

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 616.8.89-008.441.13-055.26:340.636.1:612.82

Для цитирования: Солонский А.В., Потапов А.В., Шумилова С.Н., Логвинов С.В., Герасимов А.В., Варакута Е.Ю. Морфометрическая характеристика влияния пренатальной алкоголизации на сосуды микроциркуляторного русла и нейроны головного мозга человека. *Сибирский вестник психиатрии и наркологии*. 2018; 4 (101): 5–10. [https://doi.org/10.26617/1810-3111-2018-4\(101\)-5-10](https://doi.org/10.26617/1810-3111-2018-4(101)-5-10)

Морфометрическая характеристика влияния пренатальной алкоголизации на сосуды микроциркуляторного русла и нейроны головного мозга человека

Солонский А.В.^{1,2}, Потапов А.В.², Шумилова С.Н.²,
Логвинов С.В.², Герасимов А.В.², Варакута Е.Ю.²

¹ Научно-исследовательский институт психического здоровья, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (НИИ психического здоровья Томский НИИМЦ) Россия, 634014, Томск, ул. Алеутская, 4

² Сибирский государственный медицинский университет Россия, 634050, Томск, Московский тракт, 2

РЕЗЮМЕ

На материале мозга человека, развивающегося в условиях пренатальной алкоголизации, установлены морфометрические особенности формирования сосудов микроциркуляторного русла и нейронов большого мозга. Обнаружено уменьшение диаметра и периметра капилляров с увеличением срока развития в условиях пренатальной алкоголизации, приводящее к общему снижению васкуляризации ткани мозга. Выявлено уменьшение размеров нейробластов как следствие изменения васкуляризации, вызванной воздействием алкоголя.

Ключевые слова: алкоголь, головной мозг, нейрон, развитие, микроциркуляторное русло.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время большое внимание уделяется вопросам развития головного мозга в целом и механизмам влияния на эти процессы токсических веществ в частности. Это связано с развитием промышленности, появлением новых повреждающих агентов и отравляющих веществ. Токсическое влияние различных веществ имеет сходные последствия, что проявляется в том числе в нарушении развития сосудистого компонента головного мозга [1, 2, 3].

Наиболее распространённым и употребляемым токсическим веществом является этанол. Наибольшую опасность представляет женский алкоголизм, поскольку употребление алкоголя беременными может привести к различным морфологическим и структурным аномалиям, описанным в рамках фетального алкогольного синдрома (FAS) [4], который проявляется умственной отсталостью, поведенческими аномалиями, физическими дефектами [5] и может сопровождаться пренатальным ишемическим поражением [6].

Имеются данные, что воздействие этанола на развитие мозга мышей может привести к нарушению кровотока в мозговых артериях плода [7]. На современном этапе считается, что одним из наиболее вероятных факторов возникновения сосудистых аномалий является уменьшение васкуляризации за счет снижения уровня нейротрофических факторов. Возможны несколько вариантов объяснения данного феномена. Вероятно, нарушение ангиогенеза, а вслед за этим и нейронального развития происходит за счет снижения уровня PGF (плацентарного

фактора роста) [8] или нейротрофина [9]. На модели мембраны куриного желточного мешка было показано, что этанол резко ингибирует ангиогенез за счет повышения уровня реакционно-способных форм кислорода [10].

Исследование с помощью когерентной компьютерной томографии позволило выявить, что через несколько минут после употребления этанола приводил к быстрому и значительному уменьшению диаметра сосуда по сравнению с интактной группой [11]. Противоположный результат был получен при исследовании на бабуинах. В нем дилатация артерий мозга была получена за счет воздействия этанола на каннабиноидные рецепторы головного мозга эмбриона [12].

Все перечисленные исследования были направлены на поиск механизмов, обуславливающих нарушение процессов васкуляризации, но в литературе отсутствуют данные, которые описывали бы то, как именно нарушается сосудистая сеть.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучить влияние пренатальной алкоголизации на особенности развития структур головного мозга эмбриона – нейробластов и сосудов МЦР на разных сроках развития.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В ходе исследования было изучено 26 эмбрионов 8–11 недель развития. Весь материал был разделен на 4 группы в зависимости от наличия алкогольной зависимости у матери и срока внутриутробного развития. Таким образом были сформированы первые две группы: Алкоголь1 (А1) – эмбрионы в возрасте

8–9 недель; Алкоголь2 (A2) – эмбрионы в возрасте 10–11 недель, по 6 образцов в каждой. В этих группах материал был получен от матерей, употреблявших алкоголь в период беременности и страдающих алкоголизмом I–II стадии (F10.201, F10.202).

Следующие две группы: Контроль1 (K1) – эмбрионы в возрасте 9 недель, Контроль2 (K2) – эмбрионы в возрасте 11 недель, по 7 образцов в каждой. Материал был получен от психически и соматически здоровых женщин. Возраст пациенток был в пределах от 25 лет до 41 года (средний возраст составил 37,1 года). Возраст женщин групп Контроль соответствовал таковому в группах Алкоголь.

Головной мозг эмбрионов получали в процессе проведения операции по искусственному прерыванию беременности в роддомах и гинекологических отделениях больниц Томска, при этом все процедуры выполнялись с учетом требований этического комитета.

В период беременности больные употребляли в зависимости от толерантности от 500 до 800 мл 40% алкоголя в день. Все женщины лечились ранее от алкоголизма и прошли от 1 до 10 курсов лечения, но никто из них в период, предшествующий аборту, не находился на лечении дисульфирамом.

Главным критерием для отбора женщин в контрольную группу являлся факт отсутствия употребления алкоголя в течение одного месяца до зачатия и в течение беременности. Кроме того, в эту группу включали только тех женщин, которые не страдали хроническими заболеваниями, не употребляли лекарств и не имели в быту и на производстве контакта с токсическими веществами, радиацией и др.

Головной мозг эмбрионов при подготовке к изучению методами световой микроскопии фиксировали в 0,5% растворе глутаральдегида на 0,1 М фосфатном буфере pH 7,3–7,4, дофиксировали в 1% растворе OsO₄, обезвоживали в спиртах восходящей концентрации и заливали в аралдит. Для морфометрии использовали полутонкие срезы, окрашенные толуидиновым синим (окраска по Нислю). Полутонкие срезы изготавливали на ультратоме «Ultracut-E» (Reichert, Австрия). Для компьютерной морфометрии сосудов использовали полутонкие (толщиной 0,5–1 мкм) срезы на уровне промежуточного слоя, окрашенные толуидиновым синим. Морфометрический анализ применялся для получения количественных параметров нервных клеток и сосудов коры головного мозга эмбрионов на различных стадиях развития с целью выяснения зависимости изменений структуры указанных компонентов от степени их дифференцировки и оценки влияния патологических воздействий на процесс васкулогенеза.

Микросъемка материала производилась с помощью световых микроскопов AxioScope A1 (Carl Zeiss, Германия), AxioStar (Carl Zeiss, Германия) и цифровой камеры Canon G10. С применением программы AxioVision 4.8 производился подсчет сосудистых и нейрональных структур, определялись

площади и диаметры каждого отдельного элемента. При изучении сосудистого компонента подсчитывалось среднее количество сосудов на единицу площади, их средняя площадь и средний периметр, а также относительная площадь сосудов на единицу площади среза (рис. 1).

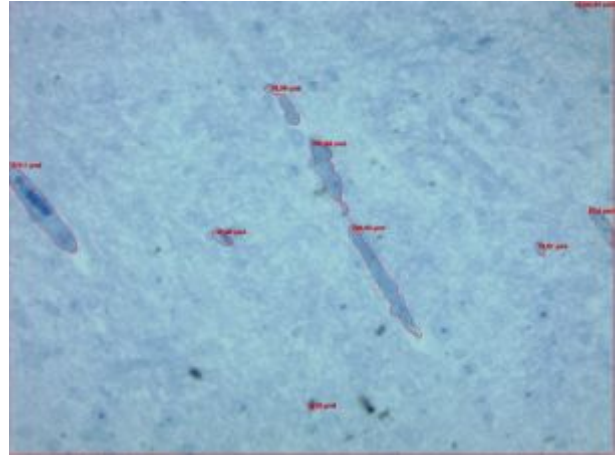


Рисунок 1. Препарат головного мозга эмбриона группы A1
Здесь и далее окраска толуидиновым синим. Ув. х 400.
На фото процесс подсчета площади сосудов
в программе AxioVision 4.8.

Далее подсчитывались средняя площадь и средний диаметр нейронов (рис. 2).

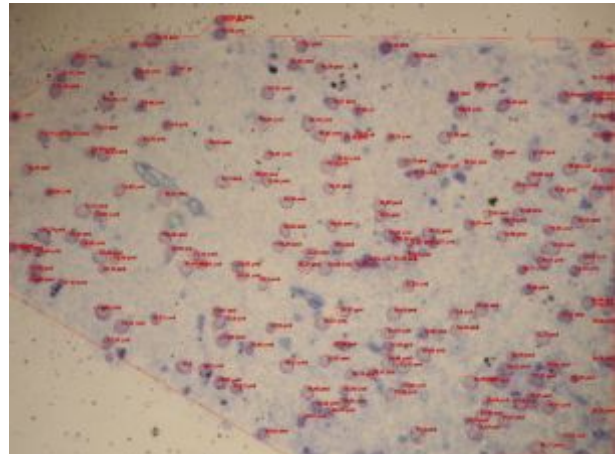


Рисунок 2. Препарат головного мозга эмбриона группы A1

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы Statistica 10. Для оценки достоверности различий при сравнении средних величин использовали критерий Манна–Уитни, различия считались значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении мозга плодов было установлено, что в данный период развития нервная ткань достаточно хорошо структурно сформирована, в ней находятся нейробласты и глиобласты, а также кровеносные сосуды.

Нейробласты выглядят как клетки округлой формы, располагающиеся группами. Центральные располагающиеся ядра со светлым матриксом занимают основной объем их перикариона и содержат 1–3 мелких ядрышка. Базофильное вещество цитоплазмы и нейрофибриллы не прослеживаются. Идентификация начального сегмента аксона затруднена. Глиобласты лежат между группами нервных клеток, имеют так же округлую форму и высокое ядерно-цитоплазматическое соотношение. В их ядрах наблюдаются участки повышенной электронной плотности в виде зерен и нитей хроматина и содержатся крупные хорошо окрашенные ядрышки, занимающие центральное положение. Появляются глиобласты, контактирующие с нейробластами. Встречаются участки, на которых глиобласты располагаются группами, окружая нейробласты.

Среди вышеперечисленных структур наблюдались различные реактивные изменения в виде гиперхромных несморщенных и гиперхромных сморщенных клеток. В случаях с выраженными реактивными изменениями нейронов отмечалось расширение периваскулярных и перичеселлюлярных пространств. Размеры клеточных группировок отличались вариабельностью, динамичного роста показателей не наблюдалось (рис. 3).

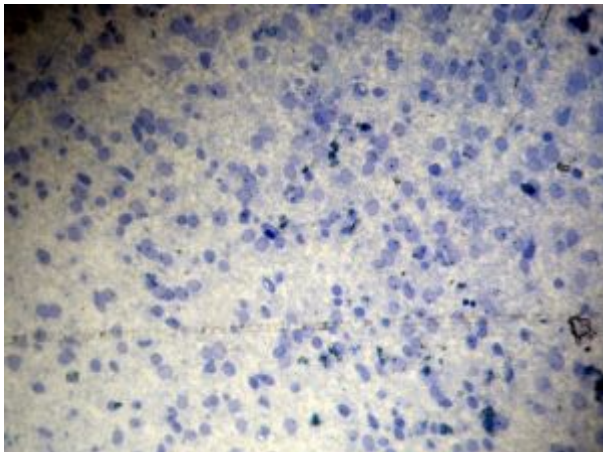


Рисунок 3. Препарат головного мозга эмбриона группы А1

Особенностью этих этапов развития является хорошее развитие МЦР. Оно представлено артериолами, капиллярами и венулами. В стенках артериол наблюдались циркулярно расположенные гладкомышечные клетки. Размеры капилляров на препаратах варьировали от 6–7 мкм до 10–11 мкм. Капилляры соматического типа имели хорошо развитую стенку, состоящую из эндотелиоцитов, базальной мембраны, находящихся в её структуре перитцитов, а также адвентициальных клеток. В просветах некоторых сосудов содержались форменные элементы крови.

Количественное исследование позволило установить следующие закономерности. Для удобства разделим данные на два блока.

Между группой Контроль и А1 достоверных различий выявлено не было (табл. 1 и 2, рис. 3 и 6). Однако между группами Контроль и А2 отмечались следующие различия: выявлено увеличение числа сосудов на единицу площади, а также увеличение средней площади сосуда (рис. 5, 6). Таким образом, в более позднем периоде (11 недель развития) количество сосудов увеличивается, но средняя площадь каждого сосуда уменьшается.

Таблица 1

Динамика численных показателей сосудов в исследуемых группах

Анализируемый показатель	Средняя площадь, мкм ²	Удельная площадь сосудов, %	Количество сосудов на 1 мм ² , шт.
Контроль	78,0	0,42	52
А1	75,7	0,40	52
А2	48,5	0,37	136

Таблица 2

Корреляция влияния алкоголя на площадь сосудов

Сравниваемые группы	Уровень значимость (р)	Критическое значение (р)
А1 – Контроль	0,49	0,05
А2 – Контроль	0,00	
А1 – А2	0,00	

Таблица 3

Динамика численных показателей нейронов в исследуемых группах

Анализируемый показатель	Средняя площадь, мкм ²	Средний диаметр, мкм ²
Контроль	39,3	7,0
А1	35,2	6,5
А2	25,4	5,6

Таблица 4

Корреляция влияния алкоголя на площадь нейронов

Сравниваемые группы	Уровень значимость (р)	Критическое значение (р)
А1 – Контроль	0,00	0,05
А2 – Контроль	0,00	
А1 – А2	0,00	

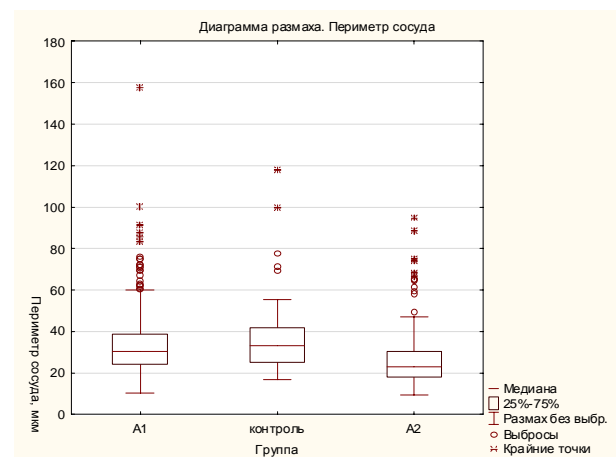


Рисунок 4. Сравнение периметра сосудов в группах

Также наблюдалось закономерное уменьшение показателей групп A1 и A2 в зависимости от времени гестации (табл. 3 и 4, рис. 6 и 7). С увеличением срока развития уменьшаются площадь и диаметр нейронов.

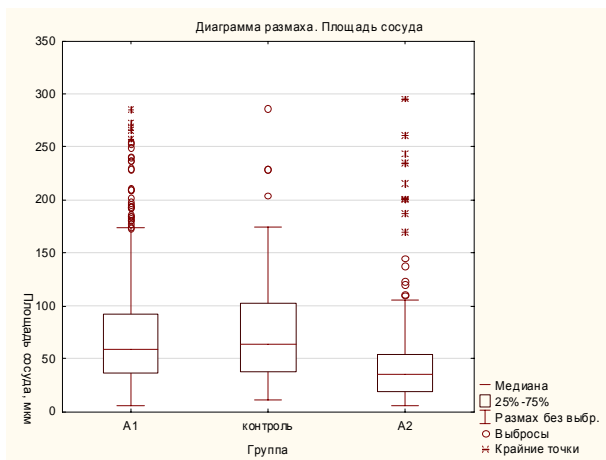


Рисунок 5. Сравнение площади сосудов в группах

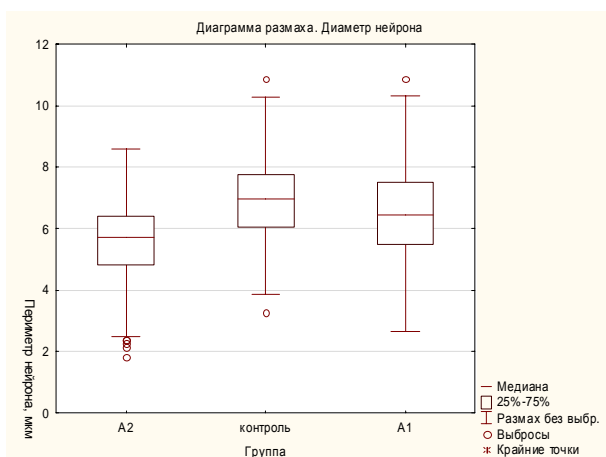


Рисунок 6. Сравнение диаметра нейронов в группах

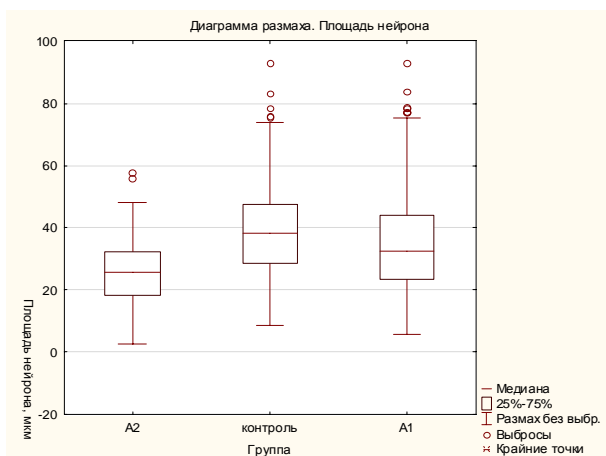


Рисунок 7. Сравнение площади нейронов в группах

ВЫВОДЫ

Таким образом, можно утверждать, что алкоголь влияет на развитие нейрососудистого комплекса головного мозга, что проявляется уменьшением объема нейробластов и снижением удельной площади сосудов. Изменения прогрессируют с увеличением срока развития. Можно предположить, что с уменьшением площади сосудов замедляется рост нейронов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в связи с публикацией данной статьи.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках темы основного плана НИР «Распространенность, клинко-патобиологические закономерности формирования и патоморфоза психических и поведенческих расстройств, вызванных употреблением психоактивных веществ в социально-организованных популяциях (профилактический, реабилитационный аспекты)». Номер госрегистрации ААА-А15-115123110064-5.

СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Исследование с участием людей проведено с соблюдением принципов Хельсинкской декларации ВМА (протокол заседания этического комитета НИИ психического здоровья № 53 от 01 октября 2012 г.).

ЛИТЕРАТУРА

- Jégou S., El Ghazi F., de Lendeu P.K., Marret S., Laudenbach V., Uguen A., Marcorelles P., Roy V., Laquerrière A., Gonzalez B.J. Prenatal alcohol exposure affects vasculature development in the neonatal brain. *Ann Neurol*. 2012. Dec.
- Солонский А.В., Семке В.Я. Бохан Н.А., Логвинов С.В. Онтогенетические закономерности развития мозга плодов человека при алкоголизме матери. *Сибирский вестник психиатрии и наркологии*. 2010. 2 (59): 9–17.
- Shushpanova T.V., Solonskii A.V. Intech Open, UK (Великобритания) "DRUG ADICTION" "Molecular-Cellular Targets of the Pathogenetic Action of Ethanol in the Human Brain in Ontogenesis and the Possibility of Targeted Therapy Aimed at Correcting the Effect of Pathogenic Factors" OPEN ACCESS WoS™ Core Collection (BKCI), 2018: 2–33.
- Bukiya A.N., Dopico A.M. Fetal Cerebral Circulation as Target of Maternal Alcohol Consumption. *Alcohol Clin Exp Res*. 2018; Apr 19. doi: 10.1111/acer.13755
- Seguin D., Gerlai R., Fetal alcohol spectrum disorders: Zebrafish in the analysis of the milder and more prevalent form of the disease. *Behavioral Brain Research*. 2018; Oct 15 (352): 125–132 doi: 10.1016/j.bbr.2017.10.005
- Jarmasz J.S., Basalah D.A., Chudley A.E., Del Bigio M.R. Human Brain Abnormalities Associated With Prenatal Alcohol Exposure and Fetal Alcohol Spectrum Disorder. *Journal of Neuropathology and experimental neuropathology*. 2017; Sep 1; 76 (9): 813–833 doi: 10.1093/jnen/nlx064
- Bake S., Tingling J.D., Miranda R.C. Ethanol exposure during pregnancy persistently attenuates cranially directed blood flow in the developing fetus: evidence from ultrasound imaging in a murine second trimester equivalent model. *Alcoholism? Clinical and Experimental Research*. 2012; May; 36 (5): 748–58 doi: 10.1111/j.1530-0277.2011.01676.x
- Lecuyer M., Laquerrière A., Bekri S., Lesueur C., Ramdani Y., Jégou S., Uguen A., Marcorelles P., Marret S., Gonzalez B.J. PLGF, a placental marker of fetal brain defects after in utero alcohol exposure. *Acta Neuropathol Commun*. 2017; Jun 6.
- Boschen K.E., Klintsova A.Y. In the Brain: interaction with alcohol exposure during development. *Vitam Horm*. 2017.
- Wang G., Zhong S., Zhang S.Y., Ma Z.L., Chen J.L., Lu W.H., Cheng X., Chuai M., Lee K.K., Lu D.X., Yang X. Angiogenesis

- is repressed by ethanol exposure during chick embryonic development. *J Appl Toxicol*.2016; May.
11. Raghunathan R., Wu C., Singh M., Liu C.H., Miranda R.C., Larin K.V. Evaluating the effects of maternal alcohol consumption on murine fetal brain vasculature using optical coherence tomography. *J Biophotonics*. 2018; May; 11 (5). doi: 10.1002/jbio.201700238
 12. Seleverstov O., Tobiasz A., Jackson J.S., Sullivan R., Ma D., Sullivan J.P., Davison S., Akhawattanangkul Y., Tate D.L., Costello T., Barnett S., Li W., Mari G., Dopico A.M., Bukiya A.N. Maternal alcohol exposure during mid-pregnancy dilates fetal cerebral arteries via endocannabinoid receptors. *Alcohol*. 2017; Jun; 61: 51–61. doi: 10.1016/j.alcohol.2017.01.014

Поступила в редакцию 23.05.2018
Утверждена к печати 6.11.2018

Солонский Анатолий Владимирович, д.м.н., в.н.с. лаборатории клинической психонейроиммунологии и нейробиологии, профессор кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии.

Потапов Алексей Валерьевич, д.м.н., профессор кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии.

Шумилова Софья Николаевна, студентка лечебного факультета.

Логвинов Сергей Валентинович, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой гистологии, эмбриологии и цитологии.

Герасимов Александр Владимирович, д.м.н., профессор кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии.

Варакута Елена Юрьевна, д.м.н., заведующий кафедрой анатомии человека с курсом топографической анатомии и оперативной хирургии.

✉ Солонский Анатолий Владимирович, anatsol3@gmail.com

УДК 616.8.89-008.441.13-055.26:340.636.1:612.82

For citation: Solonsky A.V., Potapov V.A., Shumilov S.N., Logvinov S.V., Gerasimov A.V., Varakuta E.Y. Morphometric characteristics of the effect of prenatal alcohol on the microvasculature and human brain neurons. *Siberian Herald of Psychiatry and Addiction Psychiatry*. 2018; 4 (101): 5–10. [https://doi.org/10.26617/1810-3111-2018-4\(101\)-5-10](https://doi.org/10.26617/1810-3111-2018-4(101)-5-10)

Morphometric characteristics of the effect of prenatal alcohol on the microvasculature and human brain neurons

Solonsky A.V.^{1,2}, Potapov V.A.², Shumilov S.N.², Logvinov S.V.², Gerasimov A.V.², Varakuta E.Y.²

¹ *Mental Health Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences
Aleutskaya Street 4, 634014, Tomsk, Russian Federation*

² *Siberian State Medical University
Moskovsky Trakt 2, 634050, Tomsk, Russian Federation*

ABSTRACT

On the material of the human brain, developing in the conditions of prenatal alcoholization, morphometric features of the formation of microvasculature and neurons of the human brain are established. A decrease in the diameter and perimeter of the capillaries with an increase in the period of development under conditions of prenatal alcoholism, leading to an overall decrease in vascularization of the brain tissue, was found. A decrease in the size of neuroblasts as a result of changes in vascularization caused by alcohol was revealed.

Keywords: alcohol, brain, neuron, development, microvasculature.

REFERENCES

1. Jégou S., El Ghazi F., de Lendeu P.K., Marret S., Laudénbach V., Uguen A., Marcocelles P., Roy V., Laquerrière A., Gonzalez B.J. Prenatal alcohol exposure affects vasculature development in the neonatal brain. *Ann Neurol*. 2012. Dec.
2. Solonsky A.V., Semke V.Ya., Bokhan N.A., Logvinov S.V. Ontogeneticheskie zakonmernosti razvitiya mozga plodov cheloveka pri alkogolizme materi. [Ontogenetic patterns of development of the brain of human fetuses during alcoholism of the mother]. *Sibirskij vestnik psichiatrii i narkologii – Siberian Herald of Psychiatry and Addiction Psychiatry*. 2010. 2 (59): 9–17 (in Russian).
3. Shushpanova T.V., Solonskii A.V. Intech Open, UK (Великобритания) "DRUG ADICTION" "Molecular-Cellular Targets of the Pathogenetic Action of Ethanol in the Human Brain in Ontogenesis and the Possibility of Targeted Therapy Aimed at Correcting the Effect of Pathogenic Factors" OPEN ACCESS WoS™ Core Collection (BKCI). 2018: 2–33.
4. Bukiya A.N., Dopico A.M. Fetal Cerebral Circulation as Target of Maternal Alcohol Consumption. *Alcohol Clin Exp Res*. 2018; Apr 19. doi: 10.1111/acer.13755
5. Seguin D., Gerlai R. Fetal alcohol spectrum disorders: Zebrafish in the analysis of the milder and more prevalent form of the disease. *Behavioral Brain Research*. 2018; Oct 15 (352): 125–132 doi: 10.1016/j.bbr.2017.10.005
6. Jarmasz J.S., Basalah D.A., Chudley A.E., Del Bigio M.R. Human Brain Abnormalities Associated With Prenatal Alcohol Exposure and Fetal Alcohol Spectrum Disorder. *Journal of Neuropathology and experimental neuropathology*. 2017; Sep 1; 76 (9): 813–833 doi: 10.1093/jnen/nlx064
7. Bake S., Tingling J.D., Miranda R.C. Ethanol exposure during pregnancy persistently attenuates cranially directed blood flow in the developing fetus: evidence from ultrasound imaging in a murine second trimester equivalent model. *Alcoholism? Clinical and Experimental Research*. 2012; May; 36 (5): 748–58 doi: 10.1111/j.1530-0277.2011.01676.x
8. Lecuyer M., Laquerrière A., Bekri S., Lesueur C., Ramdani Y., Jégou S., Uguen A., Marcocelles P., Marret S., Gonzalez B.J. PLGF, a placental marker of fetal brain defects after in utero alcohol exposure. *Acta Neuropathol Commun*. 2017; Jun 6.
9. Boschen K.E., Klintsova A.Y. In the Brain: interaction with alcohol exposure during development. *Vitam Horm*. 2017.
10. Wang G., Zhong S., Zhang S.Y., Ma Z.L., Chen J.L., Lu W.H., Cheng X., Chuai M., Lee K.K., Lu D.X., Yang X. Angiogenesis is repressed by ethanol exposure during chick embryonic development. *J Appl Toxicol*.2016; May.
11. Raghunathan R., Wu C., Singh M., Liu C.H., Miranda R.C., Larin K.V. Evaluating the effects of maternal alcohol consumption on murine fetal brain vasculature using optical coherence

- tomography. *J Biophotonics*. 2018; May; 11 (5). doi: 10.1002/jbio.201700238
12. Seleverstov O., Tobiasz A., Jackson J.S., Sullivan R., Ma D., Sullivan J.P., Davison S., Akkhwattanangkul Y., Tate D.L., Costello T., Barnett S., Li W., Mari G., Dopico A.M., Bukiya A.N. Maternal alcohol exposure during mid-pregnancy dilates fetal cerebral arteries via endocannabinoid receptors. *Alcohol*. 2017; Jun; 61: 51–61. doi: 10.1016/j.alcohol.2017.01.014
- Received May 23.2018
Accepted November 6.2018

Solonsky Anatoly V., MD, lead researcher, Laboratory of Clinical Psychoneuroimmunology and Neurobiology, Mental Health Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation. Professor of the Department of Histology, Embryology and Cytology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Potapov Alexey V., MD, Professor of the Department of Histology, Embryology and Cytology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Shumilova Sofya N., a student at the medical faculty, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Logvinov Sergey V., MD, Prof., Head of the Department of Histology, Embryology and Cytology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Gerasimov Alexander V., MD, Professor of the Department of Histology, Embryology and Cytology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Varakuta Elena Yu., MD, Head of the Department of Human Anatomy with a Course of Topographic Anatomy and Operative Surgery, Tomsk, Russian Federation.



Solonsky Anatoly V., anatsol3@gmail.com