проблем с концентрацией внимания и других аномалий поведения. Антидепрессанты применяются для лечения таких симптомов, как депрессия, потеря интереса к жизни, проблемы со сном, раздражительность, агрессивность и *асоциальное* поведение. Нейролептики снижают агрессию и тревогу. Успокаивающие препараты также снимают симптомы тревоги. Лекарства могут влиять на каждого ребенка по-разному. Чтобы найти правильное лечение, врач может попробовать различные лекарства и дозы [Mitchell, 2002].

Типичные нейролептики (трифтазин, галоперидол, хлорпротексен) блокируют дофаминергические D₂-рецепторы мезолимби-

ческой и мезокортикальной областей. Атипичные нейролептики (клозапин, рисперидон) блокируют серотониновые 5-HT₂-рецепторы не в меньшей степени, чем D₂-рецепторы. Типичные нейролептики подавляют в основном позитивные шизофренические симптомы (бред и галлюцинации), в то время как атипичные устраняют и негативные симптомы (аутизм, апатию, социальное отчуждение) за счет блокады серотониновых рецепторов, что делает их более эффективными при лечении FASD. Кроме того, данные препараты оказывают седативное действие. Оно заключается в неспецифическом торможении ЦНС. При этом происходит устранение агрессии и психомоторного возбуждения.

Дети с FASD часто невнимательны и гиперактивны. Для коррекции этих симптомов им в ходе эксперимента были назначены либо нейролептики, либо стимуляторы. В данном исследовании принимали участие 77 детей (40 мальчиков и 37 девочек, возрастной диапазон 71-139 мес.) с диагнозом FASD. По словам родителей и отчетам учителей, дети, принимавшие нейролептики, показали наилучшие результаты. Те дети, которым были назначены стимуляторы, либо не показали улучшения, либо показали худшие результаты по сравнению с детьми из контрольной группы [Frankel, 2006. Stimulants]].

Так как для FASD характерны депрессивные, тревожные, обсессивно-компульсивные, биполярные расстройства, шизофренические симптомы, умственная отсталость и синдром гиперактивности и дефицита внимания, в терапии данных нарушений используют нейролептики, психостимуляторы (метилфенидат), средства для улучшения мозгового кровообращения (винпоцетин) и препараты лития [Brocardo, 2012. Anxiety; Морозова, 2010; Kooista, 2010. Differentiating; Frankel, 2006. Stimulants; Nunes, 2011. Acute; Smith, 2012; Suzuki, 2004; Luo, 2010].

Экспериментальные исследования на животных

Эффективность физических упражнений для коррекции ФАС была показана в эксперименте на животных. Крысам вводили этанол 2,5 г/кг в виде инъекций во время всего периода беременности и в течение первых 10 дней при кормлении детенышей молоком. На 40-й день после рождения крыс из контрольной группы и тех, кто подвергнулся внутриутробному воздействию этанола, разделили на 2 группы. Часть животных имела свободный доступ к ходовому ко-

лесу. На 60-й день после рождения были оценены уровни тревоги и депрессии. Перинатальное воздействие этанола привело к возникновению депрессивных и тревожных расстройств поведения у взрослых крыс без ущерба для их двигательной активности. Бег в колесе снизил уровень депрессии у самцов, но не повлиял на эмоциональный фон самок. В гиппокампе и мозжечке крыс, подвергшихся воздействию этанола, был значительно увеличен уровень перекисного окисления липидов и окисления белков, а уровень эндогенного антиоксиданта глутатиона снизился. Аэробные упражнения восполняли дефицит глутатиона у самок и самцов, перенесших пренатальное воздействие этанола, но его влияние на поведенческом уровне зависело от пола животных [Brocardo, 2012. Anxiety].

Коррекция нейромедиторных систем мозга. Алкоголь блокирует NMDA рецепторы, а хроническое его воздействие нередко приводит к компенсаторному увеличению числа рецепторов и повышенному высвобождению глутамата, что может способствовать развитию толерантности к этанолу [Grant, 1995], [Lovinger 1993]. Гиперактивность NMDA-рецепторов приводит к эксайтотоксической гибели клеток [Tsai, 1998]. Назначение антагонистов NMDA рецепторов после окончания действия алкоголя способствует снижению уровня апоптоза и смягчению проявлений FASD [Thomas, 2001].

Druse и его коллеги (2004) показали, что введение агонистов серотонина (например, ipsapirone, busipirone) может предотвратить вызванную алкоголем гибель нейронов и глии в регионах мозга, содержащих 5HT-нейроны [Druse, 2004; Zhou, 2008], возможно, за счет увеличения антиапоптотических белков [Lee, 2009].

Лобелин взаимодействует с белками в дофаминергических пресинаптических терминалах и способен корректировать у новорожденных этанолиндуцированную гиперактивность и нарушения дофаминергической системы в стриатуме и префронтальной коре. На 1-7-й день от рождения крысята были интубированы два раза в день раствором этанола в дозе 3 г/кг или молоком. На 21-й и 22-й день после рождения детенышам был назначен лобелин (0, 0,3, 1 или 3 мг/кг), а затем последовала оценка двигательной активности. На 23-25-й день после рождения крысята снова получили инъекцию лобелина (1 или 3 мг/кг) с последующим измерением кинетических параметров. Результаты показали, что лобелин в дозе 1 и 3 мг/кг на 21-й день после рождения нивелировал симптомы гиперактивно-

сти. Кроме того, лобелин способствовал нормализации функции дофаминергической системы в префронтальной коре. Метилфенидат, золотой стандарт для лечения синдрома гиперактивности и дефицита внимания, был оценен по сравнению с лобелином. Он также способствовал восстановлению функций дофаминергической системы после воздействия этанола [Smith, 2012].

Антиоксиданты. Мозжечок является особо чувствительным к пренатальному воздействию этанола. При потреблении грызунами высоких доз этанола (концентрация этанола в крови достигала 80 мМ) происходила гибель нейронов в мозжечке. Появляется все больше данных о том, что ресвератрол, полифенольное соединение, обладает антиоксидантными и нейропротекторными свойствами. В данном исследовании изучали свойства ресвератрола (3, 5, 4'-тригидрокси-транс-стильбен). Назначение ресвератрола (100 мг/кг) крысятам на 7-й день после рождения предотвращает этанол-индуцированный апоптоз путем удаления активных форм кислорода в наружном зернистом слое мозжечка и повышает выживаемость зернистых клеток мозжечка, а также способствует восстановлению уровня Nrf2. Это, в свою очередь, нормализует активность оксидоредуктазы 1 и супероксиддисмутазы в мозжечке крысят, подвергшихся действию этанола внутриутробно. Таким образом, ресвератрол обладает нейропротекторным действием, влияя на окислительно-восстановительные процессы в клетках развивающегося мозжечка [Kumar, 2011. Resveratrol].

Этанол может привести к апоптозу нейронов за счет истощения GSH с соответствующим увеличением окислительного стресса. Преодолеть негативное влияние этанола можно путем повышения GSH через повышение Nrf2, – транскрипционного фактора, который управляет GSH гомеостазом. Аденовирус-опосредованная гиперэкспрессия Nrf2 предотвращала вызванное этанолом истощение GSH и этанолиндуцированный апоптоз. Эти исследования свидетельствуют о важности Nrf2 для поддержания гомеостаза GSH в нейронах коры головного мозга, защиты от окислительного стресса и апоптоза, вызванного воздействием этанола [Narasimhan, 2011. Overexpression].

Гликоген-синтаза киназа 3β (GSK3β) является потенциальным посредником этанолопосредованной гибели нейронов.

Цианидин-3-глюкозид (C3G), антоциан – мощный природный антиоксидант. C3G тормозит активность GSK3β в нейронах. Внут-

рибрюшинное введение С3G 7-дневным мышам, подвергшимся воздействию этанола в период развития, эквивалентный третьему триместру беременности у человека, способствовало снижению активации GSK3 β и экспрессии малонового диальдегида и p47phox. Эти данные указывают, что С3G угнетает этанолиндукцированный окислительный стресс [Ke, 2011. Cyanidin-3-glucoside].

Антиоксиданты обладают нейропротекторным действием. Для изучения данного эффекта проводили эксперимент на крысах. Новорожденным крысам вводили с помощью внутрижелудочной интубации молочную смесь, содержащую 12% этанола на 4-5-е сутки после рождения (период максимальной чувствительности развивающегося мозжечка к этанолу). Для анализа количества клеток Пуркинье использованы объективные трехмерные методы подсчета. Наблюдались существенные потери среди клеток Пуркинье (около 30-44%) в группе животных, получавших этанол, но эти потери были предотвращены путем включения в рацион витамина E (600U/100 мл). Более низкие концентрации антиоксидантов (300 U/100 мл) в этом отношении неэффективны. Эти результаты позволяют предположить, что повреждения мозжечка под воздействием этанола во время раннего послеродового периода могут быть связаны с недостаточностью защитных антиоксидантов. Таким образом, антиоксидантная терапия может служить для предотвращения или уменьшения повреждений ЦНС при антенатальной алкоголизации [Heaton, 2000; Tran, 2005].

Коррекция клеточных сигнальных путей. В присутствии этанола уровни нейротрофических факторов, в том числе инсулин-подобного фактора роста, фактора роста нервов, основного фактора роста фибробластов и глиального нейротрофического фактора, снижаются. Введение многих из этих факторов роста может смягчить тератогенные эффекты этанола. Приведенные данные подчеркивают потенциал нейротрофических факторов для лечения FASD [McGough, 2009. Insulin-like; Barclay, 2005. Reversal].

Исследовано также нейропротекторное действие нейротрофического фактора – пептида ADNF-9 – против алкогольиндуцированного апоптоза путем использования TUNEL окрашивания, жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (LC-MS/MS). Беременным мышам давали с 7-го по 13-й день жидкую пищу, содержащую 25% этанол. В другой группе параллельно с этанолом назначали ADNF-9 (ALC/ADNF-9). На 13-й

день внутриутробного развития осуществлялся забор мозга плодов, он был взвешен и заморожен для процедуры LC-MS/MS. Часть материала фиксировалась для окрашивания TUNEL. Назначение ADNF-9 предотвратило вызываемые алкоголем снижение веса мозга плода и увеличение клеточного апоптоза [Sari, 2011].

Для нивелирования влияния этанола на развивающийся мозг использовали нейротрофический фактор (пептид ADNF-9). В опыте на мышах выявляли внутриклеточные механизмы, лежащие в основе нейропротекторного действия ADNF-9. На 7-й день беременности самки были разделены на следующие группы: (1) жидкая диета с 25% этанолом, (2) контроль, (3) этанол в сочетании с назначением ADNF-9 и (4) контроль с назначением ADNF-9. На 13-й день эмбрионального развития осуществляли забор материала, мозг плодов взвешивали. Апоптоз определяли с помощью TUNEL-методом, а Bcl2 белок и фосфорно-с-Jun N-терминал киназу (JNK) – методом Вестерн-блот и иммунометрического ферментного анализа. Назначение ADNF-9 в значительной степени предотвращало вызванное алкоголем уменьшение массы мозга плода. Кроме того, ADNF-9 предотвращал алкогольиндуцированное увеличение апоптоза в зачатках головного мозга. Вестерн-блот анализ митохондриальной фракции белков показал, что ADNF-9 предотвращает вызванное алкоголем уменьшение уровня Bcl2. Кроме того, анализ белков в сигнальных путях показал, что ADNF-9 подавляется фосфорилирование JNK. ADNF-9 обладает нейропротекторным механизмом действия, обеспечивая восстановление нейронных повреждений и митохондриальной дисфункции [Sari, 2012].

Алкоголь снижает также адгезию клеток. Клеточные контакты обязательны для нейронной связи, клеточной миграции и развития аксонов и дендритов. Эту свою способность этанол осуществляет при посредничестве молекулы L1 адгезии CAM (L1CAM). 1-октанол и другие спирты, нарушая действие этанола на L1 адгезию, могут предотвратить этанол-индуцированный апоптоз, задержку роста и задержку закрытия нервной трубки [Chen, 2001a. Octanol]. Эти данные позволяют предположить, что назначение фармакологических агентов, препятствующих угнетению клеточной адгезии L1, вызванному алкоголем, может служить для снижения тяжести проявлений FASD. Потенциал развития таких агентов недавно был расширен за счет идентификации сайта связывания с алкоголем на молекуле L1CAM [Arevalo, 2008].

геймера, болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона и боковой амиотрофический склероз). Литий – ингибитор гликоген-синтазы киназы 3 (GSK3), которая является посредником этанолиндуцированного апоптоза нейронов. Кроме того, литий влияет на многие другие сигнальные белки, регулирующие жизнедеятельность нейронов и их дифференцировку [Luo, 2010].

Для оценки терапевтического эффекта анирацетама при когнитивном дефиците проводили следующее исследование. Крысам перорально вводили этанол в умеренных дозах (4 г/кг каждые 24 ч, 38% раствор) на протяжении всей беременности. У потомства были выявлены тяжелые когнитивные нарушения и поведенческие аномалии, такие как задержка в развитии рефлексов, высокий уровень тревожности у самок крыс. Когнитивные нарушения хорошо коррелировали со значительным снижением AMPA (альфа-амино-3 гидро-5 метилизоксазол пропионовой кислоты) и рецептор-опосредованных миниатюрных возбуждающих постсинаптических ответов (mEPSCs) в гиппокампе. Назначение анирацетама в течение 10 дней (18-27-й дни после рождения) в дозе 50 мг/кг позволило скорректировать когнитивные нарушения у обоих полов крыс путем положительной послеродовой модуляции AMPA-рецепторов [Vaglenova, 2008. Aniracetam].

Крысам на протяжении 18 месяцев вводился этанол в качестве питья в концентрации 20% (средняя доза 8-12 г/кг/день), что приводило к снижению количества синапсов и клеток-зёрен в гиппокампе. После резкого прекращения употребления этанола гистологические нарушения усугублялись. Введение анирацетама в период «вынужденной трезвости» останавливало патологические процессы, вызванные абстинентным синдромом, и удерживало показатели на уровне алкоголизации, не оказывая влияния на число холинергических синапсов [Brandao, 1999], но восстанавливая количество ГАМК-ергических синапсов, повреждённых хронической алкоголизацией [Cadete-Leite, 1997].

Проводилось исследование на грызунах для выяснения изменения уровня цАМФ в нейронах мозга под воздействием этанола в течение периода, аналогичного третьему триместру беременности у человека и действия винпоцетина (церебральный вазодилататор) на этанол-индуцированную гиперактивность у потомства. Со 2-го по 8-й день после рождения мыши получали этанол (5г/кг) через день. На 30-е сутки после рождения животным давали винпоцетин (20

мг/кг). Затем после изучения их двигательной активности был осуществлен забор фронтальной коры головного мозга и гиппокампа для оценки уровня цАМФ. Раннее воздействие алкоголя значительно повысило двигательную активность и привело к снижению уровня цАМФ в нейронах гиппокампа. Назначение мышам винпоцетина в дозе 20 мг/кг способствовало восстановлению как нормальной двигательной активности, так и уровня цАМФ. Эти данные свидетельствуют, что цАМФ участвует в процессе устранения гиперактивности под воздействием алкоголя и указывают на возможность терапевтического использования винпоцетина для коррекции FASD [Nunes F., 2011. Acute].

Этанол, как известно, уменьшает количество полиненасыщенных жирных кислот в мембранах мозга, возможно, вследствие торможения дельта-5- и дельта-6 десатураз. Масло примулы вечерней (ЕРО), которое богато гамма-линоленовой кислотой (10% 8:3; N – 6), было использовано для нивелирования данного эффекта этанола. Крысам этанол давали во время беременности и в период кормления в составе жидкой диеты. ЕРО вводили одновременно с этанолом. У животных в 60-дневном возрасте изучали поведенческие ответы при прохождении ими лабиринта Морриса (состояние памяти и обучения). Установлено, что способность к обучению повышается после введения ЕРО [Duffy, 1992].

Для изучения защитного эффекта фолиевой кислоты беременности мышам с 1-х по 16-е сутки через желудочный зонд вводили алкоголь в дозе 5,0 г/кг, животным одной из групп одновременно давали 60,0 мг фолиевой кислоты. Результаты оценки помета на 18-е сутки внутриутробного развития показали, что добавки фолиевой кислоты способствовали снижению распространенности микроцефалии, индуцированной алкоголем, среди потомства. Назначение фолиевой кислоты отменяло также вызванные алкоголем изменения белков, участвующих в производстве энергии, белков сигнальных путей и белков перевода, которые являются важными для развития центральной нервной системы [Хи, 2008]. Показано, что фолиевая кислота в состоянии исправить нарушения экспрессии генов, вызванные антенатальной алкоголизацией на ранних стадиях развития эмбриона [Halder, 2013. Chronic].

Введение никотинамида совместно с приемом алкоголя снижает уровень апоптоза, а также способствует уменьшению у потомства гиперактивности и тревожности [Ieraci, 2006].

Эритропоэтин (ЭПО) играет важнейшую роль в процессах метаболизма и регенерации нервной системы. В настоящем исследовании изучалось влияние ЕРО на этанолиндуцированную нейродегенерацию в развивающемся мозгу C57BL/6 мышей. Мыши одной из групп получали этанол, а другой ЕРО вводили одновременно с этанолом. Этанол вводили в дозе 2,5 г/кг два раза с 2-часовым интервалом. Рекомбинантный человеческий ЕРО давали в дозе 1000 U/кг. Материал был забран через 24 ч спустя после первой дозы этанола. Провели оценку гибели нейронов, апоптоза, уровней тиобарбитуровой кислоты (TBARS), супероксиддисмутазы (SOD), глутатионпероксидазы (GPX). Гистопатологическая оценка показала, что ЕРО значительно снижает апоптоз в мозжечке, префронтальной коре и гиппокампе, а также среди CA1, CA2, и CA3 нейронов гиппокампа. Одновременное введение ЕРО вместе с этанолом ослабляет процесс перекисного окисления липидов и восстанавливает уровень антиоксидантов. Что касается широкого применения эритропоэтина у недоношенных новорожденных, этот агент может быть потенциально полезным в лечении этанолиндуцированного поражения головного мозга в перинатальном периоде [Kumral, 2007. Erythropoietin].

Недавние исследования показали, что холин может уменьшить тератогенные последствия воздействия алкоголя. Он способствует улучшению поведения и памяти. Беременных крыс интубировали этанолом (6 г/кг/сут) с 5-х по 20-е сутки. Одновременно проводили интубацию холина – 250 мг/кг/день. У потомства данных крыс затем оценивали моторную координацию, поведение в водном лабиринте Морриса и рабочую память. Назначение холина способствовало смягчению дефектов рабочей памяти, улучшало результаты прохождения водного лабиринта Морриса, повышало поведенческую пластичность [Zeisel, 2011]. В других исследованиях крысам с помощью оральной интубации вводили этанол (5,25 г/кг/сут) в течение третьего триместра беременности. Потомству алкоголизированных крыс давали холин хлорид в дозе 100 мг/кг/сут в период от 40-х до 60-х суток после рождения. После лечения холином животные прошли ряд поведенческих тестов: открытое поле, водный лабиринт Морриса и оценка рабочей памяти. Лечение не смогло скорректировать гиперактивность в открытом поле и дефекты поведения в водном лабиринте, но способствовало улучшению рабочей памяти. Можно предположить, что эффекты

холина связаны с его влиянием на функционирование префронтальной коры [Schneider, 2016].

Изучалась возможность коррекции последствий антенатальной алкоголизации таурином. В результате разового введения алкоголя в дозе 5 г/кг у 4-суточных крысят наблюдалась массовая гибель клеток Пуркинье мозжечка, а на 7-е сутки развития отмечалась повышенная активность каспазы (маркера апоптоза). Таурин в дозе 1г/кг снижал активность каспазы и на 50% снижал гибель нейронов на 7-е сутки развития, однако не снижал гибели клеток Пуркинье на 4-е сутки развития [Taranukhin, 2013]. Было также показано, что таурин в концентрации 20 мМ снижает уровни активированной каспазы в гипоталамических ядрах после воздействия алкоголя [Taranukhin, 2008].

В ходе эксперимента, проведенного на крысах, установлено, что омега-3 кислоты и бетаин (при совместном введении их с этанолом) снижали процессы нейродегенерации в головном мозге потомства пренатально алкоголизированных крыс [Kusat, 2016. The investigation].

Положительное влияние на постнатальное развитие клеток Пуркинье, подвергшихся пренатальному воздействию этанола, экзогенного L-тироксина было исследовано на крысах. Беременных крыс разделили на три группы. Животные группы А (n=6) получали жидкую диету, содержащую 35% этанола, группа В (n=6) была контрольной, в группе С (n=6) получали жидкую диету, содержащую 35% этанола и, кроме того, экзогенный тироксин (5мкг/кг/сут) подкожно. Забор материала осуществляли на 7-, 14- 21- и 28-е сутки после рождения крысят для каждой из этих трех групп. Морфологические наблюдения показали нарушения синтеза белка в клетках Пуркинье мозжечка во всех возрастных группах, получавших этанол. Но у крысят, матерям которых вводили тироксин, данные патологические нарушения были значительно менее выраженными [Nathaniel, 1999. Effect].

Материнское употребление алкоголя изменяет гомеостаз аминокислот в крови матери, что приводит к ацидемии матери и плода, вызывая задержку роста плода. Способность глутамината регулировать кислотно-щелочной баланс была проверена в эксперименте на овцах. На 115-е сутки беременности овцам под анестезией была проведена операция, чтобы вставить катетер в брюшную аорту плода, материнскую брюшную аорту и полую вену. На 128-й день

беременности овцам сделали внутривенное вливание (по разным группам, соответственно): физиологического раствора, алкоголя (1,75 г/кг массы тела/ч) и 30 мг глутамина/кг массы тела, алкоголя и 30 мг глутамина/кг массы тела, алкоголя и 100 мг глутамина/кг массы тела, или CO₂ для моделирования ацидемии неалкогольного генеза. Образцы крови были получены одновременно от матери и плода. Введение алкоголя беременным овцам привело к снижению концентрации глутамина и связанных с ним аминокислот в плазме крови на 21-30%. Однократный прием глутамина одновременно с алкоголем способствовал нормализации уровня большинства аминокислот (в том числе цитруллина и аргинина) в плазме матери и плода. Таким образом, глутамин может использоваться для коррекции кислотно-щелочного равновесия, нарушенного этанолом [Washburn, 2013. Acute].

Докозагексаеновые кислоты (DHA, 22:6 n-3) играют важную роль в развитии и правильном функционировании мозга у млекопитающих. DHA способствует синаптогенезу в нейронах гиппокампа, в то время как DHA-истощение в мозге из-за дефицита омега-3 жирных кислот вызывает негативный эффект. Для понимания молекулярных механизмов, лежащих в основе этого явления, выясняли влияние DHA на белки синаптических мембран (SPM) с помощью nanoLC-ESI-MS/MS и (16) O₂/(18) O₂ маркировки. Эта стратегия позволила провести сравнительный количественный анализ более чем 200 различных мембран или мембранных белков. Было обнаружено, что их содержание значительно снижено в мозгу тех мышей, которые не получали достаточного количества омега-3 жирных кислот [Sidhu, 2011].

Докозагексаеновая кислота (DHA, 22:06 N-3) предотвращает этанолиндуцированный апоптоз нейронов путем стимуляции накопления фосфатидилсерина (PS). Этанол подавляет DHA-зависимое накопление PS и вызывает апоптоз. Введение же DHA в культуру клеток гиппокампа совместно с этанолом нивелирует негативные его эффекты и способствует предотвращению гибели нейронов [Akbar, 2002; Akbar, 2006. Ethanol;].

В настоящее время не существует эффективного терапевтического средства для лечения расстройств, связанных с потреблением алкоголя, без серьезных побочных эффектов. Dihydromyricetin (DHM; 1 мг/кг внутрибрюшинные инъекции), флавоноиды лекарственных трав противодействуют острому опьянению этанолом,

снимают у крыс повышенную тревожность, а ДНМ значительно сокращает потребление этанола. Рецепторы (ГАМК (A) Rs) и ГАМК (A) являются основными мишенями острого и хронического действия этанола на мозг. На клеточном уровне ДНМ (1 мкМ) в гиппокампе и культивируемых нейронах снижает этанолиндуцированное потенцирование ГАМК (A) Rs и ГАМК (A) рецепторов, в том числе изменяет восприимчивость внесинаптических и постсинаптических отделов ГАМК (A) Rs к острому воздействию этанола. Таким образом, ДНМ противодействует алкогольной интоксикации и формированию зависимости [Shen, 2011].

Основные молекулярные механизмы нейротоксичности этанола полностью не определены, но вероятно они связаны с митохондриальной дисфункцией, изменением гомеостаза кальция и апоптоз-связанных белков. Было проведено исследование для оценки нейропротекторного действия метформина (Met) и тимохинона (TQ) у крыс на пренатальные корковые нейроны, срок – 17,5 дней эмбрионального развития. Установлено, что Met и TQ, отдельно и синергически, повышают жизнеспособность клеток после воздействия этанола в течение 12 ч и повышают содержание свободного кальция в цитозоле. Кроме того, TQ поддерживает нормальный физиологический трансмембранный потенциал митохондрий ($\Delta\psi$ M), который этанол обычно снижает. TQ ингибирует каскад апоптоза за счет увеличения Bcl-2. Эти соединения также подавляют активацию каспазы-9 и каспазы-3, уменьшают расщепление PARP-1. Морфологически гибель клеток оценивали по методу TUNEL. Выяснено, что Met, TQ или Met плюс TQ предотвращают этанолиндуцированный апоптоз клеток. Эти результаты говорят о том, что Met и TQ являются сильными защитными средствами против этанолиндуцированного апоптоза нейронов в первичной коре головного мозга крыс [Ullah, 2012].

Исследования на крысах показали, что потомство тех из них, кто имел высокий уровень железа в крови или получал обогащенную железом пищу одновременно с приемом алкоголя, менее пострадало от антенатальной алкоголизации [Rufer, 2012].

Интоксикация этанолом (5 г/кг) у семидневных крысят приводит к апоптозу нейронов и к повсеместной их гибели в головном мозге. Проводились исследования потенциального нейропротекторного эффекта пирувата. Спустя 4 ч после введения разовой дозы этанола (5 г/кг) у лабораторных животных наблюдали выход мито-

хондриального цитохрома-с в цитозоль, активацию каспазы-3 и расщепление полимераза (PARP-1), что способствует апоптозу. Эти эффекты нивелированы назначением пирувата в хорошо переносимой дозе – 1000 мг/кг. На гистологических срезах (забор материала осуществлялся спустя 24 и 48 ч после введения пирувата) при окрашивании фтор-Jade-B и крезильным фиолетовым обнаружено, что назначение пирувата значительно сократило число погибших клеток в коре головного мозга, гиппокампе и таламусе. Иммуногистохимический анализ через 24 ч после введения пирувата подтвердил, что этанолиндуцированный апоптоз ингибируется пируватом. Эти результаты показывают, что пируват способствует снижению этанолиндуцированной потери нейронов в развивающемся мозгу крыс в периоде, эквивалентном третьему триместру беременности человека, и может быть перспективным в качестве безопасного нейропротектора в лечении нейродегенеративных расстройств у новорожденных [Ullah, 2011].

В настоящей работе исследовали протективное действие пирувата на вызванную этанолом нейродегенерацию. У потомства мышей, получавших во время беременности этанол в дозе 2,5 г / кг, наблюдался апоптоз нейронов в коре головного мозга и таламусе. Назначение пирувата (500 мг/кг) нивелирует эффекты этанола путем снижения экспрессии каспазы-3 в этих областях мозга. Гистоморфологический анализ, проведенный через 24 ч после введения пирувата, с окрашиванием крезильным фиолетовым показал уменьшение потери клеток в коре головного мозга и таламуса [Ullah, 2013. Neuroprotective].

Ганглиозиды и LIGA20 (полусинтетическое производное GM1 ганглиозида) способны предотвращать этанолиндуцированный апоптоз в культуре нейронов. Данный эффект был изучен на семидневных мышах. Им предварительно дважды внутрибрюшинного вводили GM1 (30 мг/кг), LIGA20 (2,5 мг/кг) или физиологический раствор, а затем путем подкожной инъекции – этанол (2,5 г/кг) дважды, с интервалом в 2 часа. Мозг мышей был взят спустя 24 ч после первой инъекции этанола, и степень нейродегенерации оценивали на срезах, окрашенных серебром. Срезы мозга, взятого спустя 8 ч после первой инъекции этанола, подвергли иммуноокрашиванию для определения активации каспазы-3. Анализ результатов показал, что нейродегенеративные процессы заметно снижены у

тех мышей, которым вводили GM1 и LIGA20 [Olney, 2000. Ethanol-induced; Saito, 2007].

Клеточная терапия. При FASD, вызванных пренатальным воздействием алкоголя, основными симптомами поведенческих нарушений являются: снижение социальной активности и познавательная дисфункция. Внутривенная трансплантация нейрональных стволовых клеток (НСК) крысам с FASD помогла частично исправить эти поведенческие отклонения. Полученные результаты свидетельствуют, что трансплантация НСК может восстановить нейронные сети и повреждения центральной нервной системы алкоголем [Shirasaka, 2011].

Таким образом, лечение нарушений, вызванных в организме, в особенности в ЦНС, антенатальным воздействием этанола, является сложной проблемой. В настоящее время отсутствуют эффективные общепринятые методы медикаментозной терапии данной патологии. Таргентная молекулярная и клеточная терапия, хотя и представляется весьма обнадеживающей в моделях на животных, ещё слишком далека от клинического применения. Поэтому следует уделять особое внимание лечебно-педагогической коррекции двигательной, психологической и речевой сферы у детей в раннем возрасте с целью абилитации, достижению ребенком по возможности и более высокой функциональной активности, ущербной от рождения. Вместе с тем очевидной представляется необходимость проведения интенсивных многоуровневых профилактических мероприятий в обществе, поскольку единственным надежным способом предотвращения алкогольного поражения плода и новорожденного является полное воздержание от алкоголя во время беременности и грудного вскармливания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Аntenатальная алкоголизация приводит к развитию ряда специфических нарушений в организме плода, объединяемых в понятие фетальный алкогольный синдром (ФАС), входящий в «спектр нарушений плода, вызванных алкоголем» (fetal alcohol spectrum disorders, FASD). Частота распространения ФАС, по данным международных эпидемиологических исследований, варьирует в широких пределах и может достигать у обычных детей в некоторых странах 1,5%, в детских домах и приютах – 9-13%. При этом частота FASD наблюдается в несколько раз выше, достигая в отдельных случаях 80% (введение).

Как у человека, так и животных, подвергавшихся антенатальному воздействию алкоголя, развиваются разнообразные глубокие, долговременные и часто необратимые психические и поведенческие нарушения: когнитивные, сенсомоторные и эмоциональные расстройства, нарушения социального и полового поведения, повышенное влечение к этанолу и психоактивным веществам (гл. 1).

Электроэнцефалография, позитронно-эмиссионная томография, однофотонная эмиссионная компьютерная томография и функциональная магнитно-резонансная томография у пациентов с ФАС и FASD выявила дезорганизацию развития всех отделов мозга, значительные и разнообразные нарушения биоэлектрической активности и нарушение взаимосвязей между разными отделами мозга, функциональные нарушения метаболизма мозга, часто связанные с лицевым деморфизмом и когнитивными и поведенческими нарушениями (гл. 2).

Аntenатальное воздействие этанола на развивающийся организм вызывает значительные и разнообразные микроскопические изменения во всех изученных структурах мозга, зависящие от дозы и сроков воздействия этанола. Установлены грубые нарушения развития нервной трубки и мозговых пузырей, недоразвитие определённых структур мозга, нарушение миграции нейробластов, процессов созревания нейронов, массовый апоптоз и деструкция нервных клеток в разных отделах мозга, с появлением очагов выпадения нейронов. Данные нарушения объясняют многие функциональные дефициты, наблюдающиеся при ФАС (гл. 3, 4).

Аntenатальное воздействие алкоголя вызывает значительные и разнообразные нарушения клеточных и молекулярно-генетических механизмов развития и жизнедеятельности мозга, ле-

жащие в основе морфологических и функциональных изменений ЦНС при алкогольном синдроме плода (гл. 5, 6).

Высокая чувствительность мозга плода к алкоголю обусловлена повышенной активностью этанолаксилирующих ферментов мозга плода (в частности каталазы) и низкой активностью основного фермента, окисляющего АА, – альдегиддегидрогеназы. Это приводит к повышенному образованию в мозгу АА из этанола и понижению его удалению из тканей мозга. Кроме того, низкая активность АльДГ в барьерных структурах мозга плода облегчает проникновение АА из крови в мозг в условиях повышенного его образования из этанола в периферических тканях плода, плаценте и в организме матери, особенно в конце беременности. Это создаёт условия для накопления и проявления его токсического действия в мозгу плода. В совокупности эти данные могут объяснить повышенную чувствительность развивающегося мозга к алкоголю и указывают на один из возможных механизмов патогенеза алкогольного синдрома плода (гл. 7-8).

В литературе накоплено большое количество разрозненных данных, изложенных в монографии, о нарушениях, возникающих под действием алкоголя у плода на молекулярном, клеточном, органном, системном, организменном уровнях, а также после рождения, на социальном уровне (в результате нарушения психики и поведения ребёнка, его взаимоотношений с другими людьми). Вместе с тем пока отсутствует целостное представление о взаимосвязях между этими многочисленными нарушениями и патогенезе ФАС. В 8-й главе мы попытались на уровне современных знаний, с учётом мнений других учёных концептуально подойти к этому вопросу и представить собственное видение патогенеза ФАС. Однако целостная картина алкогольных нарушений плода ещё далека от завершения.

В целом алкогольный синдром плода, поражения мозга и другие последствия антенатальной алкоголизации представляются глобальной медико-биологической проблемой, масштабы и катастрофические последствия которой для человечества только начинают осознаваться. Алкоголь грубо вторгается и нарушает многие тончайшие биологические механизмы, управляющие сложнейшим процессом развития нового организма. Надеемся, что наша книга привлечёт внимание медицинской общественности и будет способствовать мобилизации ресурсов для решения этой важной проблемы.

ЛИТЕРАТУРА

- Аntenатальное воздействие алкоголя на морфофункциональное развитие центральной нервной системы / Н. М. Смольникова [и др.] // Акушерство и гинекология. – 1985. – № 4. – С. 61-64.
- Артюхина, Н. И. Влияние употребления алкоголя самцами и самками крыс на структуру головного мозга потомства / Н. И. Артюхина // Алкоголизм и наследственность. Матер. Междунар. Симп., Ленинград, 1986. – С. 30-33.
- Артюхина, Н. И. Нарушение структурно-функциональной организации митохондрий коры головного мозга белых крыс вследствие антенатальной алкогольной интоксикации / Н.И. Артюхина, Л.В. Ноздрачева. – М., 1988. – 9 с. – Деп. в ВИНТИ 8.88, № 8475.
- Батин, Н. В. Компьютерный статистический анализ данных : учеб.-метод. пособие / Н. В. Батин. – Минск : Ин-т подгот. науч. кадров НАН Беларуси, 2008. – 160 с.
- Биохимические изменения у потомства крыс после воздействия этанолом в период беременности и лактации / А. М. Котин [и др.]. – Ленинград: Фармакология – клинике, 1988. – 63 с.
- Боголепов, Н. Н. Методы электронно-микроскопического исследования мозга / Н. Н. Боголепов. – М. : Издание Ин-та мозга АМН СССР, 1976. – 72 с.
- Бонь Е. И. Инволюция нейронов коры головного мозга крыс, потреблявших алкоголь во время беременности / С. М. Зиматкин, Е. И. Бонь // Весці НАН Беларусі. – 2016. – № 1. – С. 59-64.
- Бонь Е. И. Нарушение развития нейронов фронтальной коры мозга крыс после воздействия алкоголя в антенатальном периоде / С. М. Зиматкин, Е. И. Бонь // Весці НАН Беларусі. – 2015. – № 3. – С. 125-128.
- Бонь Е. И. Динамика гистологических изменений в париетальной коре мозга крыс, подвергавшихся антенатальному воздействию алкоголя / С. М. Зиматкин, Е. И. Бонь // Новости медико-биологических наук. – 2015. – № 2. – С. 146-151.
- Бонь Е. И. Динамика цитохимических изменений в цингулятной коре мозга крыс, подвергавшихся антенатальному воздействию алкоголя / Е. И. Бонь, С. М. Зиматкин // Новости медико-биологических наук. – 2016. – Т. 13. – № 1. – С. 17- 22.
- Бонь, Е. И. Ультраструктура нейронов фронтальной коры мозга 20-суточных крыс после антенатальной алкоголизации / Е. И. Бонь, О. Б. Островская, С. М. Зиматкин // Весці НАН Беларусі. – 2016. – № 3. – С. 43-46.
- Бояджиева, Н. Изучение влияния комбинированного применения метронидазола и алкоголя на развитие плода у крыс / Н. Бояджиева // Эксп. мед. и морфол. – 1986. – № 2. – С. 31-35.
- Заблудовский, А. П. Последствия алкогольной интоксикации для потомства: монография / А. П. Заблудовский, М.Я. Майзелис, С.Н. Шихов. – М.: Наука, 1989. – 90 с.

- Зиматкин, С. М. Влияние алкоголя на развивающийся мозг / С. М. Зиматкин, Е. И. Бонь // Морфология. – 2014. – Т. 145, № 2. – С.79-88.
- Зиматкин С. М. Динамика гистологических изменений во фронтальной коре мозга крыс, подвергавшихся антенатальному воздействию алкоголя / С. М. Зиматкин, Е. И. Бонь // Морфология. – 2016. – № 2. – С. 11-15.
- Зиматкин С.М. Психические и поведенческие нарушения после антенатальной алкоголизации / С.М. Зиматкин, Е.И. Бонь, О.С., Зиматкина // Новости медико-биологических наук. – 2016. – Т. 13. – № 2. – С. 159- 165.
- Зиматкин С. М. Ультраструктурные изменения нейронов фронтальной коры мозга у 45-суточных крыс после пренатального воздействия алкоголя / С. М. Зиматкин, Е. И. Бонь, О. Б. Островская // Новости медико-биологических наук. – 2016. – Т. 14. – № 3. – С. 33 – 37.
- Зиматкин, С. М. Активность альдегиддегидрогеназы мозга крысы в онтогенезе / С. М. Зиматкин, Р. Е. Лис // Арх. анат., гистол. и эмбриол. – 1990. – № 5. – С. 27-33.
- Зиматкин, С. М. Алкогольный синдром плода: монография / С. М. Зиматкин, Е. И. Бонь. – Минск, «Новое знание», 2014. – 240 с.
- Зиматкин, С. М. Альдегиддегидрогеназы мозга и их роль в патогенезе алкоголизма: монография. – Гродно, ГрГМУ, 2008. – 308 с.
- Зиматкин, С. М. Окисление алкоголя в мозге: монография. – Гродно, 2006. – 200 с.
- Казакова, П. Б. Гистологические и цитохимические изменения коры мозга потомства алкоголизированных животных / П. Б. Казакова, Г. Ф. Конокоитина // Ж. невропатол. и психиатрии. – 1987. – № 12. – С. 1862-1865.
- Каркищенко, Н. Н. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / Н. Н. Каркищенко, С. В. Грачева. – М.: Профиль-2С, 2010.
- Кирющенко, А. П. Алкогольный синдром плода / А. П. Кирющенко // Алкоголизм и наследственность. Матер. Междунар. Симп., Ленинград, 1986. – М., 1987. – С. 79-83.
- Ковецкий, Н. С. Нейроморфологическое и электронно-микроскопическое исследование головного мозга эмбрионов, полученных от больных алкоголизмом матерей / Н. С. Ковецкий, А. В. Солонский, А. Н. Моховиков // Алкоголизм. – 1988. – № 12. – С. 76-80.
- Коломейцева И.А. Влияние алкогольной интоксикации у крыс в период внутриутробного развития на поведение взрослого потомства / И. А. Коломейцева, О. Л. Левина, А. Б. Кампов – Полевой // Ж. высш. нервн. деят. – 1988. – № 4. – С. 773-776.
- Коломейцева, И.А. Влияние алкогольной интоксикации в период внутриутробного развития на функции центральной нервной системы потомства / И. А. Коломейцева, О.Л. Левина // Акушерство и гинекология. – 1989. – № 1. – С. 46-51.
- Коломейцева, И.А. Электрографическая картина сна у взрослых крыс при антенатальной алкогольной интоксикации / И.А. Коломейцева, О.Л. Леви-

- на // Актуальные вопросы физиологии и патологии сна: тезисы Всесоюзной науч. конференции. – М., 1985. – С. 33-35.
- Кузнецов, В. К. Вопросы профилактики и лечения алкоголизма, токсикоманий и наркоманий / В. К. Кузнецов, Н. А. Лаврентьева, В. Н. Калмыкова // Фельдшер и акушерка. – 1988. – № 10. – С. 43-46.
- Лакин, Г. Ф. Биометрия / Г. Ф. Лакин. – М. : Высшая школа, 1990. – 352 с.
- Легонькова, С. В. Нейрофизиологическая характеристика фетального алкогольного синдрома / С. В. Легонькова, А. Б. Пальчик // Профилактическая и клиническая медицина. – 2011. – № 2. – С. 95-99.
- Легонькова, С. В. Фетальный алкогольный синдром: клинические, нейрофизиологические, возрастные и этнические аспекты / С. В. Легонькова, А. Б. Пальчик, Г. И. Софронова // Вестник Алматин. гос. института усовершенствования врачей. – 2010. № 1. – С. 51-53.
- Майзелис, М. Я. Содержание энкефалинов в отделах головного мозга крыс, перенесших внутриутробные воздействия этанола / М. Я. Майзелис, А. Л. Заблудовский // Бюл. экспериментальной биологии и медицины. – 1986. – № 3. – С. 311-312.
- Малахова, Ж. Л. Клинико-патогенетические основы фетального алкогольного синдрома у детей: автореф. диссертации канд. медицинских наук / 14.01.08 / Ж. Л. Малахова. – Екатеринбург: Уральская государственная медицинская академия, 2012. – 49 с.
- Малахова, Ж.Л. Уровень трансформирующего фактора роста (TGF- β 1) у беременных женщин, имеющих пристрастие к алкоголю и у детей с фетальным алкогольным синдромом / Ж.Л. Малахова // Сб. материалов 2-й Российской научной конференции «Педиатрия из XIX в XXI век». – С-Петербург, 2010 – С. 40.
- Морозова, М. В. Сочетанное влияние алкоголя и стресса в пренатальном периоде на поведение взрослых мышей / М. В. Морозова, Н. К. Попова // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2010. – Т. 96. – № 11. – С. 114-121.
- Нарушение нейрогенеза корковых и подкорковых структур лимбической системы головного мозга крыс при формировании плодного алкогольного синдрома / И. К. Сванидзе [и др.] // Морфология. – 2012. – № 2. – С. 18-22.
- Нарушения развития головного мозга эмбрионов, полученных от злоупотреблявших алкоголем матерей / Г.Н. Коновалов [и др.] // Ж. невропатологии и психиатрии. – 1988. – Т. 88. – № 7. – С. 60-66.
- Нарушения развития нервной системы при антенатальной алкогольной интоксикации и их фармакологическая коррекция / М. Г. Айропетянц [и др.] // Институт мозга АМН СССР: сб. науч. работ, 1987. – № 16. – С. 118-121.
- Некоторые биохимические показатели у крыс при антенатальной алкоголизации / Е. И. Мельник [и др.] // Вопросы медицинской химии. – 1989. – № 3. – С. 33-36.

- Неокислительная функция пируватдегидрогеназного комплекса мозга животных / Н. С. Немеря [и др.] // Доклады АН СССР. – 1988. – № 3. – С. 750-753.
- Омельянчик, М. С. Экспериментальное изучение ингаляционного воздействия этанола на крыс при беременности на некоторые показатели у потомства / М. С. Омельянчик // Алкоголизм и наследственность: материалы международного симпозиума. – М., 1987. – С. 116-119.
- Осипчик, С. И. Отчет о научно-исследовательской работе «Разработать программу ранних вмешательств для профилактики алкогольного синдрома плода» в рамках научного обеспечения Государственной программы национальных действий по предупреждению и преодолению пьянства и алкоголизма на 2011-2015 годы / С. И. Осипчик, Т. В. Докукина. – Государственное учреждение РНПЦ психического здоровья, Минск, 2014. – 56 с.
- Пальчик, А. Б. Токсические энцефалопатии новорожденных / А. Б. Пальчик, Н. П. Шабалов – М.: МЕДпресс-информ, 2006. – 176 с.
- Пальчик, А. Б. Фетальный алкогольный синдром: методические рекомендации / А. Б. Пальчик, Л. А. Федорова, С. В. Легонькова. – СПб, 2006. – 43 с.
- Попова, Э. Н. Ультраструктура мозга, алкоголь и потомство: монография. – М.: Научный мир. – 158 с.
- Попова, Э. Н. Ультраструктура нейронов сенсомоторной коры у потомства крыс, получавших алкоголь во время беременности / Э. Н. Попова // Арх. анат. – 1988. – № 3. – С. 5-10.
- Разводовский, Ю. Е. Медико-социальные аспекты алкоголизма: монография. – Гродно, 2005. – 128 с.
- Реброва, О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О. Ю. Реброва. – М.: МедиаСфера, 2003. – 312 с.
- Рокицкий, П. Ф. Биологическая статистика : учеб. пособие / П.Ф. Рокицкий. – М.: Высшая школа, 1967. – 328 с.
- Сорока, В. Р. Влияние хронической алкогольной интоксикации на уменьшение азотистого обмена мозга потомства / В. Р. Сорока, Н. В. Погорелова, Н. Ф. Артема. – Донецк, 1989. – 11 с. – Деп. в Укр. НИИНТИ 02.01.89, № 39.
- Сравнительное экспериментальное исследование фетотоксического действия коньяка, виски и раствора ректифицированного пищевого спирта / В. П. Нужный [и др.] // Наркология. – 2003. – № 8. – С. 24-29.
- Ступина, А. С. Внутриядерные включения в клетках различных тканей у крыс при старении / А. С. Ступина, Т. Ю. Квитницкая-Рыжова, Н. А. Межиборская // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. – 1987. – Т. 92. – № 2. – С. 24-31.
- Таскаев, И. И. Структурно-функциональная оценка плаценты при интоксикации ацетальдегидом / И. И. Таскаев // Структурные основы и регуляция компенсаторно-приспособительных реакций. – Омск, 1986. – С. 72-77.
- Узбеков, М. Г. Нарушение обмена моноаминов в различных отделах головного мозга крыс, перенесших антенатальное воздействие этанола и под-

- ходы к их коррекции / М.Г. Узбеков, М.А. Мошанская // Алкоголизм и наследственность: материалы Международного симпозиума. – М., 1987. – С. 151-155.
- Худоерков, Р. М. Влияние внутриутробной алкогольной интоксикации на постнатальное развитие нейронов коры головного мозга крыс (цитохимическое исследование) / Р. М. Худоерков, Ю. Г. Цой // Институт мозга АМН СССР: сб. науч. трудов. – 1987. – № 16. – С. 170-172.
- Швец, Т. А. Влияние хронической алкогольной интоксикации на белковый обмен мозга потомства / Т. А. Швец, Н. Ф. Артемова // Фундаментальные достижения нейрохимии – медицине: сб. науч. работ. – Горький, 1987. – С. 64-65.
- 6q terminal deletion syndrome associated with a distinctive EEG and clinical pattern: a report of five cases / M. Elia [et al.] // *Epilepsia*. – 2006. – V. 47. – P. 830-838.
- A controlled social skills training for children with fetal alcohol spectrum disorders / M. J. O'Connor [et al.] // *Journal of Consulting & Clinical Psychology*. – 2007. – V. – 74. – P. 639-648
- A Functional Magnetic Resonance Imaging Study of Spatial Working Memory in Children with Prenatal Alcohol Exposure: Contribution of Familial History of Alcohol Use Disorders / A.L. Norman [et al.] // *Alcohol Clin Exp Res*. – 2012.
- A study of cortical morphology in children with fetal alcohol spectrum disorder / F. De Guio [et al.] // *s. Hum Brain Mapp*. – 2014. – V. 5. – P. 2285-2296.
- Abel, E. L. A review of alcohol's effects on sex and reproduction / E. L. Abel // *Drug Alcohol Depend*. – 1980. – V. 5. – P. 321-332.
- Abel, E. L. In utero alcohol exposure and development delay of response inhibition / E. L. Abel // *Alcoholism*. – 1982. – V. 6. – P.369-376.
- Abel, E. L. In utero alcohol exposure. Functional and structural brain damage / E.L. Abel, S. Jacobsen, B.T. Sherwin // *Neurobeh. Toxicology and Teratology*. – 1983. – V. 5. – P. 363-366.
- Aberrant development of post-movement beta rebound in adolescents and young adults with fetal alcohol spectrum disorders / A. Vakhtin [et al.] // *Neuroimage Clin*. – 2015. – V. 9. – P. 392-400.
- Abnormal cortical thickness alterations in fetal alcohol spectrum disorders and their relationships with facial dysmorphology / Y. Yang [et al.] // *Cerebral Cortex*. – 2012. – V. 22. – P. 1170-1179.
- Acute administration of vinpocetine, a phosphodiesterase type 1 inhibitor, ameliorates hyperactivity in a mice model of fetal alcohol spectrum disorder / A. Nardelli [et al.] // *Filgueiras. Drug Alcohol Depend*. – 2011. – V. 119. – P. 81-87.
- Acute administration of vinpocetine, a phosphodiesterase type 1 inhibitor, ameliorates hyperactivity in a mice model of fetal alcohol spectrum disorder / F. Nunes [et al.] // *Drug Alcohol Depend*. – 2011. – V. 119. – P. 81-87.

- Acute alcohol exposure, acidemia or glutamine administration impacts amino acid homeostasis in ovine maternal and fetal plasma / S.E. Washburn [et al.] // *Amino Acids*. – 2013. – V. 110. – P. 123-130.
- Ahlgren, S. C. Sonic hedgehog rescues cranial neural crest from cell death induced by ethanol exposure / S.C. Ahlgren, V. Thakur, M. Bronner-Fraser // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2002. – V. 99. – P. 10476-10481.
- Akbar, M. Protective effects of docosahexaenoic acid in staurosporine-induced apoptosis: involvement of phosphatidylinositol-3 kinase pathway / M. Akbar, H.Y. Kim // *J Neurochem*. – 2002. – V. 82. – P. 655-665.
- Alcohol exposure decreases CREB binding protein expression and histone acetylation in the developing cerebellum / W. Guo [et al.] // *PLoS One*. – 2011. – V. 6. – P. 55.
- Alcohol impairs long-term depression at the cerebellar parallel fiber-Purkinje cell synapse / A. Belmeguenai [et al.] // *J Neurophysiol*. – 2008. – V. 100. – P. 3167-3174.
- Alcohol-induced apoptosis of oligodendrocytes in the fetal macaque brain / C. Creeley [et al.] // *Acta Neuropathol Commun*. – 2013. – V. 12. – P. 23-31.
- Alcohol-induced neuronal death in central extended amygdala and pyriform cortex during the postnatal period of the rat / V. Balaszczuk [et al.] // *Int J Dev Neurosci*. – 2011. – V. 29. – P. 33-42.
- Alfonso-Loeches, S. Molecular and behavioral aspects of the actions of alcohol on the adult and developing brain / S. Alfonso-Loeches, C. Guerri // *Crit Rev Clin Lab Sci*. – 2011. – V. 48. – P. 19-47.
- al-Rabiai, S. Effect of prenatal exposure to ethanol on the ultrastructure of layer V of mature rat somatosensory cortex / S. al-Rabiai, M. Miller // *J. Neurocytol*. – 1989. – V. 18. – P. 711-729.
- Altered frontal-parietal functioning during verbal working memory in children and adolescents with heavy prenatal alcohol exposure / E.D. O'Hare [et al.] // *Hum Brain Mapp*. – 2009. – V. 30. – P. 3200-3208.
- Altered Purkinje cell maturation in rats exposed prenatally to ethanol. I. Cytology / S.A. Mohamed [et al.] // *Exp Neurol*. – 1987. – V. 97(1). – P. 35-52.
- Alvares, M.R. Hypoploidy and hyperplasia in the developing brain exposed to alcohol in utero / M.R. Alvares, D.I. Stone // *Teratology*. – 1988. – V. 3. – P. 233-238.
- Aniracetam reversed learning and memory deficits following prenatal ethanol exposure by modulating functions of synaptic AMPA receptors / J. Vaglenova [et al.] // *Neuropsychopharmacology*. – 2008. – V. 33. – P. 1071-1083.
- Anxiety – and depression-like behaviors are accompanied by an increase in oxidative stress in a rat model of fetal alcohol spectrum disorders: Protective effects of voluntary physical exercise / P.S. Brocardo [et al.] // *Neuropharmacology*. – 2012. – V. 62. – P. 16-18.
- Apoptosis of Purkinje and granular cells of the cerebellum following chronic ethanol intake / S.A. Oliveira [et al.] // *Cerebellum*. – 2014. – V. 13. – P. 728-738.

- Approaching the Prevalence of the Full Spectrum of Fetal Alcohol Spectrum Disorders in a South African Population-Based Study / P.A. May [et al.] // *Alcohol Clin Exp Res.* – 2012.
- Arevalo, E. An alcohol binding site on the neural cell adhesion molecule L1 / E. Arevalo, S. Shamugasundararaj, M.F. Willemeyer // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* – 2008. – V. 105. – P. 371-375.
- Aronne, M.P. Effects of prenatal ethanol exposure on rat brain radial glia and neuroblast migration / M.P. Aronne [et al] // *Exp Neurol.* – 2011. – V. 229 – P. 71.
- Associative DNA methylation changes in children with prenatal alcohol exposure / B. Laufer [et al] // *Epigenomics.* – 2015. – V. 16. – P. 1-16.
- Astley, S.J. Profile of the first 1,400 patients receiving diagnostic evaluations for fetal alcohol spectrum disorder at the Washington State Fetal Alcohol Syndrome Diagnostic & Prevention Network / S.J. Astley // *Can J Clin Pharmacol.* – 2010. – V. 17. – P. 132-164.
- Baculis, B. Third trimester-equivalent ethanol exposure increases anxiety-like behavior and glutamatergic transmission in the basolateral amygdala / B. Baculis, M. Diaz, C. Valenzuela // *Pharmacol Biochem Behav.* – 2015. – V. 37. – P. 78-85.
- Balaraman, S. Opposing Actions of Ethanol and Nicotine on MicroRNAs are Mediated by Nicotinic Acetylcholine Receptors in Fetal Cerebral Cortical-Derived Neural Progenitor Cells / S. Balaraman, U.H. Winzer-Serhan, R.C. Miranda // *Alcohol Clin Exp Res.* – 2012. – V. 1111. – P. 1530.
- Barron, S. Effect of prenatal exposure to ethanol on the sexually dimorphic nucleus of the reoptic area of the hypothalamus / S. Barron, S. Tiemann, E. Rilyay // *Alcoholism: Clinical and Experimental Research.* -1988. – V. 12. – P. 59-64.
- Beal, M.F. Oxidative damage in neurodegenerative diseases / M.F. Beal // *Neuroscientist.* – 1997. – V. 3. – P. 21-27.
- Bertrand, J. Consortium IfCwFASDR. Interventions for children with fetal alcohol spectrum disorders (FASDs): overview of findings for five innovative research projects / J. Bertrand // *Res Dev Disabil.* – 2009. – V. 30. – P. 986-1006.
- Bilateral periventricular nodular heterotopia with mental retardation and syndactyly in boys: a new X-linked mental retardation syndrome / W.B. Dobyns [et al.] // *Neurology.* – 1997. – V. 49. – P. 1042-1047.
- Brain microstructure is related to math ability in children with fetal alcohol spectrum disorder / C. Lebel [et al.] // *Alcohol Clin Exp Res.* – 2010. – V. 34. – P. 354-363.
- Brandao, F. Piracetam impedes hippocampal neuronal loss during withdrawal after chronic alcohol intake / F. Brandao, M.M. Paula-Barbosa, A. Cadete-Leite // *Alcohol.* – 1995. – V.12(3). – P.279-288.

- Brys, I. Attention, locomotor activity and developmental milestones in rats prenatally exposed to ethanol / I. Brys, S. Pupe, L. Bizarro // *International Journal of Developmental Neuroscience*. – 2014. – V. 38. – P. 161–168.
- Caley, L. M. Results of a nurse-led workshop designed to prevent fetal alcohol spectrum disorder / L.M. Caley, S. Riemer, H.S. Weinstein // *Public Health Nurs.* – 2010. – V. 27. – P. 232-239.
- Carta, M. Alcohol potentially modulates climbing fiber to Purkinje neuron synapses: role of metabotropic glutamate receptors / M. Carta, M. Mameli, C.F. Valenzuela // *J Neurosci*. – 2006. – Vol.26(7). – P.1906-1912.
- Cartwright, M.M. Ethanol-induced neuronal death in organotypic cultures of rat cerebral cortex / M.M.Cartwright, L.L. Tessmer, S.M. Smith // *Alcohol Clin. Exp. Res.* – 1998. – V. 22, – P. 142-149.
- Cerebellum volume in high-risk offspring from multiplex alcohol dependence families: association with allelic variation in GABRA2 and BDNF / S.Y. Hill [et al.] // *Psychiatry Res.* – 2011. – V. 194. – P. 304-313.
- Changes in whole brain membranes of rats following pre- and post-natal exposure to ethanol / O. Duffy [et al.] // *Alcohol Alcohol.* – 1991. – V. 26. – P. 605-613.
- Chen, S. Ethanol disrupts axon outgrowth stimulated by netrin-1, GDNF, and L1 by blocking their convergent activation of Src family kinase signaling / S. Chen, M.E. Charness // *J Neurochem.* – 2012. – V. 10. – P. 1471-4159.
- Chronic ethanol exposure increases goosecoid (GSC) expression in human embryonic carcinoma cell differentiation / D. Halder [et al.] // *J Appl Toxicol.* – 2013. – V. 11. – P. 56-62.
- Chronic ethanol increases fetal cerebral blood flow specific to the ethanol-sensitive cerebellum under normoxaemic, hypercapnic and acidaemic conditions: ovine model / S.E. Parnell [et al.] // *Exp Physiology.* – 2007. – V. 92. – P. 933-943
- Cingulate gyrus morphology in children and adolescents with fetal alcohol spectrum disorders / O.A. Bjorkquist [et al.] // *Psychiatry Res.* – 2010. – V. 181. – P. 101.
- Clarren, S.K. Physical Anomalies and Developmental Delays in Nonhuman Primate Infants Exposed to Weekly Doses of Ethanol During Gestation / S.K. Clarren, S.J. Astley, D.M. Bowden // *Teratology.* – 1988. – V. 37. – P. 561-569.
- Coles CD1, Kable JA, Keen CL, Jones KL, Wertelecki W, Granovska IV, Pashtepa AO, Chambers CD; Dose and Timing of Prenatal Alcohol Exposure and Maternal Nutritional Supplements: Developmental Effects on 6-Month-Old Infants. *Matern Child Health J.* 2015 Jul 12.
- Coles, C.D. Functional neuroimaging in the examination of effects of prenatal alcohol exposure / C.D. Coles, Z. Li // *Neuropsychol Rev.* – 2011. – V. 21. – P. 119.
- Coles, C.D. Math performance and behavior problems in children affected by prenatal alcohol exposure: intervention and follow-up / C.D. Coles, J.A. Kable, E. Taddeo // *J Dev Behav Pediatr.* – 2009. – V. 30. – P. 7-15.

- Cortical thickness in fetal alcohol syndrome and attention deficit disorder / A. Fernández-Jaén [et al.] // *Pediatr Neurol.* – 2011. – V. 45. – P. 387-391.
- Cyanidin-3-glucoside ameliorates ethanol neurotoxicity in the developing brain / Z. Ke [et al.] // *J Neurosci Res.* – 2011. – V. 89. – P. 1676-1684.
- de la Monte, S.M. Role of central nervous system insulin resistance in fetal alcohol spectrum disorders / S.M. de la Monte, J.R. Wands // *J Popul Ther Clin Pharmacol.* – 2010. – V. 17(3). – P. 390-404.
- Deltour, L. Ethanol-Induced Microphthalmia is Not Mediated by Changes in Retinoic Acid or Sonic Hedgehog Signaling During Retinal Neurogenesis / L. Deltour, H.L. And, G. Duester // *FASEB J.* – 1996. – V. 10. – P.1050-1057.
- Detering, N. Comparative effects of ethanol and malnutrition on the development of catecholamine neurons: a long – lasting effects in the hypothalamus / N. Detering, R. Collins, R.L. Hawakins // *J. of neurochem.* – 1981. – V. 6. – P. 2094-2096.
- Detering, N. The effects of etanol on developing catecholamine neurons. Alcohol and aldehyde metabolizing systems / N. Detering, R. Collins, R.L. Hawakins // *IV N.Y. Plenum Press.* – 1980. – P. 721-727.
- Developmental delay of infants and young children with and without fetal alcohol spectrum disorder in the Northern Cape Province, South Africa / L Davies. [et al.] // *Afr J Psychiatry (Johannesbg).* – 2011. – V. 14. – P. 298-305.
- Di Nicolantonio, R. Fetal versus maternal determinants of the reduced fetal and placental growth in spontaneously hypertensive rats / R. Di Nicolantonio, K. Koutsis, M.E. Wlodek // *J Hypertens.* – 2000. – V. 18. – P. 45-50.
- Differences in cortico-striatal-cerebellar activation during working memory in syndromal and nonsyndromal children with prenatal alcohol exposure / V.A. Diwadkar [et al.] // *Hum Brain Mapp.* – 2012. – V. 5. – p. 26-32.
- Different patterns of regional Purkinje cell loss in the cerebellar vermis as a function of the timing of prenatal ethanol exposure in an ovine model / O.B. Sawant [et al] // *Neurotoxicol Teratol.* – 2013. – V.35. – P.7-13.
- Differential expression of calbindin D28k, calretinin and parvalbumin in the cerebellum of pups of ethanol-treated female rats / T. Wierzba-Bobrowicz [et al.] // *Folia Neuropathology.* – 2011. – V. 49. – P. 47-55.
- Differentiating attention deficits in children with fetal alcohol spectrum disorder or attention-deficit-hyperactivity disorder / L. Kooistra [et al.] // *Dev Med Child Neurol.* – 2010. – V. 52. – P. 205-211.
- Dlugos, C.A. Ethanol-induced alterations in Purkinje neuron dendrites in adult and aging rats. A review / C.A. Dlugos // *Cerebellum.* – 2015. – V. 14(4). – P. 466-473.
- Does moderate drinking harm the fetal brain? Insights from animal models [Text] / C.F. Valenzuela // *Trends Neurosci.* – 2012. – V. 35. – P. 284-292.
- Druse, M.J. The serotonin-1A agonist ipsapirone prevents ethanol-associated death of total rhombencephalic neurons and prevents the reduction of fetal serotonin neurons / M.J. Druse, N.F. Talgudin, R.A. Gillespie // *Brain Research. Developmental Brain Research.* – 2004. – V. 150. – P. 79-88.

- Duester, G. A hypothetical mechanism for fetal alcohol syndrome involving ethanol inhibition of retinoic acid synthesis at the alcohol dehydrogenase step / G. Duester // *Alcohol Clin Exp Res.* – 1991. – V. 15. – P. 568-572.
- Earnest, D.J. Developmental alcohol and circadian clock function / D.J. Earnest, W.J. Chen, J.R. West // *Alcohol Res Health.* – 2001. – V. 25. – P. 136-140.
- Eastwood, S.L. Decreased expression of vesicular glutamate transporter 1 and complexin II mRNAs in schizophrenia: further evidence for a synaptic pathology affecting glutamate neurons / S.L. Eastwood, P.J. Harrison // *Schizophr Res.* – 2005. – V. 73. – P. 159-172.
- Effect of exogenous thyroxine on the development of the Purkinje cell in fetal alcohol effects in the rat / E.J. Nathaniel [et al.] // *Exp Mol Pathol.* – 1999. – V. 67. – P. 175-191.
- Effects of alcohol exposure during early life on neuron numbers in the rat hippocampus. I. Hilus neurons and granule cells / T. Miki [et al.] // *Hippocampus.* – 2003. – V. 13. – P. 388-398.
- Effects of maternal alcohol consumption on the lipid composition of CNS in the offspring / T. Lalitha [et al.] // *J. Neurochem.* – 1988. – V. 5. – P. 1346-1351.
- Effects of neonatal alcohol dose and exposure window on long delay and trace eyeblink conditioning in juvenile rats / N.J. Murawski [et al.] // *Behav Brain Res.* – 2012. – V. 236. – P. 307-318.
- Effects of prenatal ethanol exposure on physical growth sensory reflex maturation and brain development in the rat / D. Lopez – Tejero [et al.] // *Neuropathol. and appl. Neurobiol.* – 1986. – V. 3. – P. 251-260.
- Effects of pre-natal alcohol exposure on hippocampal synaptic plasticity: Sex, age and methodological considerations / C.J. Fontaine [et al.] // *Neurosci Biobehav Rev.* – 2016. – V. 64. – P. 12-34.
- Efficacy of a new model of behavioral consultation for families raising school-aged children with FASDs and behavior problems / H.C. Olson [et al.] // *Infants and Young Children.* – 2007. – V. 21. – P. 174-190.
- Encyclopedia on Early Childhood Development: monograph / M.J. O'Connor [et al.]. – Montreal, Quebec: Centre of Excellence for Early Childhood Development and Strategic Knowledge Cluster on Early Child Development, 2011. – 110 p.
- Enzymatic production of acetaldehyde from ethanol in rat brain tissue / K. Gill [et al.] // *Alcohol Clin Exp Res.* – 1992. – V. 16. – P. 910-915.
- Enzymic catalysis of the accumulation of acetaldehyde from ethanol in human prenatal cephalic tissues: evaluation of the relative contributions of CYP2E1, alcohol dehydrogenase, and catalase/peroxidases / R.E. Person [et al.] // *Alcohol Clin Exp Res.* – 2000. – V. 24. – P. 1433-1442.
- Eriksen, J.L. Effects of in utero ethanol exposure and maternal treatment with a 5-HT (1A) agonist on S100B-containing glial cells / J.L. Eriksen, R.A. Gillespie, M.J. Druse // *Brain Res Dev Brain Res.* – 2000. – V. 121. – P. 133-143.

- Erythropoietin attenuates lipopolysaccharide-induced white matter injury in the neonatal rat brain / A. Kumral [et al.] // *Neonatology*. – 2007. – V. 92. – P. 269-278.
- Ethanol exposure affects trophic factor activity and responsiveness in chick embryo / M.B. Heaton [et al.] // *Alcohol*. – 1992. – V. 9. – P. 161-166.
- Ethanol exposure alters neurotrophin receptor expression in the rat central nervous system: Effects of neonatal exposure / D.B. Moore [et al.] // *J Neurobiol*. – 2004. – V. 60. – P. 114-126.
- Ethanol exposure alters neurotrophin receptor expression in the rat central nervous system: Effects of neonatal exposure / D.B. Moore [et al.] // *J Neurobiol*. – 2004. – V. 60. – P. 114-126.
- Ethanol exposure of neonatal rats does not increase biomarkers of oxidative stress in isolated cerebellar granule neurons / C.J. Kane [et al.] // *Alcohol*. – 2008. – V. 24. – P. 26-31.
- Ethanol induces cytoapoptosis of cortical basal progenitors / A. Riar [et al.] // *J Biomed Sci*. – 2016. – V. 23. – P. 6-13.
- Ethanol neurotoxicity and dentate gyrus development / T. Miki [et al.] // *Congenit Anom*. – 2008. – V. 48. – P. 110-117.
- Ethanol promotes neuronal apoptosis by inhibiting phosphatidylserine accumulation / M. Akbar [et al.] // *J Neurosci Res*. – 2006. – V. 83. – P. 432-440.
- Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in the developing brain / J.W. Olney [et al.] // *Apoptosis*. – 2000. – V. 5. – P. 515-521.
- Ethanol-induced disturbances of gliogenesis and neuronogenesis in the developing murine brain: an in vitro and in vivo immunohistochemical and ultrastructural study / P. Gressens [et al.] // *Alcohol Alcohol*. – 1992. – V. 27. – P. 219-226.
- Ethanol-induced neuroapoptosis in the developing rodent cerebellum and related brain stem structures / K. Dikranian [et al.] // *Brain Res Dev Brain Res*. – 2005. – V. 155. – P. 1-13.
- Ethanol-Induced Neurodegeneration and Glial Activation in the Developing Brain / M. Saito [et al.] // *Brain Sci*. – 2016. – V. 6(3). – P. 31-41.
- Exposure to ethanol during neurodevelopment modifies crucial offspring rat brain enzyme activities in a region-specific manner / V. Stolakis [et al.] // *Metab Brain Dis*. – 2015. – V. 30. – P. 1467-1477.
- Extensive deep gray matter volume reductions in children and adolescents with fetal alcohol spectrum disorders / A. Nardelli [et al.] // *Alcohol Clin Exp Res*. – 2011a. – V. 35. – P. 1404-1417.
- Fabregues, I. Effects of prenatal exposure to ethanol on the maturation of the pyramidal neurons in the cerebral cortex of the guinea pig: a quantitative Golgi Study / I. Fabregues, I. Ferrer, J.M. Gairi // *Neuropathol. and Appl. Neurobiol*. – 1985. – V. 2. – P. 291-298.
- Farber, N.B. Alcohol-induced neuroapoptosis in the fetal macaque brain / N.B. Farber, C.E. Creeley, J.W. Olney // *Neurobiol Dis*. – 2010. – V. 40. – P. 6.

- Feshbach, M. Environmental and Health Atlas of Russia: monograph / M. Feshbach, B. Prokhorov. – Moscow Russia: PAIMS, 1995. – 161 p.
- Fetal alcohol exposure and temporal vulnerability: effects of binge-like alcohol exposure on the developing rat hippocampus / D.J. Livy [et al.] // *Neurotoxicol Teratol.* – 2003. – V. 25. – P. 447-458.
- Fetal alcohol exposure and temporal vulnerability: regional differences in cell loss as a function of timing of binge-like alcohol exposure during brain development / S.E. Maier [et al.] // *Alcohol Clin Exp Res.* – 1999. – V. 23(4). – P.726-734.
- Fetal alcohol exposure leads to abnormal olfactory bulb development and impaired odor discrimination in adult mice / K.G. Akers [et al.] // *Mol Brain.* – 2011. – V. 4. – P. 29.
- Fetal alcohol exposure leads to abnormal olfactory bulb development and impaired odor discrimination in adult mice / K.G. Akers [et al.] // *Mol Brain.* – 2011. – V. 4. – P. 29.
- Fetal alcohol spectrum disorders / N. Dorrie [et al.] // *Eur Child Adolesc Psychiatry.* – 2014. – V. 23(10). – P. 863-875.
- Fetal alcohol syndrome related knowledge assessment and comparison in New Jersey health professional groups / M. Brimacombe [et al.] // *Can J Clin Pharmacol.* – 2008. – V. 15. – P. 57-65.
- Fetal oxidative stress mechanisms of neurodevelopmental deficits and exacerbation by ethanol and methamphetamine / P. Wells [et al.] // *Birth Defects Res C Embryo Today.* – 2016. – V. 108(2). – P. 108-130.
- Friocourt, G. Doublecortin functions of the extremities of growing neuronal processes. G. Friocourt, A. Koulakoff, P. Chafey // *Cereb. Cortex.* – 2003. – V. 13. – P. 620-626.
- Functional magnetic resonance imaging outcomes from a comprehensive magnetic resonance study of children with fetal alcohol spectrum disorders / S.J.Astley [et al.] // *J Neurodev Disord.* – 2009. – V. 1. – P. 61-80.
- GABRB3 gene expression increases upon ethanol exposure in human embryonic stem cells / M. Krishnamoorthy [et al.] // *J Recept Signal Transduct Res.* – 2011. – V. 31. – P. 206-213.
- Gerlai, R. Embryonic alcohol exposure: Towards the development of a zebrafish model of fetal alcohol spectrum disorders. R. Gerlai // *Dev Psychobiol.* 2015. V. 20. – P. 23-33.
- Glia and neurodevelopment: focus on fetal alcohol spectrum disorders / M. Guizzetti [et al.] // *Front Pediatr.* – 2014. – V. 2. – P. 123-130.
- Glial fibrillary acidic protein expression in rat brain and in radial glia culture is delayed by prenatal ethanol exposure / S. Vallés [et al.] // *Neurochemistry.* – 1996. – V. 67. – P. 2425-2433.
- Glutamate signaling and the fetal alcohol syndrome / J.W. Olney [et al.] // *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* – 2001. – V.7 (4). – P.267-275.
- Goodlett, C.R. Alcohol-induced Purkinje cell loss with a single binge exposure in neonatal rats: a stereological study of temporal windows of vulnerability /

- C.R. Goodlett, A.T. Eilers // *Alcohol Clin Exp Res.* – 1997. – V .21(4). – P.738-744.
- Goodlett, C.R. Binge neonatal alcohol intubations induce dose-dependent loss of Purkinje cells / C.R. Goodlett, A.D. Pearlman, K.R. Lundahl // *Neurotoxicol Teratol.* – 1998. – V .20(3). – P.285-292.
- Gordon, B.H.J. Exaggerated acetaldehyderesponse after ethanol administration during Pregnancy and Lactation in rats / B.H.J. Gordon, E. Baraona, H. Mijakava // *Alcoholism.* – 1985. – V. 1. – P. 17-22
- Grant, K.A. Cellular and behavioral neurobiology of alcohol: Receptor-mediated neuronal processes / K.A. Grant, D.M. Lovinger // *Clinical Neuroscience.* – 1995. – V. 3. – P. 155-164.
- Green, J.T. The effects of ethanol on the developing cerebellum and eyeblink classical conditioning / J.T. Green // *Cerebellum.* – 2004. – V. 3. – P. 178-187.
- Grummer, M.A. Maternal ethanol ingestion effects on fetal rat brain vitamin A as a model for fetal alcohol syndrome / M.A. Grummer, R.E. Langhough, R.D. Zachman // *Alcohol Clin Exp Res.* – 1993. – V. 17 – P. 592-597.
- Guerri, C. Acetaldehyde and alcohol levels in rat mothers and fetuses at different gestational stages / C. Guerri, K. Sanchis // *Alcoholism.* – 1984. – V. 2. – P. 95.
- Guerri, C. Alcohol, astroglia, and brain development / C. Guerri, J. Renau-Piqueras // *Mol Neurobiol.* – 1997. – V. 15. – P. 65-81.
- Guerri, C. Glia and fetal alcohol syndrome / C. Guerri, M. Pascual, J. Renau-Piqueras // *Neurotoxicology.* – 2001. – V. 22. – P. 593-599.
- Guerri, C. Synaptic membrane alterations in rats exposed to alcohol / C. Guerri // *Alcohol and Alcoholism.* – 1987. – V. 1. – P. 467-472.
- Haddad, R. Teratogenicity of binge drinking: comparative susceptibility of C57BL/6J and CBA/J mice to teratogenic effects of a single oral dose of ethanol / R. Haddad, R.M. Dumas // *Abstr. Ist. Congress Int. Soc. Biomed. Res. On Alcoholism.* – Munich: Germany, 1982. – Abstr. 65.
- Hamby-Mason, R. Catalase mediates acetaldehyde formation from ethanol in fetal antenatal rat brain / R. Hamby-Mason, J. Chen, S. Schenker // *Alcohol Clin. Exp. Res.* – 1997. – V. 21. – P. 1063-1072.
- Hamby-Mason, R. Catalase oxidation of ethanol to acetaldehyde in fetal brain may contribute to the fetotoxic effects of maternal alcohol consumption / R. Hamby-Mason, G.I. Henderson, S. Schenker // *Alcohol Clin.Exp.Res.* – 1995. – V. 19. – P. 48.
- Hamilton DA1, Magcalas CM2, Barto D. Moderate prenatal alcohol exposure and quantification of social behavior in adult rats. *J Vis Exp.* 2014 Dec 14;(94).
- Hammer, R.P. Morphological evidence for a delay of neuronal maturation in fetal alcohol exposure / R.P. Hammer, A.B. Sheibel // *Experimental Neurology.* – 1981. – V. 74. – P. 582-596.
- Hamre, K.M. The effect of the timing of ethanol exposure during the brain growth spurt on the number of cerebellar Purkinje and granule cell nuclear profiles / K.M. Hamre, J.R. West // *Alcohol Clin Exp Res.* – 1993. – V.17. – P.610-622.

- Hard, E. Effects of maternal ethanol consumption on the offspring sensor – motor development, ultrasonic vocalization, audiogenic immobility reaction and brain monoamine synthesis / E. Hard, J. Engel, K. Larsson // *Acta pharmacol et toxicol.* – 1985. – V. 5. – P. 354-363.
- Heaton, M.B. Amelioration of ethanol-induced neurotoxicity in the neonatal rat central nervous system by antioxidant therapy / M.B. Heaton, J.J. Mitchell, M. Paiva // *Alcohol Clin Exp Res.* – 2000. – V. 24. – P. 512-518.
- Hilakivi, L.A. Effects of prenatal alcohol exposure on behavior in the AA and ANA rat lines / L.A. Hilakivi, L. Tuomisto, I. Hilakivi // *Third congress Int. Soc. Biomed. Res. on Alcoholism: Abstracts.* – Pergamon Press, 1986. – Abstr. 121.
- Hu, Z.Y. In utero ethanol exposure decreases the biosynthesis of phosphatidylserine in rat pup cerebrum / Z.Y. Hu, G.Y. Sun, P.G. Rhodes // *Alcohol Clin Exp Res.* – 1992. – V. 16. – P. 432-435.
- Human mitochondrial aldehyde dehydrogenase: mRNA expression in different tissues using a specific probe isolated from a cDNA expression library / T. Braun [et al.] // *Alcohol and Alcoholism.* – 1987. – Suppl 1. – P. 161-165.
- Ieraci, A. Nicotinamide protects against ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in the developing mouse brain / A. Ieraci, D.G. Herrera // *PLoS Medicine.* – 2006. – V. 3. – P. 101.
- Impact of ethanol on the developing GABAergic system / R.N. Isayama [et al.] // *Anat Rec (Hoboken).* – 2009. – V. 292. – P. 1922-1939.
- Impaired cerebellar learning in children with prenatal alcohol exposure: a comparative study of eyeblink conditioning in children with ADHD and dyslexia / J.M. Coffin [et al.] // *Cortex.* – 2005. – V. 41. – P. 389-398.
- Increased Levels of Monoamine-Derived Potential Neurotoxins in Fetal Rat Brain Exposed to Ethanol / J. Mao [et al.] // *Neurochem Res.* – 2012. – V. 2 – P. 33-41.
- Insulin-like growth factor-I mitigates motor coordination deficits associated with neonatal alcohol exposure in rats / N.N. McGough [et al.] // *Neurotoxicology and Teratology.* – 2009. – V. 31. – P. 40-48.
- Inter-hemispheric functional connectivity disruption in children with prenatal alcohol exposure / J.R. Wozniak [et al.] // *Alcohol Clinical Experimental Research.* – 2011. – V. 35. – P. 849-861.
- Interhemispheric Functional Brain Connectivity in Neonates with Prenatal Alcohol Exposure: Preliminary Findings / K.A. Donald [et al.] // *Alcohol Clin Exp Res.* – 2016. – V. 40. – P. 113-121.
- Jones, T.B. Alcohol Use in Pregnancy: Insights in Screening and Intervention for the Clinician / T.B. Jones, B.A. Bailey, R.J. Sokol // *Clin Obstet Gynecol.* – 2013.
- Kable, J. Socio-cognitive habilitation using the math interactive learning experience program for alcohol-affected children / J.A. Kable, C.D. Coles, E. Taddeo // *Alcoholism: Clinical & Experimental Research.* – 2007. – V. 31. – P. 1425-1434.

- Key worker and parent support program: time 1 summative evaluation report: social program / S. Hume [et al]. – British Columbia, Canada: Ministry of Children and Family Development, 2008. – 12 p.
- Kodituwakku, P.W. Defining the behavioral phenotype in children with fetal alcohol spectrum disorders: a review / P.W. Kodituwakku // *Neurosci Biobehav Rev.* – 2007. – V. 31. – P. 192-201.
- Kodituwakku, P.W. Neurocognitive profile in children with fetal alcohol spectrum disorders / P.W. Kodituwakku // *Dev Disabil Res Rev.* – 2009. – V. 15. – P. 218-224.
- Lawrence, R.C. Selective effects of perinatal ethanol exposure in medial prefrontal cortex and nucleus accumbens / R.C. Lawrence, N.K. Otero, S.J. Kelly // *Neurotoxicol Teratol.* – 2012. – V. 34. – P. 128-135.
- Lebedeva, J. Inhibition of Cortical Activity and Apoptosis Caused by Ethanol in Neonatal Rats In Vivo / J. Lebedeva // *Cereb Cortex.* – 2015. [Epub ahead of print]
- Lee, J.H. Effects of ethanol and ipsapirone on the expression of genes encoding anti-apoptotic proteins and an antioxidant enzyme in ethanol-treated neurons / J.H. Lee, N.F. Tajuddin, M.J. Druse // *Brain Research.* – 2009. – V. 1249 – P. 54-60.
- Lemoine, P. The history of alcoholic fetopathies. 1997 / P. Lemoine // *J Popul Ther Clin Pharmacol.* – 2012. – V. 19. – P. 224-226.
- Leong, S.F. Regional enzyme development in rat brain. Enzymes of energy metabolism [Text] / S.F. Leong, J.B. Clark // *Biochem. J.* – 1984. – P. 139-145.
- Les enfants de parent alcoolique: Anomalie observe a propos de 127 cas / P. Lemoine [et al.] // *Ouest Med* – 1968. – V.21 – P. 476-482.
- Local and regional network function in behaviorally relevant cortical circuits of adult mice following postnatal alcohol exposure [Text] / D.A. Wilson // *Alcohol Clinical Experimental Research.* – 2011. – V. 35. – P. 1974-1984.
- Longitudinal MRI reveals impaired cortical thinning in children and adolescents prenatally exposed to alcohol / S. Treit [et al.] // *Hum Brain Mapp.* – 2014. – V. 35(9). – P. 4892-903.
- Long-term alterations to the brain transcriptome in a maternal voluntary consumption model of fetal alcohol spectrum disorders / M.L. Kleiber [et al.] // *Brain Res.* – 2012. – V. 1458. – P. 18-33.
- Long-term environmental enrichment leads to regional increases in neurotrophin levels in rat brain / B.R. Ickes [et al.] // *Exp Neurol.* – 2000. – V. 164. – P. 45-52.
- Lucci, L. Effects of ethanol, given during pregnancy on the offspring dopaminergic system / L. Lucci, V. Covelli, V.V. Petkov // *Pharmacol. Biochem. Behav.* – 1983. – V. 19. – P. 567-570.
- Lugo, J.N. Jr. Perinatal ethanol exposure alters met-enkephalin levels of male and female rats / J.N. Jr Lugo, M.A. Wilson, S.J. Kelly // *Neurotoxicol Teratol.* – 2006. – V. 28. – P. 238-244.

- Luo, J. Lithium-mediated protection against ethanol neurotoxicity / J. Luo // *Front Neurosci.* – 2010. – V. 28. – P. 4-41.
- Magnetic resonance imaging outcomes from a comprehensive magnetic resonance study of children with fetal alcohol spectrum disorders / S.J. Astley [et al] // *Alcohol Clin Exp Res.* – 2009. – V. 33. – P. 1-19.
- Magnetic resonance microscopy defines ethanol-induced brain abnormalities in prenatal mice: effects of acute insult on gestational day 8 / S.E. Parnell [et al.] // *Alcohol Clinical Experimental Research.* – 2009. – V. 33. – P. 1001-1011.
- Maier, S.E. Regional differences in cell loss associated with binge-like alcohol exposure during the first two trimesters equivalent in the rat / S.E. Maier, J.R. West // *Alcohol.* – 2001. – V. 23. – P. 49-57.
- Mattson, S.N. A review of the neurobehavioral deficits in children with fetal alcohol syndrome or prenatal exposure to alcohol / S.N. Mattson, E.P. Riley // *Alcohol Clin Exp Res.* – 1998. – V. 22. – P. 279-294.
- Mattson, S.N. Fetal Alcohol Syndrome: From Mechanism to Prevention: monograph / S.N. Matson, E.P. Riley. – Washington: CRC Press. 1996. – 148 p.
- Mattson, S.N. Neurobehavioral and Neuroanatomical Effects of Heavy Prenatal Exposure to Alcohol: monograph / S.N. Mattson, E.P. Riley. – Seattle, WA: University of Washington Press, 1997a. – 114 p.
- Mattson, S.N. Neurobehavioral and Neuroanatomical Effects of Heavy Prenatal Exposure to Alcohol: monograph / S.N. Mattson, E.P. Riley. – Seattle, WA: University of Washington Press, 1997b. – 114 p.
- Mattson, S.N. Neurobehavioral and Neuroanatomical Effects of Heavy Prenatal Exposure to Alcohol: monograph / S.N. Mattson, E.P. Riley. – Seattle, WA: University of Washington Press, 1997c. – 114 p.
- May, P.A. Estimating the prevalence of fetal alcohol syndrome. A summary / P.A. May, J.P. Gossage // *Alcohol Res Health.* – 2001. – V. 25. – P. 159-167.
- McClure, K.D. A Drosophila model for fetal alcohol syndrome disorders: role for the insulin pathway / K.D. McClure, R.L. French, U. Heberlein // *Dis Model Mech.* – 2011. – V. 4(3). – P. 335-346.
- Miller, M.W. Effect of prenatal exposure to ethanol on the cell cycle kinetics and growth fraction in the proliferative zones of fetal rat cerebral cortex / M.W. Miller, R.S. Nowakowski // *Alcohol Clin Exp Res.* – 1991. – V. 15. – P. 229-232.
- Miller, M.W. Effects of alcohol on the generation and migration of cerebral cortical neurons / M.W. Miller // *Science.* – 1986. – V. 233. – P. 1308-1311.
- Miller, M.W. Migration of Cortical Neurons is Altered by Gestational Exposure to Ethanol / M.W. Miller // *Alcoholism: Clinical and Experimental Research.* – 1993. – V. 17. – P. 304-314.
- Mitchell, K.T. Fetal alcohol syndrome: Practical suggestions and support for families and caregivers: monograph. – Washington, DC: National organization on Fetal Alcohol Syndrome, 2002. – 154 p.

- Moderate alcohol exposure compromises neural tube midline development in prenatal brain / F.C. Zhou [et al.] / *Brain Research Development Brain Research*. – 2003. – V. 144. – P. 43-55.
- Modifications of thalamo-cortical circuitry in rats prenatally exposed to ethanol / D. Minciacchi [et al.] // *Neuroreport*. – 1993. – V. 4. – P. 415-418.
- Morton, R.A. Third Trimester Equivalent Alcohol Exposure Reduces Modulation of Glutamatergic Synaptic Transmission by 5-HT1A Receptors in the Rat Hippocampal CA3 Region / R.A. Morton, C.F. Valenzuela // *Front Neurosci*. – 2016. – V. 10. – P. 266-271.
- MRI findings in children with school problems who had been exposed prenatally to alcohol / I. Autti-Rämö [et al.] // *Dev Med Child Neurol*. – 2002. – V. 44. – P. 98-106.
- Mullen, R.J. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates / R.J. Mullen C.R. Buck, A.M Smith // *Development*. – 1992. – Vol.116. – P.201-211.
- Naoi, M. Dopamine-derived salsolinol derivatives as endogenous monoamine oxidase inhibitors: occurrence, metabolism and function in human brains / M. Naoi , W. Maruyama , G.M. Nagy // *Neurotoxicology*. – 2004. – V. 25. – P. 193-204.
- Neural crest development in fetal alcohol syndrome / S. Smith [et al.] // *Birth Defects Res C Embryo Today*. – 2014. – V. 102. – P. 210-220.
- Neuroanatomic and neurochemical abnormalities in nonhuman primate infants exposed to weekly doses of ethanol during gestation / S.K. Clarren [et al.] // *Alcohol Clin Exp Res*. – 1990. – V. 14. – P. 674-683.
- Neurotoxic effects of alcohol and acetaldehyde during embryonic development / R.D. Lee [et al.] // *J. Toxicol. Environ. Health A*. – 2005. – V. 68. – P. 2147-2162.
- N-methylation of dopamine-derived 6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, (R)-salsolinol, in rat brains: in vivo microdialysis study / W. Maruyama [et al.] // *J Neurochem*. – 1992. – V. 59. – P. 395-400.
- O'Connor, M.J. Prenatal alcohol exposure and infant negative affect as precursors of depressive features in children / M.J. O'Connor // *Infant Ment Health J*. – 2001. – V. 22. – P. 291-299.
- Octanol antagonism of ethanol teratogenesis / S.Y. Chen [et al.] // *FASEB Journal*. – 2001 a. – V. 15 – P. 1649-1651.
- O'Leary, C. Alcohol consumption during pregnancy: the growing evidence / C. O'Leary, H. Leonard, J. Bourke // *Dev Med Child Neurol*. – 2012. – V. 54 P. 200-212.
- Overexpression of Nrf2 protects cerebral cortical neurons from ethanol-induced apoptotic death / M. Narasimhan [et al.] // *Mol Pharmacol*. – 2011. – Vol. 80. – P. 988-999.
- p 75 neurotrophin receptor signaling in the nervous system / Y. Hasegawa [et al.] // *Biotechnol Annu Rev*. – 2004. – V. 10. – P. 123-149.
- Parks, E.A. Environmental enrichment alters neurotrophin levels after fetal alcohol exposure in rats / E.A. Parks, A.P. McMechan, J.H. Hannigan // *Alcohol Clinical Experimental Research*. – 2008. – V. 32. – P. 1741-1751.

- Pattern of malformation in offspring of chronic alcoholic mothers / K.L. Jones [et al.] // *Lancet*. – 1973. – V. 1. – P. 1267-1271.
- Pauli, J. Acute exposure to alcohol during early postnatal life causes a deficit in the total number of cerebellar Purkinje cells in the rat / J. Pauli, P. Wilce, K.S. Bedi // *J Comp Neurol*. – 1995. – V. 360(3). – P. 506-512.
- Paxinos, G. *The Rat Brain in stereotaxic coordinates* / G.Paxinos, C. Watson. – Academic Press, Australia, 1986.
- Persistent impairment of hippocampal neurogenesis in young adult rats following early postnatal alcohol exposure / A.Y. Klintsova [et al.] // *Alcohol Clin Exp Res*. – 2007. – V. 31. – P. 2073-2082.
- Pirs, Je. *Gistohimija teoreticheskaia i prikladnaja* / Je Pirs // M.:IL. – 1962. – 962 p.
- Pottie, C.G. Daily stress, coping and well-being in parents of children with autism: a multilevel modeling approach / C.G. Pottie, K.M. Ingram // *J Fam Psychology*. – 2008. – V. 22. – P. 855-864.
- Prenatal alcohol exposure alters the patterns of facial asymmetry / C.P. Miki [et al.] // *CIFASD Consortium. Alcohol*. – 2010. – V. 44(7-8). – P. 649-657.
- Prenatal alcohol exposure retards the migration and development of serotonin neurons in fetal C57BL mice / F.C. Zhou [et al.] // *Brain Research Development Brain Research*. – 2001. – V. 126. – P. 147-155.
- Prenatal alcohol exposure: abnormalities in placental growth and fetal amino acid uptake in the rat / B.H. Gordon [et al.] // *Biol Neonate*. – 1985. – V. 47(2). – P. 113-119.
- Prenatal ethanol exposure impairs executive function in mice into adulthood / K. Marquardt [et al.] // *Alcohol Clin Exp Res*. – 2014. – V. 38. – P. 2962–2968,
- Prenatal ethanol exposure in rats decreases levels of complexin proteins in the frontal cortex / A.M. Barr [et al.] // *Alcohol Clin Exp Res*. – 2005. – V. 29. – P. 1915-1920.
- Prenatal exposure to ethanol alters lateral plasma membranes and gap junctions of newborn rat hepatocytes as revealed by freeze-fracture / J. Renau-Piqueras [et al.] // *J Submicrosc Cytol*. – 1987. – V. 19(3). – P. 397-404.
- Prenatal exposure to ethanol alters plasma membrane glycoproteins of astrocytes during development in primary culture as revealed by concanavalin A binding and 5'-nucleotidase activity / J Renau-Piqueras. [et al] // *Glia*. – 1992. – V. 5. – P. 65-74.
- Psychological distress among Plains Indian mothers with children referred to screening for Fetal Alcohol Spectrum Disorders / T. Parker [et al] // *Subst Abuse Treat Prev Policy*. – 2010. – V. 6. – P. 22.
- Ranbun, W. Dopamine, serotonin and acid metabolites in brain regions from the developing offspring of ethanol – treated rats / W.Ranbun, M.J. Druse // *J. Neurochem*. – 1985. – V. 1. – P. 57-62.
- RE-AIM evaluation of the Alcohol and Pregnancy Project: educational resources to inform health professionals about prenatal alcohol exposure and fetal alcohol spectrum disorder / J.M Payne. [et al.] // *Eval Health Prof*. – 2011. – V. 34. – P. 57-80.

- Reduced glutamate in white matter of male neonates exposed to alcohol in utero: a 1H-magnetic resonance spectroscopy study / F. Howells [et al] // *Metab Brain Dis.* – 2016. [Epub ahead of print]
- Regional brain volume reductions relate to facial dysmorphology and neurocognitive function in fetal alcohol spectrum disorders / F.F. Roussotte [et al] // *Hum Brain Mapp.* – 2012. – V. 33. – P. 920-930.
- Resveratrol restores Nrf2 level and prevents ethanol-induced toxic effects in the cerebellum of a rodent model of fetal alcohol spectrum disorders / A. Kumar [et al.] // *Mol Pharmacol.* – 2011. – V. 80. – P. 446-457.
- Reversal of ethanol toxicity in embryonic neurons with growth factors and estrogen / D.C. Barclay [et al.] // *Brain Research Bulletin.* – 2005. – V. 67. – P. 459-465,
- Reyes, E. Effects of the maternal consumption of alcohol on alcohol preference in rats / E. Reyes, K. Garcia, B.C. Jones // *Alcoholism.* – 1984. – V. 2. – P. 217.
- Roebuck, T.M. Interhemispheric transfer in children with heavy prenatal alcohol exposure / T.M. Roebuck, S.N. Mattson, E.P. Riley // *Alcohol Clinical Experimental Research.* – 2002. – V. 26. – P. 1863-1871.
- Rosman, N.P. An experimental study of fetal alcohol syndrome / N.P. Rosman, M.J. Malone // *Neurology.* – 1976. – V. 26. – P. 365-366.
- Rout, U.K. Liquid-diet with alcohol alters maternal, fetal and placental weights and the expression of molecules involved in integrin signaling in the fetal cerebral cortex / U.K. Rout, J.M. Dhossche // *Environ Research Public Health.* – 2010. – V. 7. – P. 4023-4036.
- Rudeen, P.K. The effects of alcohol exposure in utero on acetylcholinesterase, Na/K – ATP-ase and Ca – ATP-ase activities in six regions of rat brain / P.K. Rudeen, C. Guerri // *Alcohol and Alcoholism.* – 1985. – V. 4. – P. 417-425.
- Rufer, E.S. Adequacy of Maternal Iron Status Protects against Behavioral, Neuroanatomical, and Growth Deficits in Fetal Alcohol Spectrum Disorders / E.S. Rufer, T.D. Tran, M.M. Attridge // *PLoS One.* – 2012. – P/ 345-354.
- Saito, M. Effects of gangliosides on ethanol-induced neurodegeneration in the developing mouse brain / M. Saito, R.F. Mao, R. Wang // *Alcohol Clinical Experimental Research.* – 2007. – V. 31. – P. 665-674.
- Sakata-Haga, H. Effects of ethanol on the development of circadian time keeping system / H. Sakata-Haga, Y. Fukui // *Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai Zasshi.* – 2007. – V. 42. – P. 67-75.
- Samorajski, T. Fetal ethanol exposure: a morphometric analysis of myelination in the optic nerve / T. Samorajski, F. Lancaster, R.C. Wiggins // *Development Neuroscience.* – 1986. – V. 4. – P. 369-374.
- Sari, Y. Activity-dependent neurotrophic factor-derived peptide prevents alcohol-induced apoptosis, in part, through Bcl2 and c-Jun N-terminal kinase signaling pathways in fetal brain of C57BL/6 mouse / Y. Sari, J.M. Weedman, S. Ge // *Neuroscience.* – 2012. – V. 202. – P. 465-473.

- Sari, Y. Neuroprotective peptide ADNF-9 in fetal brain of C57BL/6 mice exposed prenatally to alcohol / Y. Sari, Z.M. Segu, D. Isailovic // *Biomedical Science*. – 2011. – V. 18. – P. 77.
- Sato, I. Developmental changes in enzyme activities and in morphology of rat cortex mitochondria / Sato I., Konishi K., Mikami A.. // *Okajimas Folia Anat Jpn*. – 2000. – V. 76 – P. 353-361.
- Sawada, K. Hippocampal complexin proteins and cognitive dysfunction in schizophrenia / K. Sawada, A.M. Barr, M. Nakamura // *General Psychiatry*. – 2005. – V. 62. – P. 263-272.
- Schambra, U.B. Development of neurotransmitter systems in the mouse embryo following acute ethanol exposure: a histological and immunocytochemical study / U.B. Schambra, J.M. Lauder, P. Petrusz // *Development Neuroscience*. – 1990. – V. 8. – P. 507-522.
- Schneider, R.D. Adolescent Choline Supplementation Attenuates Working Memory Deficits in Rats Exposed to Alcohol During the Third Trimester Equivalent / R.D. Schneider, J.D. Thomas // *Alcohol Clin Exp Res*. – 2016. – V. 40(4). – P. 897-905.
- Servais, L. Purkinje cell dysfunction and alteration of long-term synaptic plasticity in fetal alcohol syndrome / L. Servais, R. Hourez, B. Bearzatto // *Academy Science U S A*. – 2007. – V. 104. – P. 9858-9863.
- Shabanov, P.D. The effect of ethanol exposure in pregnancy on maturation of monoaminergic systems in the developing rat brain / P.D. Shabanov, A.A. Lebedev, E.R. Bychkov // *Rossiyski Zhurnal Fiziologii Im I M Sechenova*. – 2012. – V. 98. – P. 202-211.
- Shen, Y. Dihydropyridinone as a novel anti-alcohol intoxication medication / Y. Shen, A.K. Lindemeyer, R.W. Olsen // *Neuroscience*. – 2012. – V. 32. – P. 390-401.
- Shetty, A. Alterations in neuronal development in the substantia nigra pars compacta following in utero ethanol exposure / A. Shetty, R. Burrows, D. Phillips // *Neuroscience*. – 1993. – V. 52. – P. 311-322.
- Shirasaka, T. Promising therapy of neural stem cell transplantation for FASD model--neural network reconstruction and behavior recovery / T. Shirasaka, W. Ukai, T. Yoshinaga // *Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai Zasshi*. – 2011. – V. 46. – P. 576-584.
- Shoemaker, W.J. Effects of prenatal alcohol exposure on amine and peptide neurotransmitter systems / W.J. Shoemaker, J. Baetge, R. Azad // *Drug and Hormon*. – 1983. – V. 24. – P. 130 -139.
- Shushpanova, T.V. Synaptogenesis and formation of benzodiazepine receptors in the human brain in conditions of prenatal alcoholization / T.V. Shushpanova, S. Korsakova, A.V. Solonskiĭ // *Nevrology Psikhiatry Imeny Serpuchova*. – 2012. – V. 112. – P. 60-67.
- Sidhu, V.K. Effects of docosahexaenoic acid on mouse brain synaptic plasma membrane proteome analyzed by mass spectrometry and (16) O/ (18) O labeling / V.K. Sidhu, B.X. Huang, H.Y. Kim // *Proteome Research*. – 2011. – V. 10. – P. 5472-5480.

- Siebert, J.R. Holoprosencephaly in a fetal macaque (*Macaca nemestrina*) following weekly exposure to ethanol / J.R. Siebert, S.J. Astley, S.K. Clarren // *Teratology*. – 1991. – V. 44. – P. 29-36.
- Siler-Marsiglio, K.I. Effects of acute ethanol exposure on regulatory mechanisms of Bcl-2-associated apoptosis promoter, bad, in neonatal rat cerebellum: differential effects during vulnerable and resistant developmental periods / K.I. Siler-Marsiglio, I. Madorsky, Q. Pan // *Alcohol Clinical Experimental Research*. – 2006. – V. 30. – P. 103-108.
- Siler-Marsiglio, K.I. Functional mechanisms of apoptosis-related proteins in neonatal rat cerebellum are differentially influenced by ethanol at postnatal days 4 and 7 / K.I. Siler-Marsiglio, M. Paiva, I. Madorsky // *Neuroscience Research*. – 2005. – V. 81. – P. 632-643.
- si-RNA inhibition of brain insulin or insulin-like growth factor receptors causes developmental cerebellar abnormalities: relevance to fetal alcohol spectrum disorder / S.M. de la Monte [et al.] // *Mol Brain*. – 2011. – V. 4. – P. 13.
- Skorput, A.G. Chronic Gestational Exposure to Ethanol Leads to Enduring Aberrances in Cortical Form and Function in the Medial Prefrontal Cortex / A.G. Skorput, H.H. Yeh // *Alcohol Clin Exp Res*. – 2016. – V. 40(7). – P. 1479-1488.
- Smith, A.M. Lobeline attenuates neonatal ethanol-mediated changes in hyperactivity and dopamine transporter function in the prefrontal cortex in rats / A.M. Smith, K.A. Wellmann, T.M. Lundblad // *Neuroscience*. – 2012. – V. 29. – P. 245-254.
- Social Perspective Taking and Empathy in Children with Fetal Alcohol Spectrum Disorders / N. Brown [et al.] // *J Int Neuropsychol Soc*. – 2015. – V. 21(1). – P. 74-84.
- Social Perspective Taking and Empathy in Children with Fetal Alcohol Spectrum Disorders / S. Stevens [et al.] // *J Int Neuropsychol Soc*. – 2015. – V. 21. – P. 74-84
- Specific teratogenic effect of ethanol on brain dopaminergic system / L. Lucci [et al.] // *Alcoholism*. – 1984. – V. 2. – P. 310.
- Spottiswoode, B.S. Diffusion tensor imaging of the cerebellum and eyeblink conditioning in fetal alcohol spectrum disorder / B.S. Spottiswoode, E.M. Meintjes, A.W. Anderson // *Alcohol Clinical Experimental Research*. – 2011. – V. 35. – P. 2174-2183.
- Sreenathan, R.N. Teratogenic effects of acetaldehyde in the rat / R.N. Sreenathan, R. Padmanabhan, S. Singh // *Drug and Alcohol Dependence*. – 1982. – V. 9. – P. 339-350.
- Sreenathan, R.N. Teratogenic effects of acetaldehyde in the rat / R.N. Sreenathan, R. Padmanabhan, S. Singh // *Drug and Alcohol Dependence*. – 1982. – V. 9. – P. 339-350.
- Stevens, S.A. Social problem solving in children with fetal alcohol spectrum disorders / S.A. Stevens, D. Majors, J. Rovet // *Popular Ther Clinical Pharmacology*. – 2012. – V. 19. – P. 99-110.

- Stimulants, neuroleptics, and children's friendship training for children with fetal alcohol spectrum disorders / F. Frankel [et al.] // *J Child Adolesc Psychopharmacol.* – 2006. – V. 16. – P.777-789.
- Streissguth, A.P. A test-retest study of intelligence in patients with fetal alcohol syndrome: implications for care / A.P. Streissguth, S.P. Randels, D.F. Smith // *American Academy Child Adolescend Psychiatry.* – 1991. – V. 30. – P. 584-587.
- Suzuki, K. Adult fetal alcohol syndrome (FAS) with various neuropsychiatric symptoms / K. Suzuki // *Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai Zasshi.* – 2004. – V. 39. – P. 474-481.
- Swayze, V.W. Magnetic Resonance Imaging of Brain Anomalies in Fetal Alcohol Syndrome / V.W. Swayze, V.P. Johnson, J.W. Hanson // *Pediatrics.* – 1997. – V. 99. – P. 232-240.
- Tangsermkijesakul, A. Fetal Alcohol Syndrome in Sudden Unexpected Death in Infancy: A Case Report in Medicolegal Autopsy / A. Tangsermkijesakul // *Am J Forensic Med Pathol.* – 2016. – V. 37. – P. 379-413.
- Taranukhin, A.G. Lethality of taurine and alcohol coadministration in mice / A.G. Taranukhin, P. Saransaari, S.S. Oja // *Adv Exp Med Biol.* – 2013. – Vol.776. – P.29-38.
- Taurin reduces caspase-8 and caspase-9 expression induced by ischemia in the mouse hypothalamic nuclei / A.G. Taranukhin [et al] // *Amino Acids.* – 2008. – V. 34(1). – P. 169-174.
- Terasaki, L.S. Effects of Moderate Prenatal Alcohol Exposure during Early Gestation in Rats on Inflammation across the Maternal-Fetal-Immune Interface and Later-Life Immune Function in the Offspring / L.S. Terasaki, J.M. Schwarz // *J Neuroimmune Pharmacol.* 2016. [Epub ahead of print]
- Tewari, S. Alterations in brain polyribosomal RNA translation and lymphocyte proliferation in prenatal ethanol-exposed rats / S. Tewari, M. Diano, R. Bera // *Alcohol Clinical Experimental Research.* – 1992. – V. 16. – P. 436-442.
- Thadani, P.V. Effects of maternal ethanol ingestions on amine uptake into sinaptosomes of fetal and neonatal rat brain / P.V. Thadani, C. Lau, T.A. Slotkin // *Pharmacology Experimental Therapy.* – 1977. – V. 200. – P. 292-297.
- The effectiveness of a community-based intervention program for women at-risk for giving birth to a child with Fetal Alcohol Spectrum Disorder (FASD) / C. Rasmussen [et al.] // *Community Ment Health J.* – 2012. – V. 48. – P. 12-21.
- The expression of antioxidant enzymes in a mouse model of fetal alcohol syndrome / N. Drever [et al.] // *Am J Obstet Gynecol.* – 2012. – V. 206. – P. 19-22.
- The GABAergic systems of the dentate gyrus after withdrawal from chronic alcohol consumption: effects of intracerebral grating and putitative neuroprotective agents / A. Cadete-Leite [et al.] // *Alcohol Alcohol.* – 1997. – V. 32(4). – P.471-484.
- The hormonal effects of alcohol use on the mother and fetus / K. Gabriel [et al.] // *Alcohol Health Res World.* – 1998. – V. 22(3). – P. 170-177.

- The impact of fetal alcohol spectrum disorders on families: evaluation of a family intervention program / L.S. Leenaars [et al.] // *Community Ment Health J.* – 2012. – V. 48. – P. 431-435.
- The Impact of Prenatal Ethanol Exposure on Neuroanatomical and Behavioral Development in Mice / C. Abbott [et al.] // *Alcohol Clin Exp Res.* – 2016. – V. 40. – P. 122-133.
- The investigation of the prenatal and postnatal alcohol exposure-induced neurodegeneration in rat brain: protection by betaine and/or omega-3 / O. Kusat [et al.] // *Childs Nerv Syst.* – 2016. – V. 32(3). – P. 467-474.
- The Lililwan Project: study protocol for a population-based active case ascertainment study of the prevalence of fetal alcohol spectrum disorders (FASD) in remote Australian Aboriginal communities / J. P. Fitzpatrick [et al.] // *BMJ Open.* – 2012. – V. 2. – P. 142-144.
- The spectrum of hemispherical cortex lesions in intrauterine alcoholic intoxication / R.T. Chikhladze [et al.] // *Georgian Med News.* – 2011. – V. 192. – P. 81.
- Thomas, J.D. Prenatal choline supplementation mitigates behavioral alterations associated with prenatal alcohol exposure in rats / J.D. Thomas, N.M. Idrus, B.R. Monk // *Birth Defects Research And Clinical Molecular Teratology.* – 2010. – V. 88. – P. 827-837.
- Toesca, A. Overexpression of the p75 neurotrophin receptor in the sensori-motor cortex of rats exposed to ethanol during early postnatal life / A. Toesca, S. Giannetti, A. Granato // *Neurosci Letter.* – 2003. – V. 342. – P. 89-92.
- Training needs of healthcare providers related to Centers for Disease Control and Prevention core competencies for fetal alcohol spectrum disorders [Text] / C. Brems // *J Popul Ther Clin Pharmacol.* – 2010. – V. 17. – P. 405-417.
- Tran, T.D. Critical periods for ethanol-induced cell loss in the hippocampal formation / T.D. Tran, S.J. Kelly // *Neurotoxicology Teratology.* – 2003. – V. 25. – P. 519-528.
- Tran, T.D. Vitamin E does not protect against neonatal ethanol-induced cerebellar damage or deficits in eyeblink classical conditioning in rats / T.D. Tran, H.D. Jackson, K.H. Horn // *Alcohol Clinical Experimental Research.* – 2005. – V. 29. – P. 117-129.
- Transient activation of microglia following acute alcohol exposure in developing mouse neocortex is primarily driven by BAX-dependent neurodegeneration // K. Ahlers [et al.] // *Glia.* – 2015. – V. 63. – P. 1694-713
- Trophic and proliferative perturbations of in vivo/in vitro cephalic neural crest cells after ethanol exposure are prevented by neurotrophin 3 / M. B. Jaurena [et al.] // *Neurotoxicol Teratol.* – 2011. – V. 33. – P. 422-430.
- Tsai, G. The role of glutamatergic neurotransmission in the pathophysiology of alcoholism / G. Tsai, J.T. Coyle // *Annual Review of Medicine.* – 1998. – V. 49. – P. 173-184.
- Two brothers with macrocephaly, progressive cerebral atrophy and abnormal white matter, severe mental retardation, and Lennox-Gastaut spectrum type epilepsy: an inherited encephalopathy of childhood / P. Nokelainen [et al.] // *Am J Med Genet.* – 2001. – V. 103. – P. 198-206.

- Ujjwal, K. Developmental changes in aldehyde dehydrogenases from mouse tissues / K.Ujjwal, S.H. Roger // *Alcohol Alcohol.* – 1988. – V. 23. – № 3. – P. 67.
- Ullah, N. Protective effect of pyruvate against ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in the developing rat brain / N. Ullah, M.I. Naseer, I. Ullah // *Neuropharmacology.* – 2011. – V. 61. – P. 1248-1255.
- Ullan, I. Neuroprotection with metformin and thymoquinone against ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in prenatal rat cortical neurons / I. Ullan, H.Y. Lee, M.O. Kim // *BMC Neurosci.* – 2012. – V. 14 – P. 123-125.
- Ullrich, K. A contribution to the postnatal enzymatic state of maturity of gyrus hippocampi in the embryofetal alcohol syndrome of the rat / K. Ullrich, K. Dietzmen // *Experimental Pathology.* – 1980. – V. 18. – P. 170-174.
- Universal prevention is associated with lower prevalence of fetal alcohol spectrum disorders in Northern Cape, South Africa: a multicentre before-after study / M.F. Chersich [et al.] // *Alcohol Alcohol.* – 2012. – V. 47. – P. 67-74.
- Uzbekov, M.G. Activity of Zn-, Cu-containing superoxide dismutase in the brain tissue of rats with fetal alcohol syndrome / M.G. Uzbekov, I.K. Karpachevskaja // *Eksperimental Biology Medicine.* – 1991. – V. 111. – P. 354-355.
- Vangipuram, S.D. Ethanol alters cell fate of fetal human brain-derived stem and progenitor cells / S.D. Vangipuram, W.D. Lyman // *Alcohol Clinical Experimental Research.* – 2010. – V. 34. – P. 1574-1583.
- Vellema, M. Evaluating the predictive value of doublecortin as a marker for adult neurogenesis in canaries / M. Vellema, M. Hertel, S. Urbanus // *Comp. Neurol.* – 2014. – V. 522. – P. 1299-1315.
- Vingan, R.D. Cerebral metabolic alterations in rats following prenatal alcohol exposure: a deoxyglucose study / R.D. Vingan, D.L. Dow – Edvards, E. Rilley // *Alcoholism.* – 1986. – V. 10. – P. 22-26.
- Wainright, P. Moderate prenatal ethanol exposure interacts with strain in affecting brain development in BALB/c and C57BL/6 mice / P. Wainright, M. Gagnon // *Experimental Neurology.* – 1985. – V. 88. – P. 84-94.
- Wang, G. Prenatal alcohol exposure triggers ceramide-induced apoptosis in neural crest-derived tissues concurrent with defective cranial development / G. Wang, E. Bieberich // *Cell Death Dis.* – 2010. – V. 1. – P. 46.
- Weinberg, J. Effects of ethanol and maternal nutritional status on fetal development / J. Weinberg // *Alcohol Clinical Experimental Research.* – 1985. – V. 9. – P. 49-55.
- Werts, R.L. Inappropriate feeding behaviors and dietary intakes in children with fetal alcohol spectrum disorder or probable prenatal alcohol exposure / R.L. Werts, S. Van Calcar, D. Wargowski // *Alcohol Clin Exp Res.* – 2014. – V. 38(3). – P. 871-880.
- West, J.R. Acute and long-term changes in the cerebellum following developmental exposure to ethanol / J.R. West // *Alcohol Alcohol Suppl.* – 1993. – Vol.2. – P.199-202.

- West, J.R. Alcohol and Brain Development: monograph. – New York: Oxford University Press, 1986. – 122 p.
- Wilhelm, C.J. Fetal Alcohol Spectrum Disorders: An Overview from the Glia Perspective / C.J. Wilhelm, M. Guizzetti // *Front Integr Neurosci.* – 2016. – V. 11. – P. 65-72.
- Wilkemeyer, M.F. Differential effects of ethanol antagonism and neuroprotection in peptide fragment NAPVSIPQ prevention of ethanol-induced developmental toxicity / M.F. Wilkemeyer, S.Y. Chen, C.E. Menkari // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* – 2003. – V. 100. – P. 8543-8548.
- Williams, S. Alcohol's possible covert role: brain dysfunction, paraphilias, and sexually aggressive behaviors / S. Williams // *Sex Abuse.* – 1999. – V. 11. – P. 147-158.
- Woodson, P. Effects of maternal alcohol consumption on fetal brain cell number and cell size / P. Woodson, S. Ritchey // *Nutr. Repts. Int.* – 1979. – V. 20. – P. 225-228.
- Xu, Y. Effect of folic acid on prenatal alcohol-induced modification of brain proteome in mice / Y. Xu, Y. Tang, Y. Li // *Brain.* – 2008. – V. 99. – P. 455-461.
- Yang, F. Endoplasmic Reticulum Stress and Ethanol Neurotoxicity // F. Yang, J. Luo // *J. Biomolecules.* – 2015. – V. 4. – P. 2538-53.
- Zajac, C. Effect of maternal alcohol ingestion on neuron development in midbrain of the fetal mouse / C. Zajac // *Alcoholism: Clinical and Experimental Research.* – 1987. – V. 11. – P. 214-224.
- Zeisel, S.H. The supply of choline is important for fetal progenitor cells / S.H. Zeisel // *Semin Cell Development Biology.* – 2011. – V. 22. – P. 624-628.
- Zhou, F.C. Peptidergic agonists of activity-dependent neurotrophic factor protect against prenatal alcohol-induced neural tube defects and serotonin neuron loss / F.C. Zhou, Y. Fang, C. Goodlett // *Alcoholism: Clinical and Experimental Research.* – 2008. – V. 32. – P. 1361-1371.

Материалы и методы

Объектом исследования служили 18 беспородных белых крыс-самок массой 212 ± 29 г и полученное от них потомство. Опытную группу составили 48 крысят, полученных от 9 матерей, на протяжении всей беременности (от дня обнаружения сперматозоидов во влагалищных мазках до родов) получавших 15% раствор этанола в качестве единственного источника питья. Среднее потребление алкоголя беременными самками составляло $3,64 \pm 2,2$ г/кг/сутки. В качестве контроля использовали 48 крысят, рождённых от 9 матерей, которые получали эквивалентное количество воды.

Самок и самцов для получения потомства получали из вивария Гродненского государственного медицинского университета. Их содержали в стандартных условиях вивария. Соблюдались правила гуманного обращения с животными [Каркищенко, 2010]. На выполнение данных исследований получено разрешение этического комитета Гродненского государственного медицинского университета (протокол No1, 11.03.2014). Самок опытной и контрольной групп брали примерно одного возраста, из одной популяции.

Первым днём беременности считался день обнаружения сперматозоидов во влагалищных мазках. Самцов к самкам подсаживали после 18.00 из расчёта 1 самец на 3 самки, а выявление беременности проводили на следующий день до 9.00 утра. Все беременные самки, как и родившиеся от них опытное и контрольное потомство, находились под пристальным наблюдением, в одинаковых условиях вивария.

Учитывая поэтапное становление морфофункциональных свойств коры головного мозга у крысят, для исследования использовали потомство разных возрастных групп: 2-суточные, 5-суточные, (ранний постнатальный период), 10-суточные, 20-суточные (пубертатный период), 45-суточные и 90-суточные животные (половозрелый период). Крысят контрольных и опытных групп, достигших этого возраста, выводили из опыта быстрой декапитацией. У экспериментальных животных сразу же забирали материал головного мозга. Кусочки переднего отдела коры больших полушарий тщательно осматривали для выявления каких-либо изменений и подвергали дальнейшим гистологическим, гистохимическим и электронно-микроскопическим исследованиям с целью изучения становления структуры и метаболизма органа.

Биометрическое исследование. Измерялась масса тела животных, масса мозга и соотношения массы мозга к массе тела у контрольных и опытных животных.

Гистологическое исследование. Кусочки больших полушарий головного мозга сразу после забора фиксировали в жидкости Карнуа, обезвоживали в спиртах восходящей концентрации и просветляли в ксилоле, заключали в парафин и с помощью микротомы (Leica RM2125, Германия) изготавливали парафиновые срезы толщиной 7 мкм, Серийные парафиновые срезы окрашивали 0,1% толудиновым синим по методу Ниссля и гематоксилин-эозином.

Расположение париетальной коры в гистологических препаратах мозга крыс определяли с помощью стереотаксического атласа [Рахинос, 1998].

В популяции нейронов 5-го слоя коры мозга на препаратах, окрашенных по методу Ниссля, проводили анализ типов клеток по степени хромофилии цитоплазмы (интенсивности окраски цитоплазмы нейронов): нормохромные (умеренное окрашивание цитоплазмы), гипохромные (слабое окрашивание), гиперхромные нейроны (интенсивное окрашивание) и клеточки-тени (очень слабое окрашивание) и подсчитывали их количество на единице площади.

Для изучения размеров и формы перикарионов нейронов измеряли минимальный и максимальный радиусы, периметр, площадь, форм-фактор и фактор элонгации.

Электронно-микроскопическое исследование. Лезвием вырезали нужные участки коры и помещали их в 1% осмиевый фиксатор на буфере Миллонига (рН = 7,4) на 2 часа при температуре +4° С. Далее их промывали в смеси буфера Миллонига (20 мл) и сахарозы (900 мг), обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации, смеси спирта и ацетона и ацетоне, проводили через смесь смол (аралдит М + аралдит Н + дибутилфталат + ДМР-30) и ацетона и заключали в эту заливочную смесь смол. Полутонкие срезы (толщиной около 0,35 мкм) изготавливали на ультрамикротоме MT-7000 (RMC, США), окрашивали метиленовым синим и вырезали лезвием необходимые для изучения участки внутреннего пирамидного слоя. Ультратонкие срезы (толщиной около 35 нм) изготавливали на том же ультрамикротоме, собирали на опорные сеточки, контрастировали ацетатом урана и цитратом свинца. Для этого сеточки со срезами опускали в каплю уранилацетата и выдерживали 20 минут в темноте при комнатной температуре, затем промывали в 3-х порциях бидистиллированной воды по 5 секунд и контрастировали цитратом свинца в течение 8 минут, промывали в 3-х порциях бидистиллированной воды по 5 секунд [Боголепов, 1976].

Полученные препараты изучали в электронном микроскопе JEM-1011 (JEOL, Япония), фотографировали цифровой камерой Olympus MegaView III (Olympus Soft Imaging Solutions, Германия). Ультраструктурную морфометрию проводили с помощью программы для обработки изображения Image Warp (Bit Flow, США), обводя курсором на мониторе компьютера митохондрии, комплекс Гольджи, гранулярную эндоплазматическую сеть, рибосомы и лизосомы, оценивая их количество, индивидуальную, относительную площадь в цитоплазме, периметр и форму.

Гистохимическое исследование. Образцы больших полушарий головного мозга замораживали и хранили в жидком азоте. В криостате Leica CM 1850 (Leica Microsystems GmbH, Германия) при температуре -12°С готовили серийные фронтальные срезы переднего отдела больших полушарий мозга толщиной 10 мкм, монтировали на предметные стекла и подсушивали на протяжении 1 часа при комнатной температуре. Для изучения особенностей метаболизма нейронов криостатные срезы обрабатывали на выявление активности оксидоредуктаз, связанных с циклом Кребса – сукцинатдегидроге-

назы (СДГ, сукцинат: акцептор – оксидоредуктаза; КФ 1.3.99.1; по Нахласу и др., 1957); с гликолизом – лактатдегидрогеназы (ЛДГ, L-лактат: НАД-оксидоредуктаза; КФ 1.1.1.27; по Гесс, Скарпелли, Пирсу, 1958); с транспортом электронов – НАДН-дегидрогеназы (НАДН-ДГ, НАДН: акцептор – оксидоредуктаза; КФ 1.6.99.3; по Нахласу, Уокеру и Зелигману, 1958); с пентозофосфатным путем – глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы (Г-6-Ф-ДГ, D-глюкозо-6-фосфат: НАДФ-оксидоредуктаза; КФ 1.1.1.49; по Гесс, Скарпелли, Пирсу, 1958); НАДФН-дегидрогеназы (НАДФН-ДГ, НАДФН₂: НАД-оксидоредуктаза; КФ 1.6.1.1; по Гесс, Скарпелли, Пирсу, 1958); кислой фосфатазы – маркерного фермента лизосом (КФ, фосфогидролаза моноэфиров ортофосфорной кислоты; КФ 3.1.3.2; по Гомори, 1950) [Пирс, 1960]. Кроме того, в парафиновых срезах выявляли содержание рибонуклеопротеинов (РНП) по Эйнарсону.

Окрашенные срезы промывали в дистиллированной воде (после окраски на выявление активности дегидрогеназ срезы далее фиксировали в течение 30 минут в 10% нейтральном формалине), обезживали в спиртах возрастающей концентрации, просветляли в ксилоле и заключали в полистирол. После реакции на кислую фосфатазу срезы подсушивали и заключали в теплый глицерин-желатин.

Количественную оценку активности СДГ, ЛДГ, НАДН-ДГ, НАДФН-ДГ, Г-6-Ф-ДГ и КФ проводили, определяя оптическую плотность полученного осадка хромогена в цитоплазме нейронов, на максимуме поглощения окрашенных продуктов реакций. Относительную активность ферментов или содержание вещества выражали в единицах оптической плотности.

Иммуногистохимическое исследование. От каждой самки брали по одному крысенку по достижении ими 5, 10 и 20 суток после рождения и декапитировали. Для получения сопоставимых результатов от всех животных образцы фронтальной коры головного мозга обрабатывали параллельно и в одинаковых условиях. Их фиксировали в цинк-формалине при +4°C (на ночь), а затем заключали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 5 мкм готовили с помощью микротом (LeicaRM 2125 RTS, Германия) и монтировали на предметные стекла. Для иммуногистохимического выявления DCX применяли первичные поликлональные кроличьи антитела фирмы Abcam (Великобритания) ab.18723, для NeuN – ab.128886, для выявления синаптофизина (СФ) применяли первичные поликлональные кроличьи антитела фирмы повах (в разведении 1:400, при +4°C, 20 часов, во влажной камере). Связавшиеся первичные антитела детектировали с помощью набора EXPOSE Rabbit specific HRP/DAB detection IHC kit ab.80437Abcam (Великобритания), а для СФ – с помощью набора EXPOSE Rabbit specific HRP/DAB detection IHC kit повах. Соседние срезы окрашивали 0,1% раствором тионина по методу Ниссля. В пятом слое фронтальной коры измеряли оптическую плотность осадка хромогена в иммунопозитивных по DCX, NeuN и СФ нейронах и нейропиле.

Изучение гистологических препаратов, их микрофотографирование, морфометрию и цитофотометрию проводили при разных увеличениях микроскопа Axioskop 2 plus (Zeiss, Германия), цифровой видеокамеры Leica DFC 320 (Leica Microsystems GmbH, Германия) и программы компьютерного ана-

лиза изображения Image Warp (Bit Flow, США). В каждой экспериментальной группе оценивали 120-150 нейронов, что обеспечивало достаточный объем выборки для последующего статистического анализа.

Статистическая обработка материала. Для предотвращения систематической ошибки измерений образцы мозга от сравниваемых контрольных и опытных животных обрабатывали параллельно в одинаковых условиях. Погрешность измерений составила менее 5%.

В результате морфометрических и цитофотометрических исследований получены количественные непрерывные данные. Их обрабатывали с помощью лицензионной компьютерной программы Statistica 6.0 для Windows (StatSoft, Inc., США, серийный номер 31415926535897) с применением описательной статистики. Для каждого показателя определяли значение медианы (Me) и интерквартильного диапазона (IQR) [Лакин, 1990].

Так как в эксперименте использовали малые выборки, которые не всегда имели нормальное распределение, анализ проводили методами непараметрической статистики [Батин, 2008]. Объекты исследования набирали в группы независимо друг от друга, поэтому сравнение групп по одному признаку проводили с помощью критерия Манна-Уитни для независимых выборок (Mann-Whitney U-test) [Реброва, 2003]. Различия между группами считали статистически значимыми, если вероятность ошибочной оценки не превышала 5% ($p < 0,05$) [Рокицкий, 1967].

Таблица 1. – Толщина коры мозга крысят (Me (LQ; UQ), мкм.

Группа	2-е сутки	5-е сутки	10-е сутки	20-е сутки	45-е сутки	90-е сутки
Цингулятная кора						
контроль	303(291;309)	481(455;547)	725(693;736)	986(964;1032)	986(977;1059)	971(941;1002)
алкоголь	422(385;477)*	530(448;548)	720(696;762)	918(913;943)	766(707;970)*	1005(934;1037)
Фронтальная кора						
контроль	538 (532;567)	695 (679;711)	1156 (1131;1182)	1277 (1251;1307)	1465 (1444;1473)	1645 (1584;1654)
алкоголь	809* (802;823)	799* (796;880)	1020* (1016;1024)	1257 (1256;1262)	1445 (1379;1488)	1249* (1225;1262)
Париетальная кора						
контроль	738 (679;793)	795 (725;806)	1175 (1094;1197)	1340 (1324;1354)	1513 (1474;1520)	1670 (1634;1692)
алкоголь	879* (876;885)	869* (860;876)	1026* (1015;1036)	1316 (1311;1325)	1512 (1457;1526)	1270* (1248;1288)

Примечание – * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем

Таблица 2. – Количество нейронов в поле зрения в коре мозга крысят (Me (LQ; UQ, на площадь 1 мм²)

Группа	2-е сутки	5-е сутки	10-е сутки	20-е сутки	45-е сутки	90-е сутки
Цингулятная кора						
контроль	17223 (17223;17223)	10293 (10091;10360)	8275 (8208;8477)	7400 (7266;7400)	6122 (5920;6324)	5920 (5786;6055)
алкоголь	17088 (16684;17223)	8678 (8477;8746)*	7534 (7534;7669)*	6189 (6055;6324)*	4911 (4575;5113)*	4238 (4171;4306)*
Фронтальная кора						
контроль	16819 (16684;17223)	9553 (9553;9688)	7804 (7669;7804)	6122 (6055;6189)	5180 (4978;5247)	4575 (4306;4575)
алкоголь	13993 (13724;14263)*	8880 (8880;9015)*	6122 (6055;6728)*	5382 (5247;5382)*	3767 (3767;3902)*	3229 (3095;3229)*
Париетальная кора						
контроль	17223 (16884;17223)	9553 (9419;9688)	7535 (7535;7669)	6593 (6458;6593)	5113 (5113;5247)	4575 (4440;4575)
алкоголь	13724 (13724;13993)*	8880 (8746;9015)*	6122 (5920;6458)*	4978 (4978;5113)*	3767 (3633;3900)*	3364 (3095;3364)*

Примечание – * – p<0,05 по сравнению с контролем

Таблица 3. – Количество разных форм нейронов в поле зрения в коре мозга крысят (Me (LQ; UQ, на площадь 1 мм²)

Группа	2-е сутки	5-е сутки	10-е сутки	20-е сутки	45-е сутки	90-е сутки
Цингулятная кора						
Нормохромные нейроны						
контроль	15609 (15609;16378)	9755 (9688;9822)	7199 (7132;7266)	6054 (5989;6123)	4373 (4307;4576)	4844 (4711;4978)
алкоголь	15339* (15070;15339)	7872* (7805;8074)	5651* (5651;5920)	4036* (3902;4036)	2624* (2557;2827)*	2220* (2019;2422)*
Гиперхромные несморщенные нейроны						
контроль	1345(1345;1345)	336(269;404)	538(538;538)	605(538;672)	672(672;672)	67(0;134)
алкоголь	1480(1345;1884)	538(404;538)*	807(672;807)*	807(807;942)*	538(538;672)	807(807;807)*
Гиперхромные сморщенные нейроны						
контроль	0(0;0)	0(0;0)	0(0;0)	134(134;134)	134(134;134)	0(0;0)
алкоголь	0(0;0)	0(0;0)	0(0;0)	404(404;404)*	404(404;404)*	471(404;538)*
Гипохромные нейроны						
контроль	269(0;269)	134(134;134)	269(269;404)	336(269;404)	538(404;538)	605(404;672)
алкоголь	269(269;538)	134(134;269)	672(538;672)*	538(538;538)*	538(538;672)	471(269;538)
Клетки-тени						
контроль	0(0;0)	0(0;0)	269(269;269)	269(269;269)	404(269;404)	404(404;538)
алкоголь	0(0;0)	134(134;134)	404(404;404)*	404(404;404)*	538(538;538)	269(269;404)

Продолжение таблицы 3.

Фронтальная кора						
Нормохромные нейроны						
контроль	15205 (15071;15340)	9016 (9016;9151)	6661 (6429;6698)	4643 (4576;4980)	3364 (3229;3364)	3701 (3499;3768)
алкоголь	11975 (11841;12110)*	8005 (7939;8073)*	4239 (4171;4440)*	3297 (3229;3364)*	1347 (1078;1347)*	1009 (538;1212)*
Гиперхромные несморщенные нейроны						
контроль	1345 (1345;1614)	269 (269;269)	605 (538;672)	672 (538;672)	740 (672;942)	471 (404;538)
алкоголь	1749 (1614;1884)	404 (404;538)*	874 (807;1076)*	807 (672;807)*	672 (672;807)	1278 (1076;1749)*
Гиперхромные сморщенные нейроны						
контроль	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	134 (134;134)	134 (134;134)	0 (0;0)
алкоголь	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;0)	336 (269;404)*	404 (404;538)*	404 (404;404)*
Гипохромные нейроны						
контроль	269 (269;269)	134 (134;134)	269 (269;404)	404 (269;404)	538 (404;538)	269 (269;404)
алкоголь	269 (269;538)	269 (269;269)	538 (404;538)*	538 (538;538)*	672 (672;672)*	269 (269;269)
Клетки-тени						
контроль	0(0;0)	134(134;134)	269(164;269)	269(134;269)	404(404;404)	134(134;269)

Продолжение таблицы 3.

алкоголь	0 (0;0)	202 (134;269)	471 (404;538)*	404 (404;404)*	672 (672;807)*	269 (134;269)
Париетальная кора						
Нормохромные нейроны						
контроль	15340 (14801;15539)	9082 (9016;9151)	6459 (6459;6593)	5315 (5114;5383)	3364 (3364;3499)	3700 (3633;3767)
алкоголь	11571* (11437;11841)	8073* (8073;8208)	4239* (4306;4440)	3027* (2826;3230)	1280* (1075;1347)	1211* (943;1212)
Гиперхромные несморщенные нейроны						
контроль	1614 (1345;2153)	269 (269;269)	538 (404;538)	672 (538;672)	672 (672;807)	404 (404;404)
алкоголь	1884 (1614;1884)	404* (404;404)	807* (672;807)	740 (672;807)	874 (807;942)	942* (942;1076)
Гиперхромные сморщенные нейроны						
контроль	0(0;0)	0(0;0)	0(0;0)	134(134;134)	134(134;134)	0(0;0)
алкоголь	0(0;0)	0(0;0)	0(0;0)	269*(269;404)	336*(269;404)	672*(672;807)
Гипохромные нейроны						
контроль	269 (0;269)	134 (134;134)	269 (269;269)	269 (269;404)	538 (404;538)	269 (269;404)
алкоголь	269 (269;404)	269 (134;269)	605* (538;672)	538* (538;672)	672* (672;672)	269 (269;269)
Клетки-тени						
контроль	0(0;0)	67(0;134)	269(269;269)	202(134;269)	404(404;404)	202(134;269)
алкоголь	0 (0;0)	134 (134;134)	471* (404;672)	404* (269;404)	605* (538;807)	269 (269;269)

Примечание – * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем

Таблица 4. – Размеры и форма перикарионов нейронов 5-го слоя коры мозга (Me (LQ; UQ))

Группа	2-е сутки	5-е сутки	10-е сутки	20-е сутки	45-е сутки	90-е сутки
Цингулятная кора						
Площадь, мкм ²						
контроль	24(23,6;25)	41(39;41,6)	57(54;60)	63(62;67)	75(73;77)	85(82;87)
алкоголь	31(29;33)*	46(37;52)	54(53;54)	43(41;45)*	54(46;56)*	39(34;49)*
Периметр, мкм						
контроль	18,5(18,3;19)	24,4(24;24,5)	28(27,7;29)	30(29,7;30,7)	33(32;35)	35(34;36)
алкоголь	21(20;22)*	26(22;27)	27(26,8;28)	25(24,8;26)*	28,9(27;29)*	27(24;28)*
Большой радиус, мкм						
контроль	6,2(6,2;6,3)	8(7,7;8,2)	9,3(9;9,4)	10,3(10;10,5)	11,3(11;12)	12,6(12;13)
алкоголь	7,4(7,7;6)*	9(7;10)	9(8,9;9,2)	8,8(8,8;9)*	10,4(10;11)*	10,6(9;11)*
Малый радиус, мкм						
контроль	5(4,8;5)	6,5(6,5;6,7)	7,6(7,2;7,7)	8(7,8;8,3)	9(8,6;9)	8,7(8,3;8,8)
алкоголь	5,4(5;5,5)*	7(6;7,6)	7,6(7,5;8)	6,5(6,2;6,8)*	6,6(6;7)*	5(4,7;6,6)*
Фактор элонгации						
контроль	1,25(1,23;1,3)	1,2(1,15;1,22)	1,2(1,18;1,22)	1,2(1,18;1,2)	1,2(1,18;1,3)	1,5(1,4;1,5)
алкоголь	1,37(1,3;1,4)*	1,26(1,2;1,3)	1,2(1,16;1,26)	1,3(1,3;1,4)*	1,4(1,3;1,8)*	1,8(1,5;1,9)
Форм-фактор						
контроль	0,88(0,87;0,9)	0,88(0,87;0,9)	0,9(0,88;0,9)	0,92(0,9;0,93)	0,9(0,8;0,92)	0,9(0,87;0,9)
алкоголь	0,87(0,86;0,9)	0,87(0,8;0,89)	0,9(0,88;0,9)	0,89(0,88;0,89)*	0,8(0,8;0,8)*	0,8(0,7;0,8)*

Продолжение таблицы 4.

Фронтальная кора						
Площадь, мкм ²						
контроль	23(22;24)	45(29;48)	58(53;63)	68(65;73)	82(78;86)	95(86;104)
алкоголь	27(26;28)*	49(48;53)	58(50;62)	52(41;53)*	56(47;63)*	56(48;60)*
Периметр, мкм						
контроль	18(17,7;18,4)	25(21;26)	29(28;30)	31(29;32)	34,2(33,8;35)	39(37;40)
алкоголь	19,5(19;20)*	27(26;28)	28(27;29)	28(25;29)*	29(28;30)*	28,5(28;32)*
Большой радиус, мкм						
контроль	6(5,9;6,1)	9(8;9,3)	9,7(9,4;9,7)	10(9,6;11)	11,5(11;12)	13,6(13;14)
алкоголь	6,5(6,3;6,6)*	9(8;9,7)	9,4(9,2;9,8)	9(8,5;9,5)*	10(9;10,8)*	10,3(9,9;11)*
Малый радиус, мкм						
контроль	5(4,8;5)	6,6(6,5;7)	7,8(7,5;8)	8(7,9;9)	9(8,9;9,3)	9(8,6;9,3)
алкоголь	5,4(5;5,5)*	6,7(5;7)	7,8(7;8)	6,7(6;7)*	6(5,9;7)*	6,6(6;7)*
Фактор элонгации						
контроль	1,18(1,16;1,2)	1,24(1,2;1,4)	1,22(1,15;1,3)	1,27(1,24;1,29)	1,2(1,19;1,3)	1,44(1,4;1,5)
алкоголь	1,22(1,2;1,26)	1,39(1,3;1,4)	1,3(1,27;1,4)	1,3(1,25;1,36)	1,3(1,2;1,4)	1,5(1,46;1,6)
Форм-фактор						
контроль	0,89(0,88;0,9)	0,88(0,86;0,9)	0,9(0,88;0,91)	0,89(0,87;0,9)	0,9(0,88;0,9)	0,87(0,8;0,9)
алкоголь	0,89(0,88;0,9)	0,86(0,84;0,9)	0,9(0,88;0,91)	0,885(0,884;0,9)	0,87(0,8;0,9)	0,8(0,8;0,9)*

Продолжение таблицы 4.

Париетальная кора						
Площадь, мкм ²						
контроль	20(19;21)*	39(37;41)	57(55;58)	67(60;73)	86(76;92)	100(86;102)
алкоголь	28(26;31)*	39(39;41)	50(49;52)	49(45;53)*	52(49;60)*	52(46;59)*
Периметр, мкм						
контроль	17(16;17)	23,8(23,6;24)	28(27;29)	31,6(29;32)	35(33;35,4)	37(36;38)
алкоголь	20(19;21)*	23,9(23,7;24)	27(26;27)	26(25;28)*	28(26;29,7)*	28(27;29)*
Большой радиус, мкм						
контроль	6(5;6)	8(7,8;8)	9,1(8,9;9,3)	10,3(9,6;10,5)	11,6(11;11,8)	12,3(11;12,4)
алкоголь	7(6;7)*	8(8;8,6)	8,8(8,5;9,3)	9(8,9;9,2)*	8,7(8;10)*	10,6(9;10,7)*
Малый радиус, мкм						
контроль	4,6(4,6;4,7)	6(5,9;6,5)	7,74(7,4;7,9)	8,6(7,8;8,6)	9,5(9;9,6)	10(9,8;10,5)
алкоголь	5(5;5,5)*	6,7(6,6;6,7)	7,66(7,4;8,2)	6,7(6,5;7)*	7(6;7,2)*	6,7(6;6,9)*
Фактор элонгации						
контроль	1,2(1,18;1,24)	1,28(1,25;1,3)	1,19(1,17;1,2)	1,2(1,19;1,22)	1,2(1,2;1,27)	1,2(1,18;1,2)
алкоголь	1,25(1,2;1,26)	1,4(1,3;1,5)	1,23(1,2;1,26)	1,26(1,22;1,3)	1,27(1,2;1,3)	1,5(1,4;1,7)*
Форм-фактор						
контроль	0,89(0,88;0,9)	0,87(0,8;0,9)	0,9(0,89;0,91)	0,9(0,86;0,92)	0,9(0,89;0,9)	0,9(0,9;0,93)
алкоголь	0,89(0,87;0,9)	0,84(0,8;0,9)	0,89(0,88;0,9)	0,9(0,89;0,92)	0,88(0,8;0,9)	0,8(0,8;0,9)*

Примечание – * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем

Таблица 5. – Показатели ультрамикроскопической морфометрии органелл нейронов 5-го слоя фронтальной коры мозга крыс (Me (LQ; UQ))

Показатель		5-е сутки		20-е сутки		45-е сутки	
		контроль	алкоголь	контроль	алкоголь	контроль	алкоголь
Митохондрии	Количество в 1 мм ²	0,8(0,6;0,8)	0,8(0,8;1)	1,4 (1,4;1,6)	1,1(1;1,2)*	1,9 (1,6;2,2)	1,2(1;1,2)*
	Площадь	0,075(0,073;0,08)	0,076 (0,074;0,08)	0,345 (0,34;0,35)	0,3 (0,29;0,34)	0,16 (0,15;0,2)	0,19(0,17;0,192)
	Форм-фактор	0,88(0,87;0,89)	0,9(0,889;0,9)	0,64(0,6;0,66)	0,82 (0,8;0,9)*	0,62(0,6;0,64)	0,7(0,68;0,8)*
	Фактор элонгации	1,37(1,26;1,5)	1,32(1,3;1,6)	4(3;4,5)	3(2,6;3,5)*	2,8(2,76;2,82)	2,6(2,4;2,7)*
	Количество крист в митохондрии на 1 мкм ²	53(41;53)	53(27;75)	39(35;40)	27(21;28)*	153(125;160)	63(29;79)*
	Общая длина крист в митохондрии на 1 мкм ²	8(6;8)	8(4;11)	9,6(8,8;10)*	6(5;7)*	25(25;25)	13(6;16)*
	Площадь, занимаемая митохондриями в цитоплазме	0,06(0,04;0,064)	0,06(0,059;0,08)	0,5(0,48;0,6)	0,3(0,29;0,4)*	0,3(0,24;0,4)	0,2(0,17;0,23)*
	Общая длина крист митохондрий в цитоплазме	0,6(0,4;0,64)	0,6(0,3;0,9)	13(12;16)	6(5;8,4)*	47,5(40;55)	15,6(6;19)*

Продолжение таблицы 5.

Рибосомы	Общее количество на 1 мкм ²	15,6(14,6;15,8)	16,4(16;17,6)*	15,3(14;17)	16,2(14,4;17,6)	16(14;16,6)	16,7(14,2;17)
	Свободные на 1 мкм ²	13,8(13,2;14)	14,9(14,8;16,2)*	8,5(8;10)	14,2(13,2;15,4)*	7(6;7,4)	15(13;15)*
	Связанные на 1 мкм ²	1,6(1,4;1,8)	1,4(1,2;1,4)*	6,8 (6;7)	2(1,2;2,2)*	9 (8;9,2)	1,7(1,2;2)*
ГрЭС	Длина цистерн	0,39(0,38;0,4)	0,43(0,42;0,6)*	1,1(1;1,1)	1,1(1;1,1)	2,2 (2;2,2)	1,5(1;2)*
	Ширина цистерн	0,035(0,03;0,04)	0,04(0,03;0,05)	0,1 (0,08;0,1)	0,1 (0,09;0,11)	0,071(0,07;0,074)	0,15 (0,1;0,2)*
Комплекс Гольджи	Длина цистерн на 1 мкм ²	0,15 (0,13;0,17)	0,15 (0,14;0,17)	0,1 (0,08;0,11)	0,13 (0,12;0,14)*	0,07 (0,06;0,08)	0,15 (0,12;0,17)*
Лизосомы	Количество в 1 мм ²	0,2(0,2;0,2)	0,4(0,4;0,4)	0,8(0,6;0,8)	1,2(1;1,4)*	0,5(0,4;0,6)	1(0,8;1,2)*
	Площадь	0,039 (0,037;0,04)	0,045 (0,038;0,05)	0,1 (0,08;0,12)	0,16(0,16;0,17)*	0,1 (0,1;0,11)	0,164(0,16;0,17)*
	Площадь, занимаемая лизосомами в цитоплазме	0,0078 (0,0074;0,008)	0,018 (0,015;0,02)	0,08(0,048;0,096)	0,19(0,16;0,2)*	0,05(0,04;0,07)	0,16(0,13;0,2)*

Примечание – * – p<0,05 по сравнению с контролем

Таблица 6. – Содержание рибонуклеопротеинов в нейронах 5-го слоя коры мозга (Me (LQ; UQ), в единицах оптической плотности

<i>Группа</i>	<i>2-е сутки</i>	<i>5-е сутки</i>	<i>10-е сутки</i>	<i>20-е сутки</i>	<i>45-е сутки</i>	<i>90-е сутки</i>
Цингулятная кора						
контроль	0,2 (0,17;0,23)	0,2 (0,17;0,24)	0,2 (0,17;0,23)	0,15 (0,14;0,16)	0,14 (0,13;0,16)	0,12 (0,11;0,13)
алкоголь	0,22 (0,2;0,22)	0,29 (0,23;0,3)*	0,22 (0,2;0,24)	0,16 (0,14;0,17)	0,19 (0,18;0,23)	0,18 (0,14;0,185)*
Фронтальная кора						
контроль	0,23 (0,22;0,23)	0,2 (0,18;0,22)	0,2 (0,18;0,22)	0,14 (0,13;0,15)	0,19 (0,18;0,2)	0,125 (0,12;0,13)
алкоголь	0,23 (0,2;0,24)	0,26 (0,2;0,28)*	0,22 (0,19;0,26)	0,16 (0,145;0,165)	0,2 (0,19;0,21)	0,18 (0,17;0,19)*
Париетальная кора						
контроль	0,22 (0,2;0,24)	0,19 (0,19;0,21)	0,21 (0,16;0,24)	0,14 (0,13;0,15)	0,17 (0,17;0,18)	0,12 (0,12;0,13)
алкоголь	0,2 (0,21;0,25)	0,24* (0,21;0,25)	0,24 (0,17;0,26)	0,14 (0,12;0,15)	0,18 (0,18;0,2)	0,16* (0,15;0,18)

Примечание – * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем

Таблица 7. – Активность ферментов в цитоплазме нейронов 5-го слоя коры мозга (Me (LQ; UQ) в единицах оптической плотности

Группа	5-е сутки	20-е сутки	45-е сутки
Цингулятная кора			
НАДНДГ			
контроль	0,156(0,14;0,16)	0,2(0,2;0,22)	0,26(0,24;0,262)
алкоголь	0,16(0,15;0,17)	0,18*(0,17;0,18)	0,18*(0,179;0,182)
НАДФНДГ			
контроль	–	0,12(0,116;0,13)	0,15(0,14;0,16)
алкоголь	–	0,1(0,1;0,11)	0,12*(0,116;0,124)
СДГ			
контроль	–	0,13(0,12;0,16)	0,164(0,16;0,17)
алкоголь	–	0,09*(0,09;0,11)	0,12*(0,11;0,13)
ЛДГ			
контроль	0,12(0,1;0,13)	0,14(0,13;0,14)	0,125(0,12;0,13)
алкоголь	0,14(0,13;0,15)	0,17*(0,16;0,18)	0,17*(0,16;0,17)
Г-6-Ф			
контроль	–	0,22(0,19;0,24)	0,24(0,23;0,25)
алкоголь	–	0,18*(0,18;0,19)	0,18*(0,17;0,19)
Кислая фосфатаза			
контроль	–	0,25(0,24;0,25)	0,22(0,21;0,26)
алкоголь	–	0,36*(0,35;0,37)	0,36*(0,32;0,4)
Фронтальная кора			
НАДНДГ			
контроль	0,156(0,15;0,17)	0,2(0,2;0,23)	0,24(0,23;0,26)
алкоголь	0,16(0,15;0,17)	0,18*(0,17;0,18)	0,181*(0,18;0,85)
НАДФНДГ			
контроль	–	0,115(0,11;0,116)	0,13(0,128;0,136)
алкоголь	–	0,113(0,11;0,116)	0,1139*(0,11;0,114)
СДГ			
контроль	–	0,14(0,12;0,16)	0,17(0,16;0,174)
алкоголь	–	0,11*(0,1;0,113)	0,12*(0,116;0,13)
ЛДГ			
контроль	0,134(0,13;0,14)	0,15(0,14;0,15)	0,14(0,13;0,144)
алкоголь	0,138(0,12;0,14)	0,18*(0,17;0,19)	0,18*(0,16;0,2)

Продолжение таблицы 7.

Г-6-Ф			
контроль	–	0,19(0,18;0,22)	0,244(0,24;0,25)
алкоголь	–	0,16*(0,16;0,17)	0,174*(0,17;0,175)
Кислая фосфатаза			
контроль	–	0,24(0,22;0,28)	0,23(0,22;0,236)
алкоголь	–	0,35*(0,34;0,37)	0,35*(0,34;0,354)
Париегальная кора			
НАДНДГ			
контроль	0,15(0,47;0,16)	0,22(0,2;0,24)	0,24(0,23;0,26)
алкоголь	0,156(0,15;0,16)	0,18*(0,18;0,19)	0,18*(0,17;0,19)
НАДФНДГ			
контроль	–	0,12(0,119;0,13)	0,14(0,13;0,15)
алкоголь	–	0,11(0,1;0,12)	0,119*(0,116;0,12)
СДГ			
контроль	–	0,13(0,12;0,14)	0,17(0,16;0,18)
алкоголь	–	0,1*(0,09;0,11)	0,12*(0,1;0,13)
ЛДГ			
контроль	0,136(0,13;0,15)	0,14(0,137;0,142)	0,129(0,126;0,13)
алкоголь	0,138(0,13;0,15)	0,16*(0,15;0,17)	0,175*(0,17;0,18)
Г-6-Ф			
контроль	–	0,21(0,2;0,23)	0,24(0,239;0,244)
алкоголь	–	0,16*(0,15;0,17)	0,178*(0,17;0,18)
Кислая фосфатаза			
контроль	–	0,22(0,2;0,24)	0,22(0,2;0,24)
алкоголь	–	0,34*(0,33;0,35)	0,37*(0,34;0,4)

Примечание – * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем

Таблица 8. – Экспрессия DCX в нейронах 5-го слоя фронтальной коры мозга крыс в постнатальном онтогенезе (в единицах оптической плотности)

<i>Сроки после рождения</i>	<i>Контроль</i>		<i>Алкоголь</i>	
	<i>Перикарион</i>	<i>Нейропиль</i>	<i>Перикарион</i>	<i>Нейропиль</i>
5-е сутки	0,12±0,006	0,18±0,01	0,21±0,006*	0,16±0,02*
10-е сутки	0,16±0,003	0,17±0,01	0,18±0,002*	0,14±0,02*
20-е сутки	0,14±0,001	0,11±0,01	0,15±0,004	0,11±0,03

Примечание – * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем

Таблица 9. – Экспрессия NeuN в перикарионах нейронов 5-го слоя фронтальной коры мозга крыс в постнатальном онтогенезе (в единицах оптической плотности)

<i>Сроки после рождения</i>	<i>Контроль</i>	<i>Алкоголь</i>
5-е сутки	0,16±0,001	0,15±0,005
10-е сутки	0,18±0,001	0,16±0,001*
20-е сутки	0,20±0,007	0,17±0,009*

Примечание – * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем

Таблица 10. – Экспрессия СФ в молекулярном слое фронтальной коры мозга крыс в постнатальном онтогенезе (в единицах оптической плотности)

<i>Сроки после рождения</i>	<i>Контроль</i>	<i>Алкоголь</i>
5-е сутки	0,37±0,015	0,31±0,04*
10-е сутки	0,42±0,01	0,35±0,03*
20-е сутки	0,29±0,01	0,27±0,02*
45-е сутки	0,33±0,01	0,29±0,02*

Примечание – * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем

Таблица 11. – Экспрессия СФ в 5-м слое фронтальной коры мозга крыс в постнатальном онтогенезе (в единицах оптической плотности)

<i>Сроки после рождения</i>	<i>Контроль</i>	<i>Алкоголь</i>
5-е сутки	0,15±0,008	0,13±0,02*
10-е сутки	0,165±0,02	0,163±0,02
20-е сутки	0,28±0,02	0,22±0,01*
45-е сутки	0,33±0,02	0,29±0,02*

Примечание – * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем

Научное издание

Зиматкин Сергей Михайлович
Бонь Елизавета Игоревна

**НАРУШЕНИЯ В МОЗГЕ ПРИ
АНТЕНАТАЛЬНОЙ АЛКОГОЛИЗАЦИИ**

Монография

Ответственный за выпуск С. Б. Вольф

Компьютерная верстка Д. Р. Рапейко
Корректор Л. С. Засельская

Подписано в печать 06.06.2017.

Формат 60x84/16. Бумага офсетная.

Гарнитура Times New Roman. Ризография.

Усл. печ. л. **11,16**. Уч.-изд. л. **8,30**. Тираж **50** экз. Заказ **40**.

Издатель и полиграфическое исполнение
учреждение образования

«Гродненский государственный медицинский университет».

ЛП № 02330/445 от 18.12.2013.

Ул. Горького, 80, 230009, Гродно.