

TERATOGENNE DZIAŁANIE ALKOHOLU

Wanda Dyr

Zakład Farmakologii i Fizjologii Układu Nerwowego
Instytut Psychiatrii i Neurologii w Warszawie

TERATOGENIC ACTION OF ALCOHOL

ABSTRACT – Maternal alcohol drinking might be deleterious to the developing fetus. At present, studies concentrate more on the teratogenicity of alcohol *per se* than conditions associated with chronic alcoholism. Severity and nature of behavioral alterations varies markedly among children of women who drink during pregnancy. One important determinant of this variation may be genetic differences in the response to alcohol. In animal studies, the high-alcohol-sensitive (HAS) and low-alcohol-sensitive (LAS) rats were used to study the consequences of developmental alcohol exposed to 6.0 g/kg/day on Postnatal Days (PD) 4-9, a period of brain development equivalent to the third trimester. Ethanol-exposed HAS rats were more impaired on the motor coordination task compared with LAS rats. There were no differences in peak blood alcohol level between the lines, indicating that vulnerability to ethanol's teratogenic effects was not due to differences in metabolic rate. These results suggest that genetic differences in response to alcohol may serve as a predictor for susceptibility to ethanol's teratogenic rate.

The dose-dependence of the effect of maternal alcohol on hippocampal c-Fos expression was examined in infant rats. The results have been shown that expression of c-Fos in the hippocampus is decreased following treatment with alcohol in a dose-dependent function. This finding can be suggested that suppression of c-Fos expression in the hippocampus of infant rats with maternal alcohol administration mediates the associated developmental retardation and anomalies.

Risk factors directly or indirectly affect mechanisms of alcohol teratogenesis. Anomalies associated with FAS may arise from excess oxygenated free radicals that can severely damage neural cells. Fetal alcohol exposure increased levels of lipid peroxidation in all brain areas measured in rats, including neocortex, hippocampus and cerebellum.

Animal models should continue to be productive in increasing our understanding of teratogenic mechanism of action of alcohol.

Key words: teratogenic action of alcohol, animal models, c-Fos, ethanol.

STRESZCZENIE – Picie alkoholu przez kobiety w czasie ciąży może być szkodliwe dla rozwoju płodu. Współczesne badania koncentrują się na teratogennym działaniu alkoholu *per se*. Zmiany behawioralne i intelektualne potomstwa, którego matki spożywały alkohol w czasie ciąży, są zróżnicowane. Jedną z głównych przyczyn tych zmian mogą być uwarunkowania genetyczne, które są badane z zastosowaniem zwierzęcych modeli, głównie u gryzoni. U szczurów rozwój mózgu między 4. a 9. dniem życia odpowiada rozwojowi mózgu w trzecim trymestrze ciąży. Ta korelacja umożliwia badanie wpływu alkoholu na ośrodkowy układ nerwowy płodu. Szczury HAS (*high alcohol sensitive*) poddane działaniu alkoholu od 4. do 9. dnia życia wykazywały w 30. dniu życia znaczne osłabienie koordynacji ruchowej. Podobnego odchylenia od normy nie stwierdzono u szczurów LAS (*low alcohol sensitive*). Poziom alkoholu we krwi szczurów obydwu linii był zbliżony, co wskazuje, że teratogeny efekt nie był spowodowany różnicami w metabolizmie alkoholu. Wyniki badań mogą wskazywać na udział genetycznych czynników w teratogennym działaniu alkoholu.

Stwierdzono mniejszą ekspresję genu *c-Fos* w hipokampie szczurów poddawanych działaniu alkoholu w okresie prenatalnym. Zmniejszona ekspresja tego genu może być jedną z przyczyn opóźnienia rozwojowego u dzieci. Dysfunkcje występujące w zespołach FAS (*fetal alcohol syndrome*) mogą być również wynikiem nadmiernej ilości wolnych rodników tlenowych uszkadzających neurony.

Słowa kluczowe: teratogenne działanie alkoholu, *c-Fos*, zwierzęce modele, etanol.

Szkodliwy wpływ picia alkoholu w czasie ciąży na rozwój płodu był znany od dawna, ale rozpoznanie tzw. alkoholowego zespołu płodowego (*fetal alcohol syndrome – FAS*) pojawiło się niedawno. Zespół, określany przez nieprawidłowości w budowie twarzy lub inne dysmorficzne cechy a także, co ważniejsze, upośledzone funkcje poznawcze i behawioralne oraz problemy emocjonalne były bezpośrednio powiązane z nadmiernym piciem alkoholu przez matkę. Bezpośredni związek był jednak coraz bardziej podważany w miarę postępu badań, które zaczęły się bardziej koncentrować na teratogennym działaniu alkoholu *per se*.

Prenatalne działanie alkoholu może powodować upośledzenie rozwoju umysłowego, ale nie u wszystkich dzieci lub też tylko u tych z dysmorficznymi cechami zespołu FAS. Funkcjonuje pogląd, że działanie alkoholu podczas życia płodowego zmniejsza plastyczność mózgu w dalszym rozwoju i radzeniu sobie z wyzwaniami życia.

FAS występuje w ilości niewiele mniejszej niż u 10% dzieci kobiet nadużywających alkoholu w czasie ciąży. Podobnie zwierzęta poddane działaniu alkoholu w życiu płodowym wykazują w okresie neonatalnym różne zachowania dotyczące tego samego miotu. Tak więc zasadniczym pytaniem jest, czy istnieją czynniki ryzyka, które czynią same kobiety lub ich płody bardziej podatne na działanie teratogenne alkoholu.

Do czynników wpływających na teratogenne działanie alkoholu mogą należeć: uwarunkowania genetyczne, ilość spożywanego alkoholu, struktura spożycia, przyjmowanie leków i innych substancji psychoaktywnych, odżywianie.

Czynniki genetyczne

Badania na zwierzętach wykazały, że podatność płodu na efekt dawki alkoholu zależy częściowo od genotypu (24). Na przykład, stwierdzono, że myszy CBA były bardziej podatne na dawkę alkoholu wywołującą śmierć płodu, zmniejszenie wagi płodu i nieprawidłowości w budowie tkanek miękkich i szkieletowych niż myszy z grupy C3H (4). W tym przypadku, różnice w podatności na teratogenne działanie alkoholu były skorelowane z różnym metabolizmem alkoholu w obydwu grupach zwierząt. Myszy CBA wykazywały wolniejszy metabolizm alkoholu, wyższy poziom alkoholu we krwi i w konsekwencji w tej grupie myszy wystąpiły wyraźniej silniej zaznaczone anomalie.

Nie zawsze podwyższony poziom alkoholu we krwi koreluje z wielkością jego teratogennego działania. U szczurów z gatunku MR w porównaniu do szczurów M520 stwierdzono znaczną redukcję wagi mózgu (8) pomimo wyraźnego trendu do obniżonego poziomu alkoholu we krwi. U różnych gatunków myszy, jak C7BL/6J, DBA/2J i A/J stwierdzono podobny poziom alkoholu we krwi pomimo wyraźnych różnic w rozwojowych wadach wrodzonych. Co więcej, specyficzne zmiany powstałe w wyniku działania alkoholu w okresie życia płodowego są zależne od genotypu. Na przykład, myszy Swiss Webster są bardziej podatne na umieranie płodów, podczas gdy myszy DBA/2J są bardziej podatne na uszkodzenia wzroku i nerek (7).

Tak więc, określony genotyp może być podatny na pewne teratogenne efekty etanolu, ale może być niewrażliwy na inne.

Okres między 4. a 9. dniem życia szczura określany jest jako wczesny okres postnatalny. Rozwój ośrodkowego układu nerwowego szczura w tym czasie odpowiada rozwojowi o.u.n. w trzecim trymestrze ciąży. Stosując taki model zwierzęcy można obserwować teratogenne efekty alkoholu.

Szczury HAS (*high alcohol sensitive*) wykazują znacznie wydłużony czas snu po podaniu jednorazowej nasennej dawki alkoholu w przeciwieństwie do szczurów LAS (*low alcohol sensitive*). Podając alkohol od 4. do 9. dnia życia zwierzętom obydwu linii wykazano, że zdolność wykonania określonego zadania motorycznego jest wyraźnie zaburzona w 30. dniu życia szczurów HAS (29). Wyniki eksperymentu wykazały, że działanie alkoholu w okresie wczesnorozwojowym wyraźnie osłabia zdolność motoryczną szczurów z linii HAS w porównaniu do szczurów LAS. Co więcej, nie stwierdzono różnic w poziomach alkoholu we krwi zwierząt obydwu linii (29), co wskazuje w sposób jednoznaczny, że podatność na teratogenne działanie alkoholu nie jest wynikiem różnego metabolizmu alkoholu. Trudno jest wytłumaczyć, co dokładnie powoduje tę odmienną wrażliwość obydwu linii szczurów i obecnie nie bardzo wiadomo, czy istnieją genotypowo-zależne różnice w rozwoju neuronalnym. Z badań wynika, że etanol działa redukująco na błony korowe szczurów HAS, ale nie LAS (29).

W badaniach z zastosowaniem wyselekcjonowanych linii szczurów preferujących (P) i nie preferujących (NP) alkohol wykazano, że teratogenne działanie alkoholu ujawnia się w różnych aspektach behawioralnych. I tak, w czasie największego rozwoju mózgu u tych zwierząt, tj. w 4.-10. dniu życia podawano im 6 g/kg alkoholu

w mlecznym pożywieniu. Efekt tego podawania badano 21. i 43. dnia życia testując zdolność chodu i równowagi z zastosowaniem określonych metod behawioralnych (równia lekko nachylona). Wykazano, że działanie alkoholu w okresie neonatalnym powoduje zwiększoną liczbę upadków oraz zakłócenia chodu u obydwu linii zwierząt (17). Jednakże w innych badaniach tych samych autorów wykazano nadaktywność motoryczną u szczurów P w porównaniu do szczurów NP (18), z czego można wnioskować, że zróżnicowana wrażliwość na alkohol ujawnia się w określonych parametrach behawioralnych.

Szkodliwy wpływ alkoholu w okresie prenatalnym na ośrodkowy układ nerwowy jest jedną z najważniejszych przyczyn upośledzenia umysłowego w rozwoju osobniczym. Zmiana aktywności neuronalnej hipokampa może wywierać bardzo duży wpływ na zdolność uczenia się i zapamiętywania (12, 15).

Znaczenie hipokampa w teratogennym działaniu alkoholu

Hipokamp jest strukturą mózgową, która w znacznej mierze odpowiada za tworzenie pamięci i zdolność uczenia się. Uszkodzenie hipokampa osłabia pamięć przestrzenną i proces uczenia się (6, 14, 27). Na ten proces, jak i samą strukturę mózgową, alkohol wywiera szkodliwy wpływ (21).

Ekspresja genu wczesnej odpowiedzi *c-Fos* jest dobrym wskaźnikiem zmian aktywności neuronalnej, powstającej w wyniku działania różnych form bodźców np. elektrycznych, chemicznych, a także naturalnych (5). Uważa się, że ekspresja *c-Fos* zwiększa się w całym hipokampie w wyniku poprawy pamięci przestrzennej (11). Najnowsze badania wykazały, że alkohol hamuje indukcję ekspresji tego genu w hipokampie oraz powoduje osłabienie pamięci (25).

Wyniki powyższych badań stały się przesłanką do podjęcia badań w celu określenia wpływu alkoholu na hipokamp w okresie życia płodowego. Samicom szczura, w czterech oddzielnych grupach, począwszy od 15. dnia ciąży przez 7 dni, podawano alkohol w dawkach 0,5 g/kg, 1 g/kg i 2 g/kg, grupa kontrolna otrzymywała sól fizjologiczną. U wszystkich nowonarodzonych szczurów w 3. i 5. tygodniu życia oznaczano ekspresję genu *c-Fos* w hipokampie. Wykazano, że ekspresja tego genu w regionie CA1, CA2 i zakręcie zębatym była w porównaniu z kontrolą, znacząco mniejsza w sposób dawkozależny od alkoholu w obu grupach zwierząt (13). Wyniki badań autorów wyraźnie wykazują, że podawanie alkoholu ciężarnym samicom w sposób dawkozależny tłumi ekspresję genu *c-Fos* w różnych regionach hipokampa w okresie neonatalnym. Teratogenne działanie alkoholu na ośrodkowy układ nerwowy płodu może być powodem dysfunkcji intelektualnej, behawioralnej i motorycznej w rozwoju osobniczym. Jednymi z miejsc teratogennego działania alkoholu w tym układzie jest hipokamp, który odgrywa dominującą rolę w procesie uczenia się i pamięci. Prenatalne działanie alkoholu zmniejsza liczbę CA1 neuronów piramidowych hipokampa u dorosłych gryzoni (1), osłabia pamięć przestrzenną u młodych i dorosłych szczurów (16). Badania wykazały, że alkohol w dawkozależny sposób bardzo silnie hamuje aktywność synaptyczną hipokampa u młodych szczurów pod-

dawanych działaniu alkoholu w życiu płodowym (16). Działanie alkoholu na aktywność komórkową hipokampa jest prawdopodobnie jedną z głównych przyczyn trudności w nauce i możliwości zapamiętywania. Jang i wsp. (13) wnioskuje, że spożywanie alkoholu w czasie ciąży hamuje w życiu neonatalnym ekspresję genu *c-Fos* w różnych regionach hipokampa, co może leżeć u podstaw chorób rozwojowych potomstwa.

Mechanizm teratogennego działania alkoholu

Wszystkie czynniki ryzyka bezpośrednio lub pośrednio mają wpływ na teratogenne działanie alkoholu. Uważa się, że niedotlenienie, wolne rodniki oraz dysregulacja neuronalnych czynników troficznych najbardziej przemawiają za tą hipotezą (2). Rozwój neuronalny jest kontrolowany przez tkankowo-specyficzne czynniki troficzne, jak np. kwas retinowy, NGF (*nerve growth factor*), białko GAP43/B50 (10). Kwas retinowy powstaje w wyniku utlenienia retinolu (witaminy A), która jest fizjologicznym substratem dla dehydrogenazy alkoholowej (ADH) (30).

W wyniku działania alkoholu konwersja retinolu do kwasu retinowego może być zahamowana, co powoduje zmniejszenie dostępności biologicznej tego kwasu i zarazem podwyższenie poziomu retinolu tkankowego, który może być silnym czynnikiem teratogennym (9). Alkohol obniża poziom tego kwasu w surowicy krwi szczura w okresie ciąży i zmienia poziom białek związanych w komórce. W badaniach Hannigan (10) wykazano, że alkohol hamuje wzrost aksonów i obniża poziom białka GAP43/B50 w kulturach komórkowych neuroblastoma (LA-N-5). Efekt ten był odwracany przez kwas retinowy (26).

Głębokie dysfunkcje zespołu FAS mogą być wynikiem nadmiaru wolnych rodników tlenowych, które w bardzo dużym stopniu uszkadzają komórki nerwowe (20), co wyraźnie wykazano w *neocortex*, hipokampie i mózdku szczura (22). Szczególnie podatne na wpływ alkoholu są błony lipidowe, które ulegają uszkodzeniu podczas rozwoju w wyniku działania wolnych rodników (3, 19). Struktura błon plazmatycznych proliferujących astrocytów zmienia się pod działaniem alkoholu (23).

Działanie alkoholu zmniejsza siłę obronną komórki, która w fizjologicznych warunkach ochrania przed szkodliwym działaniem wolnych rodników. W badaniach na zwierzętach stwierdzono obniżenie poziomu witaminy E w hepatocytach płodów samic szczyrzych poddanych działaniu alkoholu (28). Jako antyoksydant, szczególnie rolę protekcyjną przed destrukcyjnym działaniem alkoholu w życiu płodowym pełni witamina E (28).

WNIOSEK

Stosowanie zwierzęcych modeli jest pomocnym narzędziem badawczym neurobiologicznego mechanizmu teratogennego działania alkoholu. Pozyskana wiedza w tym zakresie umożliwi poszukiwanie sposobów leczenia, jak i działań profilaktycznych.

PIŚMIENICTWO

1. Abdollah S., Catlin M.C., Brien J.F.: *Ethanol neuro-behavioral teratogenesis in the guinea pig: behavioral dysfunction and hippocampal morphological change*. Can. J. Physiol. Pharmacol. 1993, 71, 776-782.
2. Abel E.L., Hannigan J.H.: *Maternal risk factors in fetal alcohol syndrome: Provocative and permissive influences*. Neurotoxicol. Teratol. 1995, 17, 445-462.
3. Arienti G., DiRenzo C., Cosmi E.V., Carlini E., Corazzi L.: *Rat brain microsome fluidity as modified by prenatal ethanol administration*. Neurochem. Res. 1993, 18, 335-338.
4. Chernoff G.F.: *The fetal alcohol syndrome in mice: an animal model*. Teratology. 1977, 15, 223-230.
5. Dragunow M., Faull R. *The use of c-Fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing*. J. Neurosci. Methods. 1989, 29, 261-265.
6. Eichenbaum H., Otto T., Cohen N.J.: *The hippocampus: what does it do?* Behav. Neural Biol. 1992, 57, 2-36.
7. Giknis M.L.A., Damjanov I., Rubin E.: *The differential transplacental effects of ethanol in four mouse strains*. Neurobehav. Toxicol. 1980, 2, 235-237.
8. Goodlett C.R., Gilliam D.M., Nichols J.M., West J.R.: *Genetic influences on brain growth restriction induced by developmental exposure to alcohol*. Neurotoxicology. 1989, 10, 321-334.
9. Grummer M.A., Langhough R.E., Zachman R.D.: *Maternal ethanol ingestion effects on fetal rat brain vitamin A as a model for fetal alcohol syndrome*. Alcohol. Clin. Exp. Res. 1993, 17, 592-597.
10. Hannigan J.H.: *What research with animals is telling us about alcohol-related neurodevelopmental disorder*. Pharmacol. Biochem. Behav. 1996, 55, 489-499.
11. He J., Yamada K., Nabeshima T.: *A role of c-Fos expression in the CA3 region of the hippocampus in spatial memory formation in rats*. Neuropsychopharmacology, 2002, 26, 259-268.
12. Ikonomidou C., Bittigau P., Ishimaru M.J., Wozniak D.F., Koch C., Genz K., Price M.T., Stefovská V., Horster F., Tenkova T., Dikranian K., Olney J.W.: *Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome*. Science, 2000, 287, 1056-1060.
13. Jang M.H., Jung S.B., Lee M.H., Kim H., Lee S.J., Sim Y.J., Lee H.H., Kim E.K., Kim C.J., Shin H.S., Kim J., Kim E.H.: *Influence of maternal alcohol administration on c-Fos expression in the hippocampus of infant rats*. Neurosci. Letters, 2005, 378, 44-48.
14. Jarrard L.R.: *On the role of the hippocampus in learning and memory in the rat*. Behav. Neurol. Biol. 1993, 60, 9-26.
15. Little J.F., Hepper P.G., Doman J.C.: *Maternal alcohol consumption during pregnancy and fetal startle behaviour*. Physiol. Behav. 2002, 76, 691-694.
16. Markwiese B.J., Acheson S.K., Levin E.D., Wilson W.A. Swartzwelder H.S.: *Differential effects of ethanol on memory in adolescent and adult rats*. Alcohol. Clin. Exp. Res. 1998, 22, 416-421.
17. Melcer T., Gonzalez D., Somes C., Riley P.: *Neonatal alcohol exposure and early development of motor skills in alcohol preferring and nonpreferring rats*. Neurotoxicol. Teratol. 1995, 17, 103-110.

18. Melcer T., Gonzalez D., Riley E. P.: *Locomotor activity and alcohol preference in alcohol-preferring and -nonpreferring rats following neonatal alcohol exposure*. Neurotoxicol. Teratol. 1995, 17, 41-48.
19. Murdoch R. N., Edwards T.: *Alterations in the methylation of membrane phospholipids in the uterus and post-implantation embryo following exposure to teratogenic doses of alcohol*. Biochem. Int. 1992, 28, 1029-1037.
20. Nordmann R., Ribiere C., Rouach H.: *Implication of free radical mechanisms in ethanol-induced cellular injury*. Free Rad. Biol. Med. 1992, 12, 219-239.
21. Pawlak R., Skrzypiec A., Sulkowski S., Buczek W.: *Ethanol-induced neurotoxicity is counterbalanced by increased cell proliferation in mouse dentate gyrus*. Neurosci. Lett. 2002, 327, 83-86.
22. Petkov V.V., Stoyanovski D., Petkov V.D., Vyglanova Y.U.: *Changes in brain lipid peroxidation in the fetal alcohol syndrome*. Bull. Exp. Biol. 1992, 113, 500-502.
23. Renau-Piqueras J., Guerri C., Bursal M., De Paz P., Sacz R., Mayordomo F.: *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*. Glia, 1992, 5, 65-74.
24. Riley E.P., Lochry E.A.: *Genetic influences in the etiology of Fetal Alcohol Syndrome*. W Abel E.L. (red.): Fetal Alcohol Syndrome 1982, Vol. III: Animal Studies, CRC Press, Boca Raton 1982, 113-130.
25. Ryabinin A.E.: *Role of hippocampus in alcohol-induced memory impairment: implications from behavioral and immediate early gene studies*. Psychopharmacology. 1998, 139, 34-43.
26. Saunders D.E., Hannigan J.H., Zajac C.S., Wappler N.I.: *Reversal of alcohol's effects on rewrite extension and on neuronal GAP43/B50, n-myc and C-myc protein levels by retinoic acid*. Dev. Brain Res. 1995, 86, 13-16.
27. Squire L.R., Knowlton B., Musen G.: *The structure and organization of memory*. Ann. Rev. Psychol. 1993, 44, 453-495.
28. Tanaka H., Iwasaki S., Nakazawa K., Inomata K.: *Fetal alcohol syndrome in rats: Conditions for improvement of ethanol effects on fetal cerebral development with supplementary agents*. Biol. Neonate, 1988, 54, 320-329.
29. Thomas J.D., Burchette T.L., Dominquez H.D., Riley E.P.: *Neonatal alcohol exposure produces more severe motor coordination deficit in high alcohol sensitive rats compared to low alcohol sensitive rats*. Alcohol, 2000, 20, 93-99.
30. Yang Z.N., Davis G.J., Hurley T.D., Stone C.L., Li T.K., Bosron W.F.: *Catalytic efficiency of human alcohol dehydrogenases for retinol oxidation and retinol reduction*. Alcohol. Clin. Exp. Res. 1994, 18, 587-591.

Adres do korespondencji:

Dr Wanda Dyr

Zakład Farmakologii i Fizjologii Układu Nerwowego

Instytutu Psychiatrii i Neurologii

Al. Sobieskiego 9

02-957 Warszawa