

УДК 340.636.1-055.26-053.13:612.017.11

Для цитирования: Шушпанова Т.В., Солонский А.В., Шумилова С.Н., Бохан Н.А. Формирование нейрональных элементов нейроиммунной системы эмбрионального мозга человека при пренатальном влиянии алкоголя. Сибирский вестник психиатрии и наркологии. 2023. № 1 (118). С. 14-22. [https://doi.org/10.26617/1810-3111-2023-1\(118\)-14-22](https://doi.org/10.26617/1810-3111-2023-1(118)-14-22)

## Формирование нейрональных элементов нейроиммунной системы эмбрионального мозга человека при пренатальном влиянии алкоголя

Шушпанова Т.В.<sup>1</sup>, Солонский А.В.<sup>1,2</sup>, Шумилова С.Н.<sup>1,2</sup>, Бохан Н.А.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> НИИ психического здоровья, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук  
Россия, 634014, Томск, ул. Алеутская, 4

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России  
Россия, 634050, Томск, Московский тракт, 2

### РЕЗЮМЕ

**Введение.** Пренатальное воздействие алкоголя неблагоприятно влияет на развивающийся плод, вызывает расстройства алкогольного спектра плода (РАСП) и является распространенной проблемой развития центральной нервной системы человека, но такие исследования крайне редки, хотя и являются значимыми. Алкоголь активирует сигнальные пути врожденного иммунитета в мозге. Нейроиммунные молекулы, экспрессируемые и секретируемые глиальными клетками головного мозга (микроглия, олигодендроглия), изменяют функцию нейронов и в дальнейшем стимулируют развитие алкогольного поведения. В передаче нейроиммунных сигналов участвуют различные сигнальные пути и клетки мозга. Новое понимание молекулярных механизмов, лежащих в основе РАСП, привело к идентификации новых терапевтических мишеней, связанных с нейроиммунной системой. **Цель** исследования заключалась в изучении нейрональных элементов: морфометрических параметров глиобластов, синаптических структур и свойств синаптосомальных ГАМКА-бензодиазепиновых рецепторов нейроиммунной системы в эмбриогенезе мозга человека при пренатальном воздействии алкоголя. **Материал и методы.** В выборку испытуемых были включены женщины репродуктивного возраста (от 25 лет до 41 года), разделение которых происходило по двум параметрам: 1) отсутствие соматической или психической патологии и отсутствие факта употребления алкоголя до зачатия (в период, равный 1 месяцу) и во время беременности; 2) диагностированный алкоголизм I-II стадии длительностью 3-13 лет. Сбор абортингового материала ткани эмбрионального головного мозга (ГМ) человека проводили во время операций по искусственному прерыванию беременности. Из данных образцов с помощью ультратома Ultra-cut-E (Reichert, Австрия) получали полутонкие срезы (0,5-1 мкм), которые окрашивали толуидиновым синим (краситель Ниссля) по стандартной методике. Исследование образцов ткани мозга выполняли с применением светового микроскопа Axio Scope A1 (Carl Zeiss, Германия). При последующей фотосъемке использовалась цифровая камера Canon G10. Параметры ГАМКА-бензодиазепиновых рецепторов изучали с помощью радио-рецепторного анализа [3H]-флуниотразепама (Amersham) на синаптосомных мембранах образцов мозга. Радиоактивный анализ количества связанного лиганда проводили в сцинтилляционном бета-счетчике Rack-beta (LKB). **Результаты.** Выявлены изменения глиобластов в ткани мозга эмбрионов и плодов человека в условиях хронической пренатальной алкоголизации и в зависимости от увеличения срока беременности. Установлено статистически значимое увеличение среднего количества глиобластов – как результат компенсаторной реакции вследствие уменьшения размеров глиобластов ( $p < 0,01$ ) в основной группе женщин с алкогольной зависимостью по сравнению с контрольной группой условно здоровых женщин. Воздействие этанола вызвало снижение аффинности ГАМКА-бензодиазепиновых рецепторов, что влияет на нейрональную пластичность, связанную с развитием и дифференцировкой клеток-предшественников (глиобластов и нейробластов) в период эмбриогенеза головного мозга человека и приводит к подавлению ГАМКергической функции в головном мозге. **Заключение.** Алкоголь воздействует на нейрональную регуляцию врожденного иммунитета в клетках мозга, изменяя экспрессию генов и молекулярные пути, регулирующие нейровоспаление. Динамика изменений глиальных элементов и рецепторной активности в нервной ткани эмбрионов и плодов человека в условиях пренатального воздействия алкоголя свидетельствует о более выраженном влиянии алкоголя на самых ранних стадиях развития эмбриона человека. Активация глиальных клеток в период токсического воздействия алкоголя является необходимой защитной функцией мозга.

**Ключевые слова:** алкоголь, ГАМКА-бензодиазепиновый рецептор, глия, головной мозг, человек, эмбрион.

## ВВЕДЕНИЕ

Воздействие этанола во время беременности вызывает расстройства алкогольного спектра плода (РАСП). Наиболее тяжелой формой РАСП является алкогольный синдром плода – фетальный алкогольный синдром (ФАС), характеризующийся задержкой роста, лицевыми аномалиями и нейроповеденческими изменениями. У некоторых пациентов с РАСП выявляется только часть характеристик ФАС, таких как когнитивные и поведенческие расстройства, не связанные с лицевыми дисморфиями. Высокое и умеренное пренатальное воздействие алкоголя связано с поведенческими и когнитивными проблемами в детстве и подростковом возрасте, связанными с расстройствами настроения, дефицитом рабочей памяти, дефицитом внимания, повышенной агрессией и изменениями поведения [1, 2, 3, 4]. Были идентифицированы важные области головного мозга и нейронные цепи, участвующие в развитии расстройств, связанных с употреблением алкоголя – расстройства алкогольного спектра и с отказом от его употребления [5]. Воздействие алкоголя вызывает дисбаланс нейроиммунной функции и приводит к нарушению функции мозга. Алкоголь активирует сигнальные пути врожденного иммунитета в головном мозге и стимулирует потребление алкоголя [6, 7]. Нейроиммунные молекулы, экспрессируемые и секретируемые глиальными клетками головного мозга, изменяют функцию нейронов и стимулируют алкогольное поведение [2, 7]. Современное понимание молекулярных механизмов, лежащих в основе РАСП, привело к идентификации новых терапевтических мишеней, связанных с нейроиммунной системой [8, 9]. Различные сигнальные пути и клетки мозга участвуют в передаче нейроиммунных сигналов [10, 11]. Врожденная иммунная система в центральной нервной системе (ЦНС) сосредоточена в клетках мозга, которые способны распознавать и реагировать на изменения в нейронном микроокружении. Микроглия и астроциты являются основными иммунными медиаторами в головном мозге, которые отвечают на иммунные сигналы в ЦНС и высвобождают их [12, 13, 14]. Хемокины, цитокины и молекулярные паттерны, связанные с патогенами, активируют различные семейства иммунных рецепторов в головном мозге [15, 16, 17]. Активация микроглии состоит из морфологической трансформации в фагоцитарную, подобную макрофагу клетку [18]. Эта трансформация визуализируется увеличением размеров клеточных тел, уменьшением продолжительности процессов и повышением иммунореактивности. Изучение развития нарушений нейроиммунной системы является основой для разработки эффективных фармакотерапевти-

ческих средств. Алкоголь влияет на нейрональную регуляцию врожденного иммунитета в клетках мозга, изменяя экспрессию генов и молекулярные пути, регулирующие нейровоспаление.

## ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение нейрональных элементов: морфометрических параметров глиобластов, синаптических структур и свойств синапсомных ГАМКА/бензодиазепиновых рецепторов нейроиммунной системы в эмбриогенезе мозга человека при пренатальном воздействии алкоголя.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании приняли участие женщины репродуктивного возраста (от 25 лет до 41 года, средний возраст составил 37 лет). Разделение выборки испытуемых происходило по двум параметрам: 1) отсутствие соматической или психической патологии и отсутствие факта употребления алкоголя до зачатия (в период, равный 1 месяцу) и во время беременности; 2) диагностированный алкоголизм I-II стадии длительностью 3-13 лет. Все участницы исследовательской выборки ранее лечились от алкоголизма, но в период, предшествующий сбору материала для исследования, ни одна из них не принимала дисульфирам. Материал получен при проведении операций по искусственному прерыванию беременности в родильных домах и гинекологических отделениях больниц г. Томска. Процедуры забора abortивного материала выполнены в соответствии с условиями и инструкциями комитета по этике и не противоречат Хельсинкской декларации (1975) и положениям её 5-й редакции (2000). В ходе операций получены образцы эмбрионального материала на сроках от 8 до 15 недель внутриутробного развития. Из общего массива эмбрионального материала сформирована основная группа Алкоголь (А). В зависимости от срока беременности женщин с алкогольной зависимостью выделены две группы: А1 – эмбрионы 8-9 недель гестации, А2 – эмбрионы 10-11 недель гестации. Обе группы включали по 6 образцов ткани эмбрионального мозга. Общая контрольная группа (К), сформированная аналогичным образом из условно здоровых (без соматической или психической патологии) женщин, также включала две группы: К1 – 9 недель гестации и К2 – 10-11 недель гестации, соответственно каждая группа по 7 образцов.

## *Микроскопический и морфометрический анализы*

Исследование эмбриональных образцов проводилось на световом микроскопе Axio Scope A1 (Carl Zeiss, Германия) с предшествующей подготовкой материала: предварительная фиксация в 0,5% растворе глутаральдегида в 0,1 М натрий-фосфатном буфере с pH 7,3-7,4 и дополнительная фиксация в 1% растворе оксида осмия.

Последующая обработка включала обезвоживание в спиртах возрастающей концентрации и заливку в эпоксидные смолы (аралдит). Затем полученные образцы на ультратоме Ultracut-E (Reichert, Австрия) разрезали на полутонкие срезы (0,5-1 мкм) и окрашивали толуидиновым синим (краситель Ниссля) по стандартной методике. В этой работе использовали срезы на уровне промежуточного слоя. При последующей фотосъемке использовалась цифровая камера Canon G10. На основе анализа изменений морфометрических параметров выявлены количественные изменения глиобластов коры головного мозга человека на разных стадиях внутриутробного развития, а также установлена корреляция между степенью дифференцировки перечисленных компонентов ткани и степенью влияния патологический фактор (алкоголь) на процесс развития ткани головного мозга. Для этого использовалась программа AxioVision 4.8, в соответствии с которой определялись диаметр и площадь каждого отдельного элемента, а также среднее количество единиц клеточных структур на единицу площади разреза.

#### Радиорецепторный анализ

Параметры ГАМКА-бензодиазепиновых рецепторов изучали с помощью радиорецепторного анализа [<sup>3</sup>H]-флуниотразепама (Amersham) на синапсомных мембранах образцов мозга, исследованных в диапазоне концентраций от 0,2 до 10 нМ. Концентрация белка в синапсомных мембранах составляла 0,3 мг/мл. Неспецифическое связывание определяли в присутствии нерадиоактивного лиганда в концентрации 10 мкМ. Радиоактивный анализ количества связанного лиганда проводили в сцинтилляционном бета-счетчике Rack-beta (LKB). Константу диссоциации радиолигандного комплекса (Kd) и максимальное количество сайтов специфического связывания (Bmax) определяли путем изучения кинетического связывания в координатах Скэтчарда. Для определения статистической значимости использовалась программа Statistica 10. Программный комплекс включал критерий Манна-Уитни (статистически значимые различия при p<0,05) и t-критерий Стьюдента (p<0,01). Корреляционные связи оценивались с помощью корреляционного анализа для определения ранговой корреляции Спирмена.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение закономерностей развития глиальных клеток эмбрионального мозга выявило, что численный показатель средней площади глиобластов в ткани головного мозга эмбрионов, подвергшихся пренатальному воздействию алкоголя (в группе А1), оказался значительно меньше, чем в контрольной группе (К1). Средние значения периметра клеток статистически значимо отлича-

лись по результатам сравнительного анализа групп А1 и К1, что подтверждается в пренатальном периоде развития повышенным периметром глиобластов в группе К1 по сравнению с таковым показателем в группе А1. Количество клеток в исследуемых образцах ткани головного мозга эмбрионов группы А1 статистически значимо превышало количество клеток в образцах группы К1 (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Динамика основных показателей глиобластов в исследуемых группах

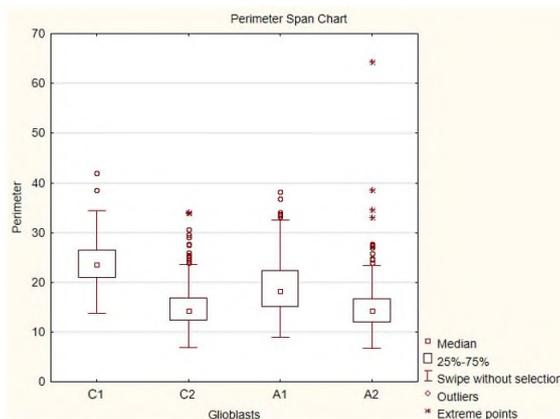
Показатель	Средняя площадь, мкм <sup>2</sup>	Средний периметр, мкм	К-во клеток на 1 мм <sup>2</sup> , шт.
Parameter	Average area, μm <sup>2</sup>	Average perimeter, μm	Number of cells per 1 mm <sup>2</sup> , pcs
Контроль1 (К1)	32,1	23,9	75
Контроль2 (К2)	13,3*	15,0*	160
Алкоголь1 (А1)	21,3*	19,1*	121
Алкоголь2 (А2)	12,9**	14,8**	263

Примечание. Статистически значимые различия: \* – p<0,05 по сравнению с К1, \*\* – p<0,05 по сравнению с А1.

Таким образом, в ходе исследования обнаружено, что в условиях пренатальной алкоголизации рост глиобластов в ткани головного мозга эмбрионов человека на стадии развития 8-9 недель гестации замедляется, при этом количество клеток увеличивается, что можно оценить как компенсаторную реакцию вследствие уменьшения размеров глиобластов в ткани головного мозга эмбрионов в условиях пренатального токсического воздействия алкоголя. При сроке внутриутробного развития человека 10-11 недель гестации между группами исследования К2 и А2 не выявлено статистически значимых различий при сравнении размеров глиобластов (средняя площадь и периметр клеток). Однако на всех исследуемых стадиях эмбриогенеза сохраняется тенденция к увеличению среднего количества глиобластов на единицу площади в тканях головного мозга эмбрионов и плодов, подвергшихся пренатальному воздействию алкоголя, в зависимости от срока беременности женщин (в группах А1 и А2) (табл. 1 и 2, рис. 1).

Т а б л и ц а 2. Корреляционный анализ влияния алкоголя на среднюю площадь глиобластов

K1-K2 C1-C2	A1-A2 A1-A2	K1-A1 C1-A1	K2-A2 C2-A2	Критическое значение (p) Critical value (p)
Уровень значимости				
p=0,000	p=0,000	p=0,000	p=0,167	p=0,050



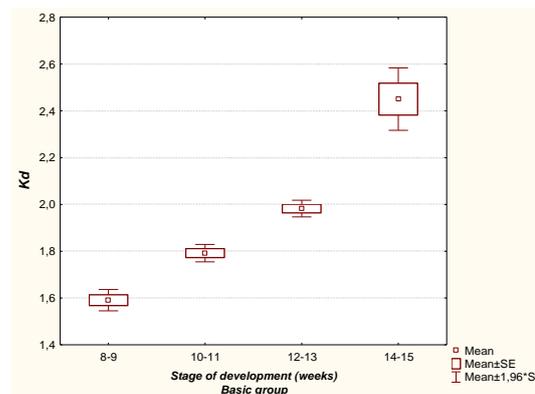
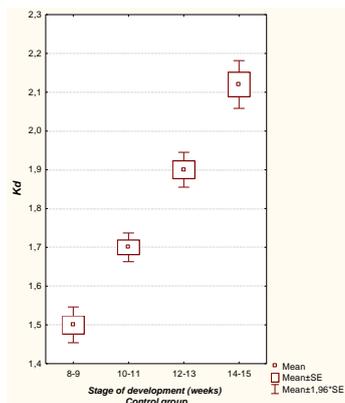
**Рисунок 1. Результаты статистического анализа динамики изменения площади глиобластов в ткани головного мозга эмбрионов в исследуемых группах**

Выявленные изменения могут указывать на процесс замедления развития и дифференцировки клеточных компонентов с компенсаторным увеличением их количества и могут интерпретироваться как защитная, компенсаторная реакция глии на пренатальное воздействие этанола. Полученные результаты свидетельствуют о морфометрических изменениях мозговой ткани эмбрионов и плодов человека в условиях хронической пренатальной алкоголизации. Данное положение подтверждается тем, что с увеличением гестационного возраста в основной группе А происходит статистически значимый рост среднего количества исследуемых структур по сравнению с контрольной группой К. Динамика изменений глиальных элементов в нервной ткани эмбрионов и плодов человека в условиях пренатального воздействия алкоголя свидетельствует о более выраженном вреде алкоголя на самых ранних стадиях развития эмбриона человека, что имеет большое практическое значение при планировании беременности и служит доказательством недопустимости алкоголизации матери во избежание негативных последствий у потомства.

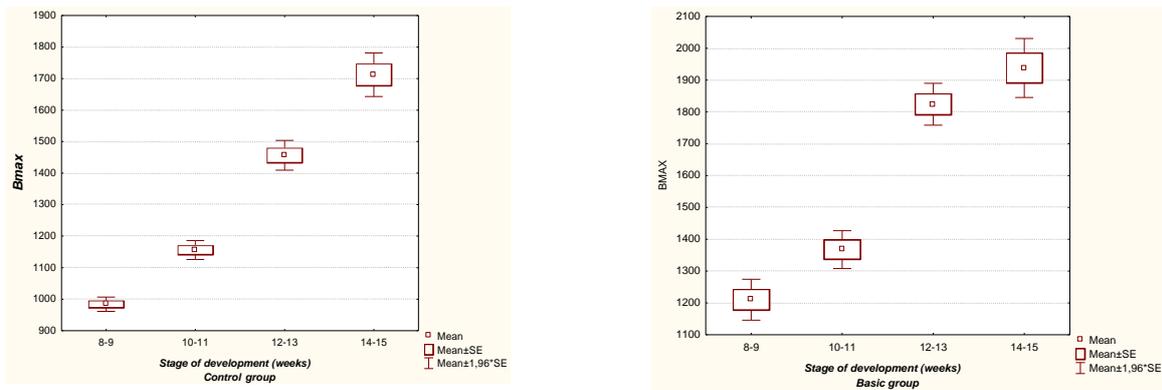
**Радиорецепторный анализ ГАМКА/бензодиазепиновых рецепторов синаптических структур ткани головного мозга**

Радиорецепторный анализ связывания селективного лиганда [<sup>3</sup>H]-флунизтазема с фракцией мембран образцов ткани головного мозга эмбрионов и плодов человека в нормальных условиях и в условиях пренатального воздействия алкоголя продемонстрировал, что свойства бензодиазепиновых рецепторов (БДР) синаптосомные мембраны ткани головного мозга эмбрионов и плодов человека не одинаковы в разные периоды развития.

Так, в контрольной группе сродство рецепторов в головном мозге эмбрионов и плодов человека снижалось в период развития 8-9-12-13 недель гестации. При этом возрастала константа диссоциации (Kd) – с 1,5 до 2,12 нМ. В основной группе сродство бензодиазепиновых рецепторов в головном мозге эмбрионов и плодов характеризовалось более низкими значениями на всех изученных стадиях развития по сравнению с контрольной группой, что вырождалось в увеличении абсолютных значений Kd – с 1,59 до 2,45 нМ (рис. 2 и 3).



**Рисунок 2. Результаты статистического анализа динамики изменения параметра связывания (Kd) [<sup>3</sup>H]флунизтазема с мембранами синаптосом эмбрионального мозга человека в исследуемых группах**



**Р и с у н о к 3. Результаты статистического анализа динамики изменения параметра связывания (Bmax)  $[^3\text{H}]$ флунизтрапеама с мембранами синапсом эмбрионального мозга человека в исследуемых группах**

В основной группе динамика происходивших изменений не была линейной. Количество рецепторов в головном мозге эмбрионов и плодов человека в контрольной группе в период развития 8-9-12-13 недель гестации увеличивалось, но с некоторым замедлением на 10-й неделе развития. Количество рецепторов на всех изученных стадиях развития эмбрионов и плодов в основной группе было статистически значимо выше, чем в контрольной группе, что отражает компенсаторный характер при снижении сродства рецепторов. Динамика изменения количества рецепторов носила нелинейный характер, что было более выражено в основной группе.

Полученные данные указывают на структурно-функциональную взаимосвязь между развитием рецепторов и синаптогенезом молодых клеточных элементов коры головного мозга человека при материнском алкоголизме во время беременности, что выражается в появлении структурных компонентов синапсов и бензодиазепиновых рецепторов с одновременным совпадением периода задержки созревания на 10-й неделе развития. Следовательно, способность процессов нормального функционирования и аллостерической модуляции комплекса ГАМКА-бензодиазепиновый рецептор в синаптических мембранах, регулирующих общие процессы торможения в центральной нервной системе, снижается. Нами обнаружено, что употребление алкоголя матерями во время беременности влияет не только на свойства ГАМКА-бензодиазепиновых рецепторов, но и на развитие центральной нервной системы эмбрионов и плодов посредством этих рецепторов.

Наблюдается снижение сродства ГАМКА-бензодиазепиновых рецепторов в головном мозге плодов и эмбрионов на разных стадиях развития под влиянием материнского алкоголизма по сравнению с образцами контрольной группы с увеличением количества рецепторов. Эти процессы можно рассматривать как компенсаторную реак-

цию, направленную на адаптацию нервной системы эмбриона и плода к условиям функциональной недостаточности ГАМКергической нейротрансмиссии.

Собственные данные показывают, что воздействие этанола снижает сродство к ГАМКА-бензодиазепиновым рецепторам, что влияет на нейропластичность, связанную с ростом, дифференцировкой и развитием глиобластов и нейробластов (клеток-предшественников) в период эмбриогенеза. Это вызывает нарушение взаимосвязей эмбриональных клеток мозга и приводит к явлению преувеличенного апоптоза вследствие активации глиальных клеток, нарушению нейроиммунной функции, изменениям активности нейрональной сети, нарушению баланса возбуждающих и тормозных эффектов [18, 19, 20, 21]. Активация глии – это проявление компенсаторной реакции, вызванной нейропластическими изменениями и направленной на адаптацию развивающегося мозга эмбриона и плода в условиях нейротоксичности и гипоксии под действием этанола. Микроглия является фундаментальной основой для формирования нормальных процессов в ЦНС, включая нейрогенез [13, 14], а также образования, роста и функционирования нейронных элементов, таких как синапсы и рецепторы [21, 22, 23]. Функции головного мозга координируются путем взаимодействия основных элементов нервных цепей: глиальных элементов, рецепторов и синапсов. Глиальные клетки головного мозга выполняют иммунную функцию, контактируя с синаптическими элементами нейронов, расширяя и сокращая их отростки.

#### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Глия играет важную роль в развитии мозга, регулируя функцию нейрональной сети. Нарушение гомеостатической роли глии может привести к дисфункции нейронов и развитию патологии. Активация глиальных клеток в период токсического воздействия или вследствие другой патоло-

гии – необходимая защитная функция мозга. Глиальные клетки контролируют возбуждение нейронов, регуляцию синаптической пластичности и высвобождение нейротрофических факторов. Они окружают сомы высокоактивных нейронов, чтобы уменьшить возбуждение, а также мигрировать и смещать синапсы с тормозной функцией в нейронах коры головного мозга для повышения экспрессии «нейрозащитных молекул» в нейронах. Таким образом, изменение активности микроглии вызывает нарушение нормальной нейрональной активности, увеличение нейротоксичности, вызванной этанолом, вследствие этого оказывает воздействие на различные нейроиммунные молекулы. Динамика изменений глиальных элементов и рецепторной активности в нервной ткани эмбрионов и плодов человека в условиях пренатального воздействия алкоголя свидетельствует о более выраженном влиянии алкоголя на самых ранних стадиях развития эмбриона человека. Активация глиальных клеток в период токсического воздействия алкоголя является необходимой защитной функцией головного мозга.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов в связи с публикацией совместной статьи.

#### СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Работа соответствует этическим стандартам Хельсинской декларации ВМА и одобрена локальным этическим комитетом при НИИ психического здоровья Томского НИМЦ (протокол № 147 от 22.11.2021 г., дело № 147/5.2021).

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет бюджетного финансирования по основному плану НИР 2022-2026 гг. «Мультидисциплинарное исследование клинической гетерогенности и патобиологических механизмов прогрессивного развития аддиктивных расстройств с разработкой инновационных программ терапии и дифференцированной профилактики» (номер госрегистрации 122020200053-1).

#### ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Erickson EK, Grantham EK, Warden AS, Harris RA. Neuroimmune signaling in alcohol use disorder. *Pharmacol Biochem Behav.* 2019 Feb;177:34-60. doi: 10.1016/j.pbb.2018.12.007. Epub 2018 Dec 24. PMID: 30590091; PMCID: PMC6946054.
2. O'Leary CM, Bower C, Zubrick SR, Geelhoed E, Kurinczuk JJ, Nassar N. A new method of prenatal alcohol classification accounting for dose, pattern and timing of exposure: improving our ability to examine fetal effects from low to moderate alcohol. *J Epidemiol Community Health.* 2010 Nov; 64(11):956-62. doi: 10.1136/jech.2009.091785. Epub 2009 Oct 19. PMID: 19843498.
3. Riley EP, Infante MA, Warren KR. Fetal alcohol spectrum disorders: an overview. *Neuropsychol Rev.* 2011 Jun;21(2):73-80. doi: 10.1007/s11065-011-9166-x. Epub 2011 Apr 16. PMID: 21499711; PMCID: PMC3779274.
4. Manthey J, Shield KD, Rylett M, Hasan OSM, Probst C, Rehm J. Global alcohol exposure between 1990 and 2017 and forecasts until 2030: a modelling study. *Lancet.* 2019 Jun 22;393(10190):2493-2502. doi: 10.1016/S0140-6736(18)32744-2. Epub 2019 May 7. PMID: 31076174.
5. Koob GF, Volkow ND. Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. *Lancet Psychiatry.* 2016 Aug;3(8):760-773. doi: 10.1016/S2215-0366(16)00104-8. PMID: 27475769; PMCID: PMC6135092.
6. Cuzon VC, Yeh PW, Yanagawa Y, Obata K, Yeh HH. Ethanol consumption during early pregnancy alters the disposition of tangentially migrating GABAergic interneurons in the fetal cortex. *J Neurosci.* 2008 Feb 20;28(8):1854-64. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5110-07.2008. PMID: 18287502; PMCID: PMC6671430.
7. Mayfield J, Harris RA. The Neuroimmune Basis of Excessive Alcohol Consumption. *Neuropsychopharmacology.* 2017 Jan;42(1):376. doi: 10.1038/npp.2016.177. PMID: 27909320; PMCID: PMC5143494.
8. Shushpanova TV, Lebedeva VF, Bokhan NA, Solonskii AV, Udut VV. The effect of chronic alcohol abuse on the benzodiazepine receptor system in various areas of the human brain. *Journal of Psychiatry.* 2016;19(3):1000365(1-6).
9. Shushpanova TV, Solonskii AV, Shushpanova OV. Molecular-cellular targets of the pathogenic action of ethanol on the human brain in ontogenesis and the possibility of targeted therapy aimed at correcting the effect of the pathogenic factors. In Book: *Drug Addiction.* Edited by Fang Zhao and Meng Li. London, 2018. doi: 10.5772/intechopen.73333.
10. Dantzer R. Neuroimmune Interactions: from the Brain to the Immune System and Vice Versa. *Physiol Rev.* 2018 Jan 1;98(1):477-504. doi: 10.1152/physrev.00039.2016. PMID: 29351513; PMCID: PMC5866360.
11. Nisticò R, Salter E, Nicolas C, Feligioni M, Mango D, Bortolotto ZA, Gressens P, Collingridge GL, Peineau S. Synptoimmunology – roles in health and disease. *Mol Brain.* 2017 Jun 20;10(1):26. doi: 10.1186/s13041-017-0308-9. PMID: 28637489; PMCID: PMC5480158.
12. Miyamoto A, Wake H, Moorhouse AJ, Nabekura J. Microglia and synapse interactions: fine tuning neural circuits and candidate molecules. *Front Cell Neurosci.* 2013 May 15;7:70. doi: 10.3389/fncel.2013.00070. PMID: 23720611; PMCID: PMC3654203.
13. Akiyoshi R, Wake H, Kato D, Horiuchi H, Ono R, Ikegami A, Haruwaka K, Omori T, Tachibana Y, Moorhouse AJ, Nabekura J. Microglia Enhance

- Synapse Activity to Promote Local Network Synchronization. *eNeuro*. 2018 Oct 25;5(5): ENEURO.0088-18.2018. doi: 10.1523/ENEURO.0088-18.2018. PMID: 30406198; PMCID: PMC6220592.
14. Andoh M, Koyama R. Microglia regulate synaptic development and plasticity. *Dev Neurobiol*. 2021 Jul;81(5):568-590. doi: 10.1002/dneu.22814. Epub 2021 Mar 8. PMID: 33583110; PMCID: PMC8451802.
  15. Skaper SD, Facci L, Zusso M, Giusti P. An Inflammation-Centric View of Neurological Disease: Beyond the Neuron. *Front Cell Neurosci*. 2018 Mar 21;12:72. doi: 10.3389/fncel.2018.00072. Erratum in: *Front Cell Neurosci*. 2020 Feb 03;13:578. PMID: 29618972; PMCID: PMC5871676.
  16. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*. 2005 May 27;308(5726):1314-8. doi: 10.1126/science.1110647. Epub 2005 Apr 14. PMID: 15831717.
  17. Ohsawa K, Kohsaka S. Dynamic motility of microglia: purinergic modulation of microglial movement in the normal and pathological brain. *Glia*. 2011 Dec;59(12):1793-9. doi: 10.1002/glia.21238. Epub 2011 Sep 7. PMID: 21901756.
  18. Dantzer R, Wollman EE. Les inter-relations entre le système nerveux et le système immunitaire [Relationships between the brain and the immune system]. *J Soc Biol*. 2003;197(2):81-8. French. PMID: 12910622.
  19. Aronne MP, Guadagnoli T, Fontanet P, Evrard SG, Brusco A. Effects of prenatal ethanol exposure on rat brain radial glia and neuroblast migration. *Exp Neurol*. 2011 Jun;229(2):364-71. doi: 10.1016/j.expneurol.2011.03.002. Epub 2011 Mar 21. PMID: 21414313.
  20. Cuzon VC, Yeh PW, Yanagawa Y, Obata K, Yeh HH. Ethanol consumption during early pregnancy alters the disposition of tangentially migrating GABAergic interneurons in the fetal cortex. *J Neurosci*. 2008 Feb 20;28(8):1854-64. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5110-07.2008. PMID: 18287502; PMCID: PMC6671430.
  21. Abbott CW, Rohac DJ, Bottom RT, Patadia S, Huffman KJ. Prenatal ethanol exposure and neocortical development: a transgenerational model of FASD. *Cereb Cortex*. 2018 Aug 1;28(8):2908-2921. doi: 10.1093/cercor/bhx168. PMID: 29106518; PMCID: PMC6041800.
  22. Sicher A, Kiss S, Springmann P, Herrera K, McElroy A, Blake K, Crocker E, Jacob C, Lefkove M, Cramer M, Henriksen A, Novacek J, Severa J, Siferski J, Thomas E, Chi P, Favero C. Moderate prenatal alcohol exposure increases total length of L1-expressing axons in E15.5 mice. *Neurotoxicol Teratol*. 2021 May-Jun;85:106962. doi: 10.1016/j.ntt.2021.106962. Epub 2021 Feb 23. PMID: 33636300; PMCID: PMC8567191.
  23. Shushpanova TV, Solonskii AV, Novozheeva TP, Udut VV. Effect of meta-chlorobenzhydryl urea (m-CIBHU) on benzodiazepine receptor system in rat brain during experimental alcoholism. *Bull Exp Biol Med*. 2014 Apr;156(6):813-8. doi: 10.1007/s10517-014-2458-4. Epub 2014 May 3. PMID: 24824705.

Поступила в редакцию 17.12.2022  
Утверждена к печати 24.02.2023

Шушпанова Тамара Владимировна, к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клинической психонейроиммунологии и нейробиологии, НИИ психического здоровья Томского НИМЦ. SPIN-код 9158-9235. ResearcherID J-2817-2017. ORCID iD 0000-0002-9455-0358.

Солонский Анатолий Владимирович, д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клинической психонейроиммунологии и нейробиологии, НИИ психического здоровья Томского НИМЦ; профессор кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии, Сибирский государственный медицинский университет МЗ РФ. SPIN-код 6687-9620. ResearcherID O-3610-2016. ORCID iD 0000-0002-843-5833. anatsol3@gmail.com

Шумилова Софья Николаевна, м.н.с. лаборатории клинической психонейроиммунологии и нейробиологии, НИИ психического здоровья Томского НИМЦ; аспирант кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии, Сибирский государственный медицинский университет МЗ РФ. sofashumilova97@gmail.com

Бохан Николай Александрович – академик РАН, д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, руководитель отделения аддиктивных состояний, директор НИИ психического здоровья, заведующий кафедрой психиатрии, наркологии и психотерапии, Сибирский государственный медицинский университет МЗ РФ. Author ID Scopus 6506895310. ORCID iD 0000-0002-1052-855X. ResearcherID P-1720-2014. Author ID РИНЦ 152392. SPIN-код РИНЦ 2419-1263.

✉ Шушпанова Тамара Владимировна, shush59@mail.ru; mental@tnimc.ru

UDC 340.636.1-055.26-053.13:612.017.11

For citation: Shushpanova T.V., Solonsky A.V., Shumilova S.N., Bokhan N.A. Formation of neuronal elements of the neuroimmune system of the human embryonic brain under the prenatal influence of alcohol. *Siberian Herald of Psychiatry and Addiction Psychiatry*. 2023; 1 (118): 14-22. [https://doi.org/10.26617/1810-3111-2023-1\(118\)-14-22](https://doi.org/10.26617/1810-3111-2023-1(118)-14-22)

## Formation of neuronal elements of the neuroimmune system of the human embryonic brain under the prenatal influence of alcohol

Shushpanova T.V.<sup>1</sup>, Solonsky A.V.<sup>1,2</sup>, Shumilova S.N.<sup>1,2</sup>, Bokhan N.A.<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup> *Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Siberian State Medical University"  
Moskovsky Trakt 20, 634050, Tomsk, Russian Federation*

### ABSTRACT

**Introduction.** Prenatal alcohol exposure affects the developing fetus, causes fetal alcohol spectrum disorders (FASD), and is a common human central nervous system developmental problem, but such studies are extremely rare, although significant. Alcohol activates innate immune signaling pathways in the brain. Neuroimmune molecules expressed and secreted by brain glial cells (microglia, oligodendroglia) alter neuronal function and further stimulate the development of alcohol behavior. Various signaling pathways and brain cells are involved in the transmission of neuroimmune signals. New understanding of the molecular mechanisms underlying FASD has led to the identification of new therapeutic targets associated with the neuroimmune system. **Objective:** to study neuronal elements: morphometric parameters of glioblasts, synaptic structures, and properties of synaptosomal GABA-benzodiazepine receptors of the neuroimmune system in human brain embryogenesis under prenatal alcohol exposure. **Material and Methods.** The sample of subjects included women of reproductive age (from 25 years to 41 years), the dividing of whom took place according to two parameters: 1) the absence of somatic or mental pathology and the absence of alcohol consumption before conception (in a period of 1 month) and during time of pregnancy; 2) diagnosed alcoholism stage I-II lasting 3-13 years. The collection of abortive material from human embryonic brain (HB) tissue was carried out during operations for artificial termination of pregnancy. Using an Ultracut-E ultratome (Reichert, Austria), semi-thin sections (0.5-1  $\mu\text{m}$ ) were obtained from these samples, which were stained with toluidine blue (Niessl dye) according to the standard method. The study of brain tissue samples was performed using an Axio Scope A1 light microscope (Carl Zeiss, Germany). For the subsequent photography, a Canon G10 digital camera was used. Parameters of GABA-benzodiazepine receptors were studied using radioreceptor analysis of [<sup>3</sup>H]-flunitrazepam (Amersham) on synaptosomal membranes of brain samples. Radioactive analysis of the amount of bound ligand was performed in a Rack-beta (LKB) scintillation beta counter. **Results.** Changes in glioblasts in the brain tissue of human embryos and fetuses in the conditions of chronic prenatal alcoholization and depending on the increase in the duration of pregnancy were revealed. A statistically significant increase in the average number of glioblasts was found as a result of a compensatory reaction due to a decrease in the size of glioblasts ( $p < 0.01$ ) in the main group of women with alcohol dependence compared to the control group of apparently healthy women. Ethanol exposure caused a decrease in the affinity of GABA-benzodiazepine receptors, that affected neuronal plasticity associated with the development and differentiation of progenitor cells (glioblasts and neuroblasts) during human brain embryogenesis and led to suppression of GABAergic function in the brain. **Conclusion.** Alcohol affects the neuronal regulation of innate immunity in brain cells by altering gene expression and molecular pathways that regulate neuroinflammation. The dynamics of changes in glial elements and receptor activity in the nervous tissue of human embryos and fetuses in the conditions of prenatal alcohol exposure indicates a more pronounced effect of alcohol at the earliest stages of human embryo development. Activation of glial cells during the period of toxic effects of alcohol is a necessary protective function of the brain.

**Keywords:** alcohol, GABA-benzodiazepine receptor, glia, brain, human, embryo.

Received December 17.2022

Accepted February 24.2023

Shushpanova Tamara V., Cand.Sc. (Medicine), lead researcher, Laboratory of Clinical Psychoneuroimmunology and Neurobiology, Mental Health Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation. ResearcherID J-2817-2017. Author ID Scopus 6506299310. ORCID iD 0000-0002-9455-0358. SPIN-code 9455-0358. Author ID 974543.

Solonsky Anatoly V., D.Sc. (Medicine), Prof., 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, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Siberian State Medical University", Tomsk, Russian Federation. SPIN-code 6687-9620. ResearcherID O-3610-2016. Author ID Scopus 6603017683. ORCID iD 0000-0002-1843-5833. anatsol3@gmail.com

Shumilova Sofia N., junior researcher, Laboratory of Clinical Psychoneuroimmunology and Neurobiology, Mental Health Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation; graduate student of the Department of Histology, Embryology and Cytology, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Siberian State Medical University", Tomsk, Russian Federation. so-fashumilova97@gmail.com

Bokhan Nikolay A., academician of RAS, D.Sc. (Medicine), Professor, Honored Scientist of the Russian Federation, Head of Addictive States Department, director of Mental Health Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences; Head of the Department of Psychiatry, Addiction Psychiatry and Psychotherapy, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation. Author ID Scopus 6506895310. ORCID iD 0000-0002-1052-855X. ResearcherID P-1720-2014. Author ID RSCI 152392. SPIN-code RSCI 2419-1263.

✉ Shushpanova Tamara V., shush59@mail.ru; mental@tnimc.ru