FASD – MECHANIZMY KOMÓRKOWE ARTYKUŁ PRZEGLĄDOWY

FASD – CELLULAR MECHANISMS REVIEW

Hieronim BARTEL

Zakład Histologii i Embriologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Streszczenie: Pierwsze opisy (ewidentnych) wyraźnie rozpoznawalnych cech zaburzeń rozwojowych związanych z piciem alkoholu przez kobiety pojawiły się w piśmiennictwie medycznym w 1968 i 1973 roku. Spektrum alkoholowych zaburzeń płodu (FASD) dotyczy szerokiego zakresu deficytów lub nieprawidłowości – strukturalnych, neurokognitywnych, fizjologicznych i zachowawczych, które mogą wystąpić po prenatalnym narażeniu na alkohol. Najcięższą postacią FASD jest płodowy zespół alkoholowy (FAS), który może wystąpić po przewlekłym narażeniu na wysokie dawki alkoholu. Mechanizmy leżące u podstaw etiologicznych teratogenezy alkoholowej są zróżnicowane, złożone i dotyczą zarówno czynników genetycznych, jak i epigenetycznych. Wiele badań koncentruje się na polimorfizmie genów kodujących enzym – dehydrogenazę alkoholową (ADH), która katalizuje utlenianie etanolu do aldehydu octowego. Wyniki badan sugerują, że występowanie u matki dwóch wariantów genu – *ADH1B*2* i *ADH1B*3* może działać ochronnie przed szkodliwymi skutkami narażenia na alkohol.

Nowe dowody sugerują, że mechanizm epigenetyczny może działać jako mediator łączący genom, przynajmniej w części, z czynnikami (sygnałami) środowiskowymi. Zmiany epigenetyczne mogą przetrwać długo zanim przejściowy sygnał ze środowiska zniknął, co wyjaśnia szczególne znaczenie tego zjawiska w FASD. Komórki grzebienia nerwowego odgrywają bardzo ważna rolę w powstawaniu zmian dysmorficznych w okolicy twarzowej oraz w wielu innych narządach. FASD jest jedną z postaci defektów objętych wspólna nazwą neurokrystopatie. Najrozleglejsze skutki prenatalnego narażenia na alkohol dotyczą rozwijającego się mózgowia. Alkohol wpływa na rozwój układu nerwowego, poprzez różne szlaki, we wszystkich okresach neurogenezy i gliogenezy. W ostatnich latach sformułowano hipotezę o neuroimmmunologicznym mechanizmie teratogenezy alkoholowej.

Słowa kluczowe: spektrum alkoholowych zaburzeń płodu (FASD), płodowy zespół alkoholowy (FAS), czynniki genetyczne i epigenetyczne, komórki grzebienia nerwowego, neurokrystopatie, teratogeneza układu nerwowego

Summary: The first description in the modern medical literature of a distinctly recognizable pattern of malformation associatet with maternal abuse were reportet in 1968 and 1973. Fetal alcohol spectrum disorders (FASD) refers to the broard spectrum of structural, neurocognitive, physiological and behavioral abnormalities or deficits that can occur following prenatal alcohol exposure. At the most severe end of FASD is fetal alcohol syndrome (FAS), which can occur with chronic exposure to high doses of alcohol. Mechanisms underlaying the etiology of alcohol teratology are varied, complex and concerns both genetic and epigenetic factors. Much research has focused on polymorphism in the genes encoding the enzyme alcohol dehydrogenase (ADH), which catalyzes the oxydation of ethanol to acetaldehyde. Data seggest that presence of either two variants of this gene in mother – *ADH1B*2* and *ADH1B*3* may provide protection from adverse effects of alcohol exposure. Emerging evidence suggests that the creation epigenetic mechanism may function as mediators connecting the genome depends, at least in part, on environmental factors. These epigenetic changes can persist long after the transient environmental signal has disappeared, highligting the particular importance of phenomenon for FASD. The neural crest cells play a very importanat role in the creation of face dysmorphic changes and many others organs. FASD is one of forms of the common name neurocristopahies. The most profound effects of prenatal alcohol exposure are on the developing brain. Alcohol exposure effects brain development via numerous pathways at all stages neurogenesis, and gliogenesis. In recent years, a hypothesis has been formulated on the neuroimmunological mechanism of alcohol teratogenesis.

Keywords: fetal alcohol spectrum disorders (FASD), fetal alcohol syndrome (FAS), genetic and epigenetics factors, neural crest cells, neurocristopathy, neural system teratogenesis

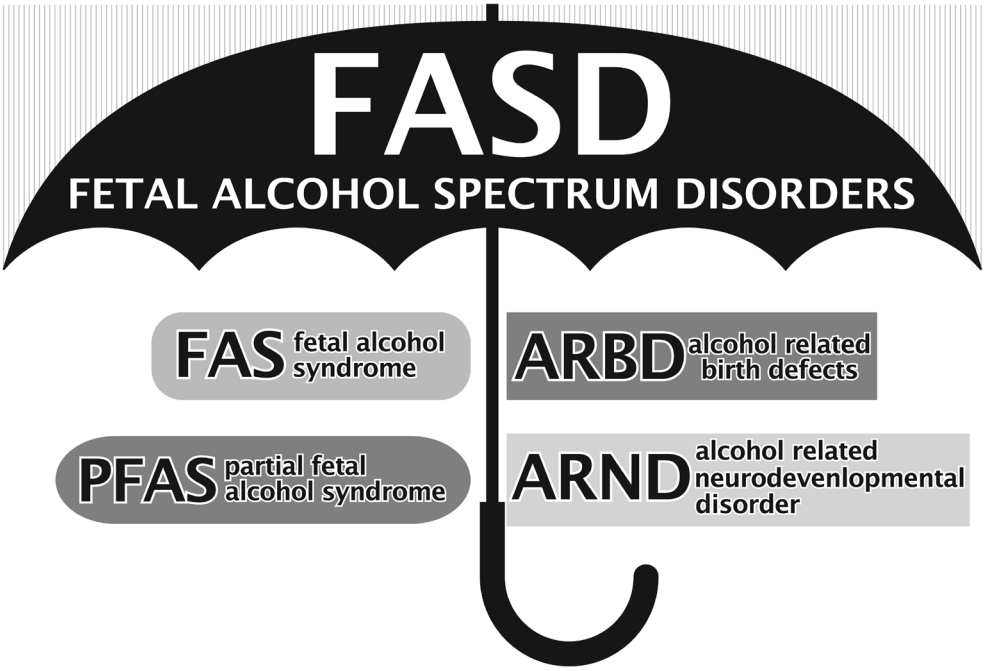
Upłynęło 50 lat od pierwszego doniesienia literaturowego na temat uszkodzeń potomstwa matek pijących alkohol w czasie ciąży, określonych fetopatią alkoholową. Dokonał tego francuski pediatra Paul Lemoine z Nantes, który w 1968 r. opisał 127 dzieci urodzonych przez kobiety alkoholiczki. [45, 46]. Po raz wtóry, w 1973 r. szkodliwe dla potomstwa następstwa picia alkoholu opisali, także pediatrzy Kenneth Lyons Jones i David W. Smith z Department of Pediatrics, Division of Dysmorphology/Teratology University of California, San Diego, USA, (charakterystyka dotyczyła uszkodzeń obserwowanych u ośmiorga, niespokrewnionych dzieci matek alkoholiczek, pochodzących z trzech grup etnicznych) [29, 30, 31].

W Polsce pierwszy artykuł naukowy na temat FAS ukazał się w 1982 r. [59], a pierwsza informacja podręcznikowa w 1995 r. [8]. W 2010 r. odbyła się w Holandii pierwsza w Europie międzynarodowa konferencja poświęcona problematyce FASD. (First European Conference on FASD. Fetal Alcohol Disorder: Growing Awareness In Europe. 3 to 5 November 2010. Organized by: Alcohol Syndroom Stichting. Nederland. Diane Black – conference chair). " I Międzynarodowa Konferencja Naukowo-Szkoleniowa w Krakowie pt. FASD: problem kliniczny i społeczny 30.09-2.10. 2015", zorganizowana została przez Państwową Agencję Rozwiązywania Problemów Alkoholowych. Podczas tej konferencji przedstawiono, a następnie opublikowano, pierwsze obszerne polskie badania na temat częstości występowania FASD w Polsce [64].

Od czasów starożytnych wiadomo, że alkohol uszkadza płód. Pisali o tym filozofowie greccy – Diogenes, Plutarch oraz Arystoteles [2], który twierdził, że „*Kobiety pozbawione rozumu oraz kobiety pijące alkohol ryzykują powicie potomstwa, które będzie ich przypominało – ich dzieci będą zasępione, ponure i słabe”.* Soranus z Efezu, lekarz grecki (98-138 n.e.) w *Traktacie Położniczym* przestrzegał kobiety ciężarne przed piciem alkoholu.

Dr William Sullivan, lekarz więzienny z Liverpoolu, w 1900 r. odnotował wysoką częstotliwość porodów martwych u 120 więźniarek alkoholiczek [77].

Alkohol jest bardzo silnym teratogenem, wynika to bezdyskusyjnie z licznych badań przeprowadzonych na wszystkich kontynentach [1, 3, 14, 15, 35, 38, 54, 55, 57, 63, 66, 68, 69, 71, 72, 79, 85, 86, 87, 95]. Według raportu amerykańskiej Environmental Protection Agency, opracowanego na zlecenie rządu USA (1966 r.) spośród 10 teratogenów zaburzających rozwój układu nerwowego u ludzi (alkohol, rtęć, promieniowanie jonizujące, fenytoina, ołów, heroina, marihuana, składniki dymu tytoniowego, kokaina) najbardziej dewastujące skutki związane są z alkoholem.



RYCINA 1. FASD – niediagnostyczne, parasolowate określenie, dotyczące pełnego zakresu skutków prenatalnego narażenia na alkohol
FIGURE 1. FASD – the nondiagnostic, umbrella term used to refer to the full range of the prenatal alcohol exposure effects

W miarę poznawania rozległych negatywnych następstw działania alkoholu na zarodek/płód zmieniła się terminologia uszkodzeń. Profesor Kenneth R. Warren z Narodowego Instytutu Zdrowia USA zaproponował, w 2004 roku, nazwę Fetal Alcohol Spectrum Disorders (FASD) – Spektrum Alkoholowych Zaburzeń Płodu. FASD jest jedną z najczęstszych wad wrodzonych. Nie jest kliniczną jednostką diagnostyczną, ale pojęciem ogólnym, niekiedy określanym parasolowym, który obejmującym negatywne, sukcesywnie diagnozowane, następstwa alkoholu dla zarodka, płodu, dziecka. Nazwa FASD (Ryc. 1) obejmuje:

· Płodowy Zespół Alkoholowy, ang. *fetal alcohol syndrome* – FAS (w terminologii polskiej skrót FAS)

· Zaburzenia w rozwoju układu nerwowego związane z alkoholem, ang. *Alcohol related neurodevelopmental disorders* – ARND (w terminologii polskiej skrót – ARND)

· Wrodzone wady rozwojowe związane z alkoholem, ang. *Alcohol related birth defects* – ARBD (w terminologii polskiej skrót – ARBD)

· Częściowy płodowy zespół alkoholowy, ang. *partial fetal alcohol syndrome* – PFAS lub pFAS oraz płodowy efekt alkoholowy, ang. *fetal alcohol effect* (FAE) dotyczą takich uszkodzeń, w których nie ma wszystkich cech charakterystycznych dla FAS (jakby łagodniejsza postać FAS).

Płodowy zespół alkoholowy jest najcięższą postacią uszkodzeń i występuje w przypadku przewlekłego narażenia matki na alkohol. Zespół charakteryzuje się:

1. zapoczątkowanym w okresie prenatalnym opóźnieniem wzrostu (ang. *intaruterine growth retardation [restriction]* – IUGR*)* i kontynuowaniem tego procesu w okresie postnatalnym. Konsekwencją *IUGR* jest obniżenie wzrostu, zmniejszenie masy ciała oraz zmniejszenie obwodu głowy.
2. swoistymi cechami niedorozwoju części twarzowej czaszki – skrócona szpara powiekowa, szerokie rozstawienie oczodołów, fałd nakątny, opadające powieki, małoocze (*microphtalmia),* spłaszczona część środkowa twarzy, szeroka nasada nosa, brak lub wygładzenie rynienki podnosowej, wąska warga górna i/lub brak czerwieni wargowej, niedorozwój żuchwy, nisko osadzone małżowiny uszne, drobne wady skóry okolicy przyusznej. Dla rozpoznania FAS wg H. L. Rosett'a niezbędne są co najmniej dwie z wymienionych wad [73]. Ponieważ jednak rozpoznanie wady nie zawsze jest łatwe, na przestrzeni dziesięcioleci opracowano w różnych krajach standardy diagnostyczne (kryteria waszyngtońskie, kryteria kanadyjskie, wytyczne diagnostyczne Institute of Medicine USA). W 2016 r. ukazała się polska wersja 4-punktowego Kwestionariusza Waszyngtonskiego do oceny spektrum poalkoholowych wrodzonych zaburzeń rozwojowych.
3. różnego stopnia uszkodzeniem rozwojowym ośrodkowego układu nerwowego. Zaburzenia, powstające przede wszystkim w pierwszym trymestrze ciąży, ale także w drugim i trzecim trymestrze, prowadzą do rozległej gamy uszkodzeń (zaburzeń) neurologiczno-behawioralnych: zróżnicowany stopień upośledzenia umysłowego (występuje w 30-50% FAS), obniżenie ilorazu inteligencji, upośle-

dzenie czynności ruchowych (zwiększona pobudliwość w okresie niemowlęcym i nadreaktywność w wieku dziecięcym), osłabiona zdolność do skoncentrowania uwagi, trudności w nauce w szkole na różnym etapie kształcenia, błędy językowe, gramatyczne, dysgrafia, ograniczona zdolność osądu, roztargnienie, bezkrytyczna życzliwość względem obcych, zachowania aspołeczne, kryminalne, agresja i inne.

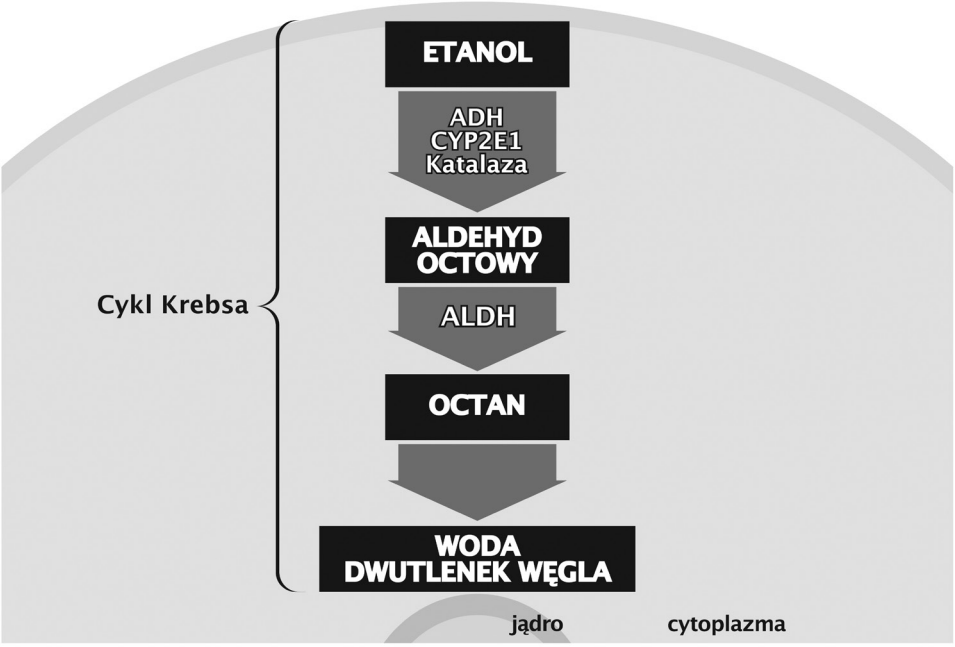
FAS znajduje się w Międzynarodowej Statystycznej Klasyfikacji Chorób i Problemów Zdrowotnych (ICD) pod numerem 10 Q 86.0.

Szeroki zakres wrodzonych wad strukturalnych (poza wyżej wymienionymi, chociaż także wadami) objęty został, w ramach FASD, skrótem ARBD. Według różnych badań do najczęstszych zaliczyć należy: wady układu sercowo-naczyniowego (w około 30% FAS; najczęściej wady stożka i okolicy dróg odpływu, uszkodzenie miokardium, ubytek w przegrodzie międzykomorowej, ubytek w przegrodzie międzyprzedsionkowej, tetralogia Fallota, zwężenie aorty) [106], kręgosłupa oraz dużych i małych stawów (*camptodactylia* – przykurcze palców dłoni i/lub stopy, *clinodactylia* – skrzywienie 5. palca dłoni/stopy), oka, ucha wewnętrznego, nerek (nerka aplastyczna i/lub hipoplastyczna, podkowiasta), przewodu pokarmowego, trzustki, wątroby, naczyniaki skórne, zmieniona bruzda dłoniowa, rozszczep wargi i/lub podniebienia, przepuklina oponowo-mózgowa, wodogłowie [105]. Inne odległe skutki, ujawniające się w różnych okresach życia, dotyczą zaburzeń endokrynologicznych, metabolicznych, nadciśnienia i innych [23, 24].

W opublikowanych po raz pierwszy, w 2002 r., wynikach badań sekcyjnych mózgowia 25 dzieci z FAS stwierdzono: mikrocefalię, mały móżdżek, dysgenezję ciała modzelowatego, brak opuszki mózgowej, przepuklinę oponowo-rdzeniową, prosencefalię (defekty przodomózgowia)

FASD i zespół Downa to współcześnie dwa najważniejsze zespoły wad, o niektórych wspólnych cechach fenotypowych [82].

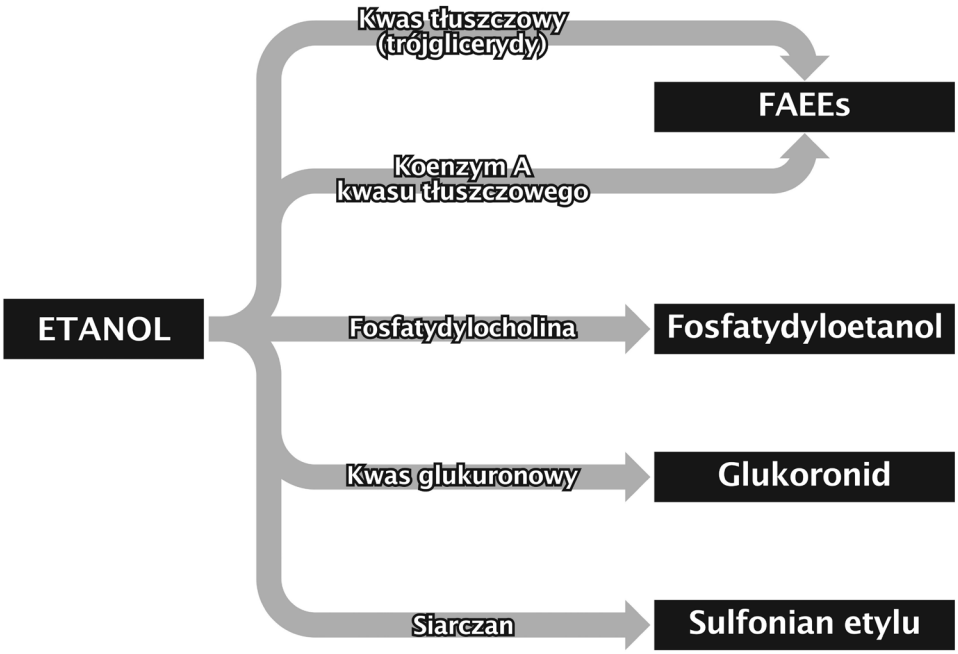
Alkohol etylowy (masa cząsteczkowa 46,07 g/mol) jest w 20%, szybko absorbowany przez błonę śluzową żołądka na drodze prostej dyfuzji, a pozostałe 80% wchłania się w górnej części jelita cienkiego. Po dotarciu do komórki alkohol, w prawie całej objętości, jest metabolizowany poprzez szlak metaboliczny tlenowy i beztlenowy. Nie zmetabolizowany alkohol (do około 10%) zostaje wydalony z ustroju z moczem, przez oddech oraz ze śliną. Proces biotransformacji tlenowej (95% całego alkoholu) zachodzi w wątrobie przy udziale dehydrogenazy alkoholowej, cytochromu oraz katalazy (Ryc. 2). Alkohol podlega przemianie w aldehyd octowy (dziesięciokrotnie bardziej toksyczny od alkoholu), następnie aceton, a aceton w cyklu Krebsa przemienia się w wodę dwutlenek węgla. W przemianie beztlenowej (około 5% alkoholu), do której dochodzi w trzustce, wątrobie, mózgowiu, sercu i innych narządach, cząsteczka alkoholu jest metabolizowana do estrów kwasów tłuszczowych, między innymi: fosfatydyloetanolu, siarczanu etylu i glukuronialu etylu [5, 41, 42, 50, 102]. (Ryc. 3). Te metabolity końcowe, z uwagi na ich długi okres półrozpadu, są ważnymi biomarkerami wykorzystywa-



RYCINA 2. Przemiana tlenowa etanolu. Zmodyfikowano wg. I. Zelner i G. Koren
FIGURE 2. Oxydative ethanol metabolism. Modified from I. Zelner and G. Koren

nymi do wykrycia narażenia na alkohol kobiety ciężarnej i płodu/noworodka. Można je wykrywać we włosach, smółce (najczęściej wykorzystywanej do oznaczenia), paznokciach, moczu, łożysku, sznurze pępowinowym oraz krwi noworodka i krwi matki. Linolan etylu jest jednym z estrów, którego podwyższone stężenia stwierdzono u noworodków z obniżoną masą ciała, narażonych na alkohol w czasie ciąży [26]. Najnowsze badania estrów we włosach kobiet ciężarnych pijących alkohol oraz palących papierosy ujawniły fakt częstego i znacznego zatajania nałogów [25].

Z badań przeprowadzonych zarówno u kobiet oraz zwierząt doświadczalnych (mysz, szczur, owca) wiadomo, że alkohol bardzo szybko dociera przez łożysko do różnych części płodu (układu krążenia, płynu owodniowego). Z badań u kobiet w 16-18 tyg. ciąży wynika, że stężenie alkoholu w płynie owodniowym jest wprawdzie dwukrotnie mniejsze niż w krwi żylnej matczynej, ale eliminacja alkoholu z płynu owodniowego jest znacznie wolniejsza niż z krwi matczynej. Płyn owodniowy jest więc swoistym rezerwuarem alkoholu przedłużając narażenie płodu. Ponadto w drugim i trzecim trymestrze ciąży kiedy to płyn owodniowy jest fizjologicznie, systematycznie połykany przez płód, (w przypadku spożywania alkoholu przez ciężarną), może dojść do wtórnego narażenia płodu. Z punktu widzenia mechanizmu teratogenezy można mówić o przedłużonym narażeniu na alkohol [17, 28].



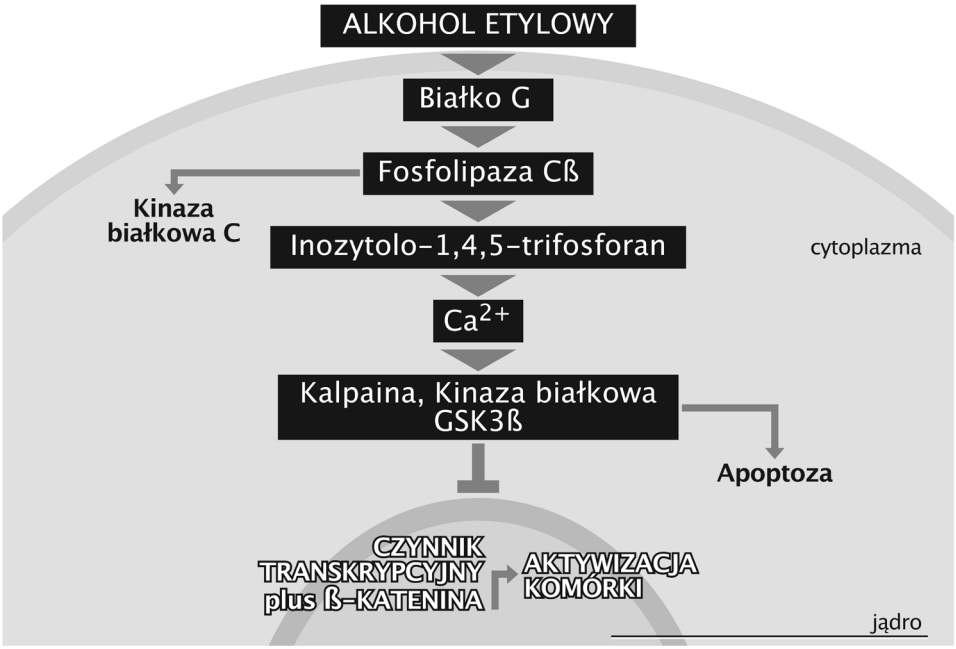
RYCINA 3. Przemiana beztlenowa etanolu
FIGURE 3. Non oxidative ethanol metabolism

Alkohol etylowy i jego produkt przemiany aldehyd octowy zaburzają cykl komórkowy, wzrost, różnicowanie i wędrówkę komórek w zarodku/płodzie, poprzez bezpośrednie uszkodzenie DNA i syntezy aminokwasów i białek.

Etanol wnikając do komórki uruchamia molekularne kaskady sygnałowe. W błonie komórkowej nie ma swoistego receptora dla cząsteczki alkoholu i jego działanie na komórkę następuje poprzez interakcje z różnymi białkami obejmującymi:

- białka kanałowe bramkowane ligandem
- receptor białka G
- liczne białka w sygnalizacji wewnątrzkomórkowej

Alkohol wnika do komórki korzystając z receptora związanego z białkiem G (ang. *G-protein coupled receptor,* GPCR), które wiąże GTP/GDP – guanyzynotransferazę, guanyzylodifosroran. W cytoplazmie białko G, pobudzając kolejne białka, powoduje uwolnienie z siateczki endoplazmatycznej wapnia. Wapń poprzez białka pośrednie kaskady (przede wszystkim szlaku sygnałowego β-katenia/Wnt) wywołuje apoptozę komórek w procesach neurogenezy, synaptogenezy, kardiogenezy, somatogenezy (powstawania kończyn oraz w kształtowaniu się innych narządów). β-katenina razem z TCF/LEF (ang. *T cell transcription factor /lymphoid enhencer factor*) tworzy na terenie jądra czynnik transkrypcyjny



RYCINA 4. Molekularny szlak sygnałowy etanolu i apoptoza komórek grzebienia nerwowego
FIGURE 4. Molecular ethanol signaling pathway and neural crest cell apoptosis

stymulujący dalsze etapy syntezy białka (Ryc. 4). W doświadczeniach na zarodkach kurzych wykazano, że proapoptotyczne działanie alkoholu można również osłabić, bądź zahamować blokując aktywność β-kateniny (i uwalnianie puli cytoplazmatycznego wapnia) podając, działające neuroprotekcyjnie, preparaty chelatujące (np. Bepta-AM i inne) [22].

Liczne doświadczenia na zwierzętach dostarczają dowodów na proapoptotyczne działanie alkoholu na komórki nerwowe poprzez aktywację genów z rodziny *bcl-2.* Rozwijający się móżdżek gryzoni jest szczególnie wrażliwy na alkohol. Obumieranie komórek Purkinjego i ziarnistych kory móżdżku zachodzi, wskutek aktywacji, promujących apoptozę, domeny Bad rodziny genów *bcl-2* związanych z zewnętrzną błoną mitochondrialną [76, 77].

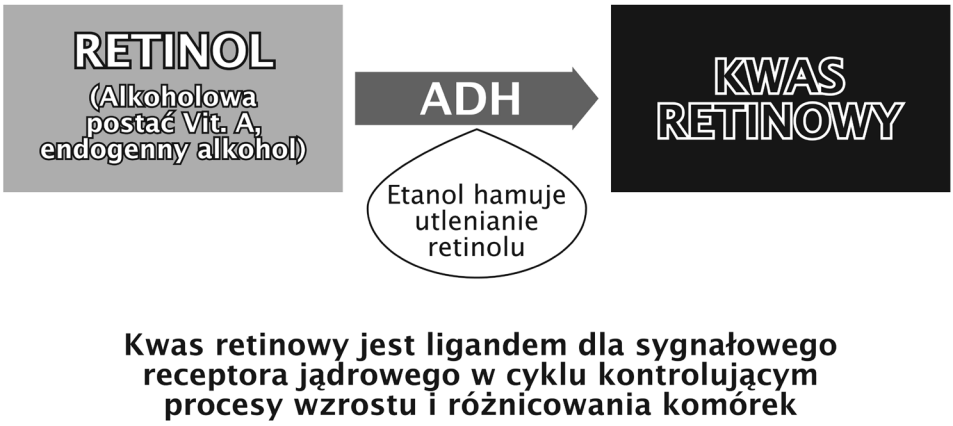
Inną ważną w teratogenezie (także alkoholowej) kaskadą molekularną jest szlak sygnałowy kwasu retinowego (ang. *retinoid acid*, RA). Kwas retinowy jest silnie działającą cząsteczką sygnałową, pochodną witaminy A (retinolu – endogennego alkoholu), która kontroluje ekspresję genu na poziomie transkrypcyjnym. Kwas retinowy odgrywa zasadniczą rolę w rozwoju wyższych ssaków i człowieka poprzez regulowanie kluczowych genów związanych z tworzeniem wzorca ustroju. Jest niezbędny dla indukcji kilku genów *HOX* wiążących się z wyznaczeniem

wzorca kształtowania się przodomózgowia, tyłomózgowia i rdzenia kręgowego, w okresie kiedy pierwotna neuroektoderma zaczyna wyróżnicowywać się ze smugi pierwotnej, a także do ukształtowania się symetrycznej generacji somitów lewych i prawych w czasie powstawania mezodermy przedsomitarnej. Kwas retinowy rozpuszcza się w substancji międzykomórkowej (jest tzw. rozpuszczalnym morfogenem) dlatego jego działanie słabnie wraz ze zmniejszającym się stężeniem oraz malejącą odległością komórki od miejsca jego wydzielania. Gradient stężenia dostarcza precyzyjnej informacji komórce indukowanej, co decyduje o jej dalszych losach. Retinol przenika przez błonę komórkową i łączy się z białkami cytoplazmatycznymi. W cytoplazmie, przy udziale dehydrogenazy alkoholowej przekształca się w retinal, a następnie dzięki dehydrogenazie aldehydu retinowego w kwas retinowy. Kwas retinowy następnie wnika do jądra, gdzie łączy się z swoistymi receptorami kwasu retinowego (a także z receptorami hormonów steroidowych i tarczycowych) i uruchamia proces transkrypcyjny. Alkohol hamuje utlenianie retinolu zaburzając ten skomplikowany mechanizm (Ryc. 5).

Alkoholowe uszkodzenia dotyczą także metabolizmu węglowodanów (glukozy), tłuszczów, kwasu foliowego, cynku i innych licznych mikroelementów.

Alkohol poprzez skurcz naczyń krwionośnych matczynych, łożyska oraz płodu powoduje niedotlenienie zarodka/płodu, o czym pośrednio świadczy wzrost erytropoetyny we krwi pępowinowej. W modelach doświadczalnych u gryzoni stwierdzono, przykładowo upośledzenie hematopoezy już początkowym okresie rozwoju (zmniejszona liczba prekursorowych krwinek czerwonych w pęcherzyku żółtkowym) oraz zaburzenia w ekspresji genów w kolejnych etapach hematopoezy.

Alkohol uszkadza komórki trofoblastu i tym samym zaburza proces placentacji. Następuje to wskutek pobudzenia do aktywnej apoptozy trofoblastu, po-



RYCINA 5. Udział etanolu w biotransformacji retinolu
FIGURE 5. Role of ethanol in the retinol biotransformation

przez wzrost sygnalizacji wewnątrzcytoplazmatycznego wapnia. Doświadczenia z nifedipine antagonistą kanałów wapniowych (lekiem stosowanym między innymi w stanach przedrzucawkowych) wykazały, że związek ten przerywa szlak proapoptotyczny w trofoblaście, co skłoniło autorów do spekulacji na temat nowych strategii w zapobieganiu FASD [11].

Wolne rodniki tlenowe (rodnik hydroksylowy HO*, rodnik ponadtlenkowy O_2*, rodnik wodorotlenkowy HO_2*) powstają w warunkach fizjologicznych oraz patologicznych i odgrywają istotną rolę w procesach sygnalizacji komórkowej. W przypadku wzrostu wolnych rodników i braku sprawnych, własnych mechanizmów antyoksydacyjnych dochodzi do uszkodzenia makromolekuł białka, tłuszczu, RNA i DNA, a w konsekwencji zaburzeń w czynnościach komórki (różnicowanie, wędrówka, komunikacja międzykomórkowa) kończących się apoptozą lub procesem teratogennym. Liczne ksenobiotyki (związki chemiczne, talidomid, alkohol) generując wolne rodniki wywołują stres oksydacyjny [94], (Ryc. 6).

Oksydacyjne uszkodzenie DNA wywołuje zmiany w sekwencji DNA (określane mutacjami), a klonalna ekspresja zmutowanych genów zapoczątkowuje procesy nowotworowe lub/i teratogenne. Uszkodzenia DNA spowodowane wolnymi rodnikami mogą wystąpić również w mechanizmie epigenetycznym.

RYCINA 6. Mechanizm stresu oksydacyjnego w zaburzeniach rozwojowych komórki
FIGURE 6. Oxidative stress mechanism in cell developmental disorders

Znaczenie czynników genetycznych w teratogenezie alkoholowej jest jednym z najważniejszych problemów badawczych W 1975 r. opisano parę bliźniaków z cechami FAS, z których jeden miał wyraźniejsze cechy uszkodzeń. Oba niemowlęta słabiej rozwijały się fizycznie i umysłowo. W 1993 r. opublikowano wyniki badań, z których wynika, że u bliźniąt monozygotycznych (mających ten sam genom) FAS zdiagnozowano w 100%, a u bliźniąt dwuzygotycznych (mających nieco różny genom) tylko w 64%. W 1995 r. Abel stwierdził, że pełnoobjawowy FAS wystąpił tylko u 4,3% potomstwa matek-alkoholiczek. W 2008 r. opublikowano wyniki obserwacji Indianek – Amerykanek będących babciami wnucząt z FAS. Babcie te częściej piły alkohol w porównaniu z grupą niepijących. Powyższe obserwacje wskazują na znaczenie polimorfizmu genetycznego w FASD [39, 44, 52, 53, 84, 93].

Pierwsze badania doświadczalne nad uwarunkowaniem genetycznym w prenatalnej ekspozycji na alkohol zostały opublikowane w 1980 roku. Dotyczyły trzech szczepów myszy CBA, C3H i C57Bl. U potomstwa tych i kolejnych odszczepów (a także podszczepów) ujawniono zwiększoną śmiertelność płodów oraz liczne wady różnych narządów (okolicy głowowej, serca, odcinka ogonowego cewy nerwowej i inne). Prowadzone w różnych układach doświadczalnych doświadczenia (dawka alkoholu, czas ciąży) wykazały, że wady są zależne od genotypu matki i płodu. W modelu doświadczalnym, w którym zarodek myszy rozwija się w hodowli tkankowej, dodanie alkoholu do hodowli w stadium neurulacji spowodowało wady przodomózgowia, narządu wzroku, tyłomózgowia.

W modelu szczurzym FASD, w którym testowano wrażliwość genetyczną na alkohol różnych szczepów Sprague Dawley, a doświadczenie przeprowadzono w takim okresie czasowym, aby był ekwiwalentny do trzeciego trymestru ciąży, wykazano charakterystyczne uszkodzenia móżdżku, opóźnienie we wzroście postnatalnym oraz występowanie drgawek.

W dotychczas przeprowadzonych badaniach 11 szczepów zarodków kurzych wykazano intensywną apoptozę w komórkach grzebieni nerwowych co skutkowało wadami okolicy gębowej kurcząt. Szczep W98D okazał się odporny, podczas gdy szczep W98S bardzo wrażliwy na działanie alkoholu, a wyjaśnienie tych różnic uzyskano badając biosyntezę rybosomów zależną od różnych genów.

Znakomitym modelem w badaniach nad genetyczną wrażliwością na alkohol jest ryba Danio pręgowane (*Danio Danio*). U szczepów Danio EK, AB i TU, po podaniu alkoholu uzyskano uszkodzenia w zakresie elementów szkieletowych okolicy czaszkowo-gębowej (twarzowej?) o zróżnicowanym nasileniu. U szczepu TU niewiele było defektów czaszkowo-twarzowych, gdyż z reguły nastąpiła śmierć zarodków.

W modelu FASD u muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*) skupiono się na analizie udziału insulinowej ścieżki sygnałowej po działaniu alkoholu [56].

Epidemiologiczne badania nad uwarunkowaniami genetycznymi teratogenezy alkoholowej u ludzi koncentrują się głównie na dehydrogenazie alkoholowej, cytochromie P, katalazie oraz innych produktach genów. Z powodu swej małej cząsteczki, a także właściwości plejotropowych alkohol etylowy wchodzi w interakcję z licznymi genami.

Dehydrogenaza alkoholowa (ADH) jest polimorficznym enzymem, w 90% zlokalizowanym się w siateczce endoplazmatycznej hepatocytów. Dzieli się na pięć klas, z których najważniejsza jest klasa pierwsza kodowana przez **trzy** główne *loci* genów zlokalizowane w chromosomie 4 q22 : ***ADH-1*** z allelem ADH1*1; ***ADH-2*** z allelami ADH1B*1, ADH1B*2 i ADH1B*3 oraz ***ADH-3*** z allelami ADH1C*1 i ADH1C*2. Ten, częściowy, skrócony, ale i tak skomplikowany podział, jest istotny z punktu widzenia dalszych rozważań, gdyż przykładowo izozym kodowany przez *ADH1B*2* jest 80 razy aktywniejszy od izoenzymu kodowanego przez loci *ADH1B*1*. Oznacza to szybszy rozkład (oksydację) alkoholu. Istnieją znaczące różnice etniczne dotyczące występowania alleli ADH1B*1 i ADH1B*2 co ilustruje poniższe zestawienie:

Biali Europejczycy i Amerykanie	ADH1B*1 > 95%	ADH1B*2 < 5%
Żydzi w Izraelu i w Ameryce	ADH1B*1 80%	ADH1B*2 20%
Amerykanie pochodzenia afrykańskiego	ADH1B*1 85%	ADH1B*2 < 5%
Chińczycy, Japończycy, Koreańczycy	ADH1B*1 35%	ADH1B*2 65%

Liczne prace sugerują związek polimorfizmów ADH1B z ryzykiem teratogennym alkoholu, ale najsilniej dotyczy to najprawdopodobniej tylko jednego genu z rodziny enzymów dehydrogenazy alkoholowej – ADH1B [93]. Zarówno matczyny, jak i płodowy ADH1B*2 (w porównaniu z ADH1B*1) zmniejsza ryzyko wystąpienia FASD w badanej populacji. Wiljoen i wsp. [90] badali polimorfizm *ADH1B* i występowanie FAS w mieszanej populacji w prowincji Western Cape w Południowej Afryce, gdzie jak dotychczas odnotowano najwyższy na świecie wskaźnik urodzeń z FAS (46 FAS na 1000 urodzeń).

Detoksykacja leków, substancji szkodliwych (alkoholu) odbywa się także w siateczce endoplazmatycznej, w mitochondriach i peroksyzomach hepatocytów, przy udziale cytochromu P450. W genomie ludzkim znajduje się ponad 150 genów *CYP* kodujących P450. Matczyny genotyp *CYP17* (wariant *A1A1*) występuje częściej u kobiet, które piły w czasie ciąży i urodziły potomstwo z cechami IUGR. Enzymy cytochromu P45017 pośrednicząc w metabolizmie 17α-hydroksylasy i 17, 20-liasy, aktywują hormony płciowe hormony sterydowe, które z kolei wpływają na wzrost płodu. Narażenie płodów myszy na alkohol i dym tytoniowy doprowadziło także do opóźnienia wzrostu wewnątrzmacicznego płodów i miało związek z ekspresją genów *cyp.* W świetle tych obserwacji, jak twierdzi A. Delpisheh, szkodliwy wpływ alkoholu na rozwój wewnątrzmaciczny płodu zależy od genotypu *CYP17A1A1* [18].

Katalaza tylko w niewielkim zakresie bierze udział w katalizowaniu alkoholu etylowego.

Współczesne piśmiennictwo dostarcza licznych dowodów na znaczącą rolę jaką odgrywają geny, zarówno zwiększając ryzyko, jak i działając ochronnie (zapobiegawczo) w teratogenezie alkoholowej. Jednym z nich jest gen kodujący serotoninę (5-hydroksytryptaminę). Serotonina jest bardzo ważnym neuroprzekaźnikiem występującym powszechnie w komórkach nerwowych i glejowych. Serotonina jako ligand może być zarówno agonistą (czyli ligandem wiążącym się z receptorem i w dalszych etapach aktywować komórkę), bądź antagonistą (czyli ligandem, który wprawdzie wiąże się z receptorem, ale blokuje jej czynność receptorową). Jednym z genów kandydatów allel promotor genu transportującego serotoninę – 5-HTTLPR. Jest on między innymi odpowiedzialny, poprzez wzrost aktywności wychwytu serotoniny, za niższe stężenie serotoniny w synapsie. U małp *M. rhesus* wykazano, że płody przenoszą serotoninowy transporter genu (*rh5-HTTPR*). Analogiczne allele czynnościowe tego genu występują także u ludzi Stwierdzono, że *5-HTTLPR* jest pozytywnie skorelowany z ryzykiem występowania zespołu nagłej śmierci noworodkowej (SIDS – ang. *sadden infant death syndrome*) wśród Japończyków, a w USA wśród populacji Afro-Amerykańskiej. Zhou twierdzi, że mechanizm serotoninowy (zarówno stężenie samej serotoniny, jak i jej transportera molekularnego) jest ważnym czynnikiem w teratogenezie alkoholowej (w powstawaniu części środkowej cewy nerwowej) [105].

Munger i wsp. w 1996 r. po raz pierwszy stwierdzili, że picie alkoholu w ciąży jest czynnikiem ryzyka powstawaniu izolowanej postaci rozszczepu wargi z/lub bez rozszczepu podniebienia. Poszukiwanie genów odpowiedzialnych za ten fakt nie przyniosło przekonywujących dowodów (u dzieci duńskich z rozszczepami wargi i/lub podniebienia badano związek wady z genami kodującymi szlaki sygnałowe TGF, BMP, MSX RAR).

Ekspresja licznych mutacji w strukturach zarodkowych myszy (ośrodkowy układ nerwowy, zawiązki kończyn, układu szkieletowego) dotyczyła zaburzeń sygnalizacji szlaku sygnałowego *shh.* Szlak ten kontroluje liczne procesy w rozwoju zarodkowym i podobnie jak kwas retinowy ma istotne znaczenie w patologii FASD (na przykład zaburzenie szlaku wiąże się z holoprosencefalią). Wiadomo, że alkohol hamując sygnalizację SHH/Shh wywołuje holoprosencefalię, bądź u zwierząt cechy fenotypowe charakterystyczne dla tej wady. Poznano także inne mutacje nasilające (wzmacniające) teratogenność alkoholu. Przykładem może być szlak sygnałowy syntazy tlenku azotu. Tlenek azotu zapobiega uszkodzeniom neuronów móżdżkowych, ale to ochronne działanie jest redukowane przez alkohol. W hodowli komórek móżdżkowych wykazano, że osłabienie sygnalizacji tlenku azotu następuje poprzez aktywację czynnika transkrypcyjnego NF-κB, który działa protekcyjnie na sygnalizację NO.

Szlak sygnałowy receptora płytko-pochodnego czynnika wzrostu (ang. *Platelet-Derived Growth Factor Receptor Alpha/PI3K/mTOR*) okazał się, po licznych doświadczeniach *in vivo i in vitro* z mutantami myszy, żaby, rybki (nawet subte-

ratogenne dawki alkoholu wywołały u tego zwierzęcia wady części gębowej u zarodków; a innym doświadczeniu, po podaniu dużych dawek alkoholu wywołano cyklopię u mutantów *vangl2*), a także u *Drosophila melanogaster,* wchodzić w interakcję z alkoholem [56]. Potwierdzono to także u ludzi. Dwa receptory *PDGFRA* i *PDGRFB* wchodząc w interakcje z alkoholem, nasilają jego teratogenne działanie.

Z ogólnych praw teratologii wiadomo, że wrodzone wady rozwojowe powstają najczęściej w efekcie działania czynników środowiskowych i genów. Przytoczone liczne obserwacje dowodzą, iż alkohol (czynnik środowiskowy), jako mała cząsteczka, wchodzi w interakcję z genami, chociaż nie wszystkie genotypy zwierząt są wrażliwe na jego działanie.

Zakładając, iż interakcje gen – alkohol dotyczą zaledwie kilku procent genów, to przy około 20 000 genach w genomie człowieka, liczba wrażliwych na alkohol *loci* może wynosić kilkaset genów (a poznaliśmy zaledwie kilkanaście, kilkadziesiąt). W dalszym ciągu nie znamy precyzyjnego mechanizmu molekularnego, który prowadzi do swoistych zmian fenotypowych potomstwa po alkoholu. Podobnie zasadnicze pytanie, czy w teratogenezie alkoholowej krytycznym determinantem jest genotyp matki, czy płodu także nie jest ostatecznie rozstrzygnięte**.** Powszechniejszy jest jednak pogląd o większym znaczeniu genotypu matki [20].

Alkohol, jak i nikotyna, narkotyki i inne związki działa uszkadzająco na komórkę poprzez mechanizm epigenetyczny [27, 33, 39, 88]. Epigenetyka stosunkowo „młoda" poddziedzina genetyki zajmuje się stabilnymi, ale potencjalnie odwracalnymi zmianami w informacji genetycznej komórki. Czynniki epigenetyczne wpływają na ekspresję genów (czyli stopień nasilenia w ich odczytywaniu), ale nie powodują zmian w podstawowej sekwencji DNA. Istnieje coraz więcej dowodów wskazujących na to, iż kreowanie zmian epigenetycznych w określonych miejscach (*loci*) genomu zależy, przynajmniej w części, od czynników środowiskowych (np. alkohol). Zmiany epigenetyczne po sygnale środowiskowym mogą utrzymywać się dość długo**.** Reprogramowanie epigenetyczne ekspresji genu dokonuje się poprzez następujące mechanizmy:

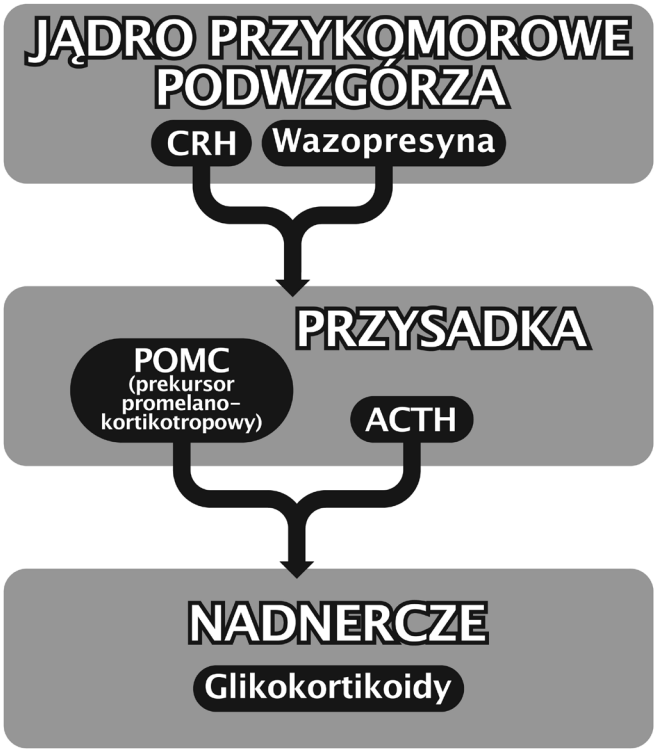
- metylację DNA (dodawanie grupy metylowej) lub acetylację DNA (dodanie grypy acetylowej) do cytozyny
- modyfikowanie białek histonowych
- remodeling chromatyny jądrowej
- współudział w regulacji genu *micro-RNA* (*miRNA*)

Metylacja wiąże się z osłabieniem ekspresji lub zablokowaniem ekspresji genu i w konsekwencji z represja transkrypcyjną. Alkohol działa, jak wiadomo, poprzez kwas foliowy i s-adenylosulfometioninę. U pijących absorpcja kwasu foliowego z pokarmu jest osłabiona, to z kolei uniemożliwia przenoszenie cząsteczki węgla w szlaku metionina-hemocysteina, i w rezultacie zmienia wzór metyzacji DNA. Brak/niedobór kwasu foliowego wywołuje hipometylację DNA. Dodanie w diecie choliny zapobiega (lub zmniejsza objawy FASD), gdyż dostar-

cza grup metylowych w szlaku metionina-hemocysteina. Zmieniając metylację DNA u myszy uzyskano wady okolicy gębowej i upośledzenie wzrostu – a więc cechy analogiczne do FASD u ludzi.

Modyfikacja białek histonowych zachodzi poprzez metylację, bądź acetylację końcowych odcinków histonów H3 i H4, ale typów modyfikacji epigenetycznych histonów jest wiele.

W ostatnich latach wiele uwagi poświęca się znaczeniu microRNA (miRNA) w modyfikacji epigenetycznej białek genomu (epigenomu, transkryptomu). MicroRNA jest jednoniciowym RNA, małą niekodującą cząsteczką RNA (ang. *non coding RNA*, ncRNA), czyli jest to funkcjonalna molekuła RNA, która wprawdzie jest transkrybowana przez DNA, ale nie podlega translacji do białka. Micro RNA jest zaangażowany w maszynerię epigenetyczną obok w/w metylacji DNA i modyfikacji histonów [6, 70]. Micro RNA może działać także poprzez mechanizm genetyczny.



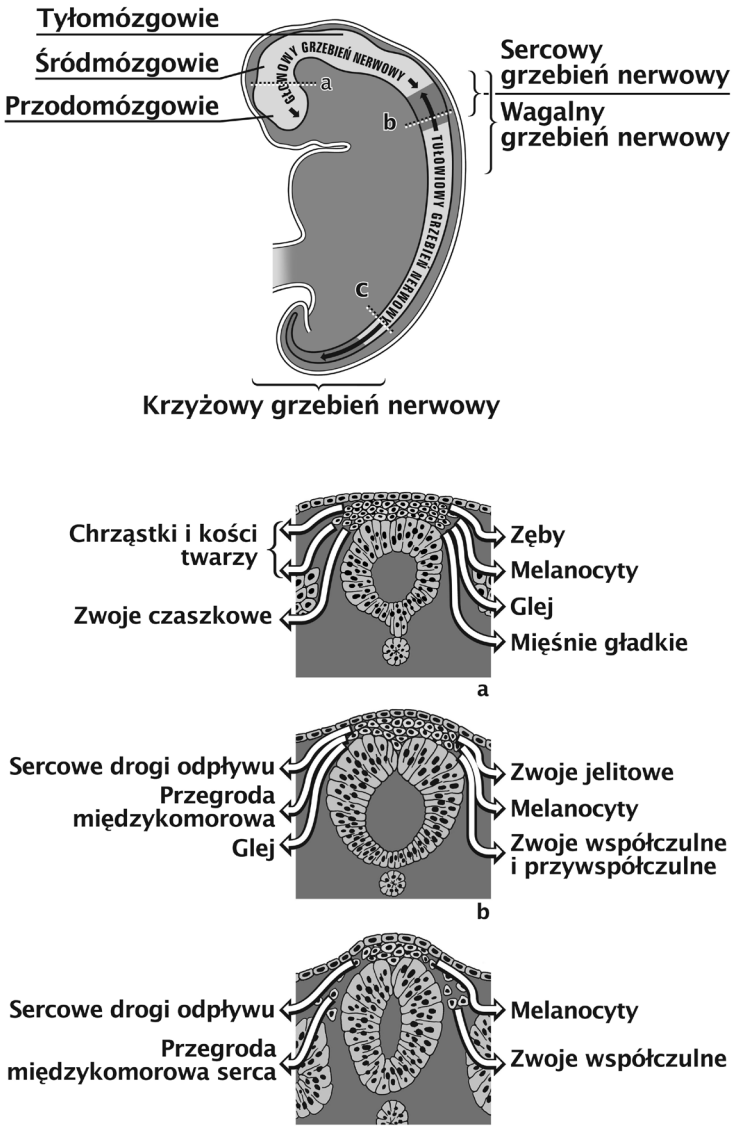
RYCINA 7. Oś neuroendokrynowa podwzgórze – przysadka – nadnercze. CRH (ang. *corticotropin--releasing hormone*) – hormon uwalniający jądra przykomorowego podwzgórza. ACTH (ang. *adrenocorticotropic hormone*) – adrenokortikotropina
FIGURE 7. Hypothalamus – hypophysis – adrenal gland neuroendocrine axis

Spożywanie alkoholu przez ciężarną może wpłynąć na metylację DNA oraz acetylację histonów poprzez miRNA. Wykazano, że miRNA jest związany z modelem zwierzęcym FASD, szczególnie z rozwojem układu nerwowego [60]. Związek alkoholu z miRNA potwierdzono także w badaniach na liniach komórkowych (neurocytach). Mark Berres wykazał, że docelową grupą komórek dotkniętych zaburzeniem (przez alkohol) biogenezy rybosomów jest grzebień nerwowy [10]. Stwierdzono także, znaczącą rolę miRNA w funkcjonowaniu osi podwzgórze – przysadka – nadnercze (ang. *hypothalamic – hypophyseal – adrenal gland axis,* HPA) [58]. Badania u myszy wykazały, że stres w okresie prenatalnym wpływa na oś hormonalną poprzez mechanizm epigenetyczny, przenosząc dziedziczenie zmian w DNA plemników. Polimorfizm pojedynczych nukleotydów w genach kodujących miRNA wpływa na ich ekspresję i czynności. Istnieje wiele klas miRNA stąd zróżnicowane efekty działania. Przykładowo, po podawaniu alkoholu, zmienioną ekspresję miR-29c i miR-204 wykazano w korze przedczołowej dorosłych szczurów. Natomiast w doświadczeniu na ciężarnych myszach, narażonych na alkohol, w tkance mózgowej płodów zwiększona ekspresja dotyczyła miR-29c oraz MiR-30a, co sugeruje że te micro RNA wpływają na oś HPA w czasie rozwoju prenatalnego zakłóconego działaniem alkoholu [58] (Ryc. 7).

Szeroko pojęta deregulacja biogenezy rybosomów jest przyczyną zaburzenia określanego rybosomopatiami. Ludzkie rybosomopatie, w tym alkoholowa, z reguły są letalne. Są one także związane z anemią, niską sylwetką, wadami serca, kończyn, twarzoczaszki [80, 81].

Cechy epigenetyczne mogą być przekazane kolejnej generacji. Narażenie toksyną ciężarnej (F0) może narażać płód (pokolenie F1) i komórki płciowe tego potomstwa (F2), a efekt epigenetyczny może ujawnić się w czasie ciąży w kolejnych pokoleniach (przypuszcza się, że maksymalnie do pokolenia F4, gdyż cechy epigenetyczne podlegają „wymazaniu"). Przekazanie uszkodzeń epigenetycznych następuje w trakcie mejozy komórek linii płciowej (oogonii i spermatogonii), oraz we wczesnej embriogenezie poprzez złożony fenomen biologiczny określany piętnowaniem genomowym rodzicielskim (imprinting genetyczny, genomowy) [8], a także w czasie zagnieżdżania się blastocysty.

Fundamentalną rolę w powstawaniu wad związanych z alkoholem (układu nerwowego, twarzo-czaszki, serca, układu kostno-stawowego, narządu wzroku i innych narządów) odgrywają komórki grzebienia nerwowego. Komórki grzebienia nerwowego są przejściową populacją komórek zarodkowych. Powstają na pograniczu dwóch struktur – płytki nerwowej i ektodermy pokrywowej, dzięki wzajemnej stymulacji molekuł tych dwóch pierwotnych struktur zarodka. Wielofunkcyjność komórek grzebienia nerwowego stała się podstawą nazwania ich czwartym listkiem zarodkowym, albo drugą głową. Początkowo komórki grzebienia nerwowego skupiają się po obu stronach neuroektodermy i w miarę jak postępuje proces zamykania się cewy nerwowej (odpowiednio u człowieka – otworu



RYCINA 8. Przekrój strzałkowy przez cewę nerwową oraz przekroje poprzeczne na trzech jej poziomach
FIGURE 8. Sagittal and cross sections on the three levels of the neural tube

nerwowego przedniego około 26. dnia i – otworu nerwowego tylnego około 28. dnia) tworzą wzdłuż osi czaszkowo-ogonowej zarodka segmentalne skupienia, z których następnie wywędrowują do licznych miejsc docelowych. Wyróżnia się następujące populacje komórek grzebienia nerwowego:

- czaszkowe, pochodzące z trzech pierwotnych pęcherzyków mózgowych,
- wagalne, wywodzące się z pierwszych siedmiu rombomerów okolicy nerwu błędnego i rdzenia przedłużonego. Wśród nich wyróżnia się sercowe komórki grzebienia nerwowego,
- tułowiowe – krzyżowe komórki grzebienia nerwowego (Ryc. 8).

Z powyższych miejsc, trzema oddzielnymi szlakami, komórki grzebienia docierają do licznych narządów, w powstawaniu których uczestniczą. W tym czasie podlegają także transformacji z komórek nerwowych o charakterze nabłonkowym, w luźniej upakowane komórki mezenchymalne, określane odtąd komórkami ektomezenchymy. Przy udziale komórek grzebienia nerwowego powstają między innymi: komórki nerwowe i glejowe nerwów czaszkowych V, VII, IX i X, korzenie grzbietowe zwojów współczulnych i przywspółczulnych, komórki Schwanna w nerwach obwodowych, tkanka ektomezenchymalna głowy, z której kształtują się kości sklepienia czaszki, kości i chrząstki części twarzowej czaszki, zębina, zębina, rogówka, twardówka, mięśnie rzęskowy i zwieracz źrenicy, komórki chromochłonne rdzenia nadnerczy, komórki C tarczycy, przytarczyce, część grasicy, przegroda aortalno-płucna, ściana dużych naczyń łuku aorty oraz kardimiocyty, melanocyty skóry i tęczówki, układ nerwowy ściany przewodu pokarmowego inne. Proces oddzielania się komórek grzebienia nerwowego, ich migracja, proliferacja i różnicowanie w miejscu docelowym odbywa się przy udziale licznych, sukcesywnie włączających się molekuł (białek) sygnałowych. W początkowym okresie najważniejszymi genami decydującymi o wpływie na dorsalizację cewy nerwowej wzdłuż osi pionowej są *MSX, PAX, BMP, ZIC1*, niektóre geny segmentacji, jak *WNT1*, geny hamujące wędrówkę komórek grzebieni, jak *EGR2, oraz SLUG i SOX10*, które są niezbędne w dalszych etapach różnicowania komórek grzebienia nerwowego. Geny z rodziny *PAX* i *MSX* mają szczególne znaczenie w migracji komórek grzebienia nerwowego do łuków gardłowych i dalej w okolicę przyszłej okolicy twarzowej i są tym samym związane z wadami tej okolicy zarodka. Szlaki migracji komórek grzebienia nerwowego są także determinowane przez liczne molekuły macierzy pozakomórkowej.

Komórki grzebienia nerwowego są prekursorowymi komórkami macierzystymi (ang. *stem cells*), a właściwością fizjologiczną *stem cells* jest nadzwyczajna wrażliwość na czynniki toksyczne. Procesy biogenezy rybosomów w komórkach grzebienia, oddzielanie się komórek od cewy nerwowej, ich wędrówka i wielokierunkowe różnicowanie odbywają się przy udziale transkrypcyjnej sygnalizacji β-kateniny. Alkohol osłabia, bądź blokuje działanie β-kateniny i, poprzez apoptozę, powoduje zanik komórek grzebienia. Alkohol także znacząco opóźnia wędrówkę komórek grzebienia poprzez uszkodzenie ich cytoszkieletu oraz białek adhezji komórkowej. Te mechanizmy molekularne oraz wyżej wspomniana wrażliwość, swoista dla komórek macierzystych (którymi są komórki macierzyste), tłumaczy dlaczego tak ważne są one w teratogenezie alkoholowej. Potwierdzają

to także doświadczenia z ablacją (doświadczalnym uszkodzeniem) komórek grzebienia nerwowego i uzyskanymi wadami.

Liczne defekty związane z komórkami grzebienia nerwowego Robert Bolande w 1974 r. określił mianem *neurocristopathy.* Defekty te podzielił na neurokristopatie proste i złożone. Przykładem neurokristopatii prostej jest choroba Hirschsprunga. W chorobie tej odcinek jelita grubego został pozbawiony komórek zwoju przywspółczulnego, w splocie nerwowym błony podśluzowej (splocie Meissnera) oraz w splocie nerwowym błony mięśniowej (splocie Auerbacha), a pochodzących z tułowiowego odcinka grzebienia nerwowego. Brak unerwienia powoduje patologiczne rozdęcie jelita z wszystkimi tego stanu komplikacjami klinicznymi. Neurokristopatiami są włókniako-nerwiaki oraz liczne melanopochodne przebarwienia skóry. Znane są zespoły wad wrodzonych związane z czaszkowymi i sercowymi komórkami grzebienia nerwowego, (a których wady dotyczą układu sercowo-naczyniowego, układu nerwowego oraz części twarzowej czaszki). Należą do nich Zespół Aaskorga, Alagille'a, Bachmana de Lange, Carpentera, CHARGE, DiGeorge'a, Ivermarka, LEOPARD/Noonan, łamliwego chromosomu X, Wardenburga, Wiliamsa-Beurena i embriopatia kwasu retinowego. Można do tej grupy zaliczyć także FASD (FAS), gdyż jest klasycznym przykładem neurokristopatii.

Alkohol etylowy jest neurotetarogenem. Poznano najważniejsze uszkodzenia strukturalne w ośrodkowym układzie nerwowym i ich następstwa w funkcjonowaniu potomstwa u człowieka. Korzystając ze współczesnych technik obrazowania rezonansem magnetycznym: (1) mikroskopia rezonansu magnetycznego o wysokiej rozdzielczości (ang. *high-resolution magnetic resonance microscopy,* MRM), (2) technika obrazowania tensora dyfuzji – traktografię (ang. *diffusion tension imaging,* DTI*),* traktografia, (3) spektroskopia rezonansu magnetycznego (ang. *magnetic resonance spectroscopy,* MRS) oraz skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM), w badaniach nad modelem zwierzęcym FASD (głównie u myszy), uzyskano precyzyjne obrazy uszkodzeń różnych okolic mózgowia (zarówno w korze, ośrodkach podkorowych, jak i w istocie białej) oraz zadziwiające podobieństwa w uszkodzeniach okolicy gębowej myszy z dysmorfią twarzy u człowieka. [62, 65] Techniką PET (pozytronowa emisyjna tomografia) wykryto subtelne, poalkoholowe uszkodzenia w metabolizmie wzgórza, jadra ogoniastego i skorupy mózgowia [48].

Najważniejszym i najtrwalszym skutkiem picia alkoholu w ciąży jest zmniejszenie objętości mózgowia, które związane jest z uszkodzenie całej kory mózgowej, móżdżku, jąder podstawy mózgu (soczewkowatego, ogoniastego, przedmurza oraz ciała migdałowatego) oraz istoty białej mózgu. Największe uszkodzenia występują w płacie czołowym, rzadziej w substancji szarej okolicy potylicznej. Uszkodzenie we wczesnej ciąży komórek nerwowych (neuroblastów) obniża ich ogólną liczbę, zaburza proces połączeń między neuronami (miedzy innymi poprzez uszkodzenie f-aktyny w cytoplazmie aksonalnego stożka wzrostowego), czego następstwem może być zanik kory czołowej i/lub drobnozaakrętowość kory

mózgowej (mikrogyria). Znany jest przypadek polimikrogyrii związanej z alkoholem u 16 letniej dziewczynki. Opisano także (badaniem MRI) zgrubienie kory mózgowej skorelowane z dysmorfią twarzy u 69 dzieci i dorosłych z FASD. To spostrzeżenie autorzy, w samym tytule, określili jako *abnormal* [103].

Odległe konsekwencje neurologiczne i psycho-rozwojowe uszkodzeń w FASD zostały szczegółowo opisane w bardzo bogatym piśmiennictwie i opracowaniach monograficznych [40, 68]. W modelu zwierzęcym (najczęściej mysim, [9, 37, 87]) FASD, dzięki MRM, opisano szczegółowo lokalizację uszkodzeń u mózgowiu oraz skorelowane cechy dysmorfii okolicy twarzowej (pyszczka) zwierzęcia po podaniu alkoholu o określonych stężeniach oraz różnych okresach ciąży. Przykładowo po podaniu alkoholu w 7. dniu ciąży (określanym u tych zwierząt p.c. *post coitus*) stwierdzono uszkodzenia przodomózgowia w wyniosłości zwojowej, agenezję (brak zawiązka) ciała modzelowatego, niedorozwój kory mózgowej, hipokampa, jąder podstawy mózgu i powiększenie komór bocznych. Narażenie na alkohol w 8. p.c. spowodowało nasiloną apoptozę w tyłomózgowiu, w czaszkowych komórkach grzebienia nerwowego i w konsekwencji wady nerwów czaszkowych, hipokampa oraz zmniejszenie objętości całego mózgowia, a przede wszystkim móżdżku. Podanie alkoholu w 10 p.c. spowodowało znaczne zmniejszenie objętości mózgowia i powiększenie komór mózgowych.

Zdiagnozowano także liczne uszkodzenia w istocie białej (włóknach nerwowych) u ludzi oraz u zwierząt doświadczalnych. Ich umiejscowienie dotyczyło różnych części substancji białej, w tym przede wszystkim ciała modzelowatego (*corpus callosum*) [101].

Móżdżek i hipokamp, w przypadku prenatalnego narażenia na alkohol, są kolejnymi narządami o szczególnej wrażliwości na uszkodzenia. W móżdżku alkohol uszkadza komórki zwojowe Purkinjego, najsilniej wtedy gdy ekspozycja dotyczy krytycznego okres rozwoju tych neuronów. U człowieka przypada to na trzeci trymestr ciąży. W doświadczeniach na szczurach wykazano, że nawet pojedyncza dawka alkoholu podanego w 4. dniu po urodzeniu powoduje zanik (w procesie apoptozy) do 70% komórek Purkinjego. Uszkodzenia dotyczą także komórek warstwy ziarnistej kory móżdżku, ale w mniejszym zakresie. Zakłada się pierwsze dni życia postnatalnego szczura odpowiadają trzeciemu trymestrowi ciąży. Prenatalne uszkodzenia móżdżku są przyczyną zaburzeń motorycznych w życiu postnatalnym. W hipokampie dochodzi do zahamowania, bądź znacznego upośledzenia neurogenezy po podaniu alkoholu w okresie prenatalnym. W doświadczeniach na szczurach stwierdzono przede wszystkim uszkodzenia komórek ziarnistych w zakręcie zębatym, a w mniejszym nasileniu komórek piramidalnych hipokampa. Także podawanie alkoholu młodym szczurom (3-tygodniowym, co w założeniu badaczy opowiada końcowemu okresowi ciąży u kobiet) znacząco zredukowało ilość komórek piramidalnych i ziarnistych. Dawka i czas podania alkoholu mają istotne znaczenie dla rozwoju neurocytów hipokampa. Hipokamp

jest częścią mózgowia odpowiedzialną za złożone procesy pamięciowe. W życiu postnatalnym proces neurogenezy postępuje do czasu osiągnięcia pełnej dojrzałości i jest kontynuowany wżyciu dorosłym.

Skutki teratogenne zależą od wielu czynników, a najważniejszymi są:

- okres, w którym działa teratogen
- dawka czynnika teratogennego
- genotyp matki
- genotyp zarodka/płodu.

Badania nad określeniem (wyznaczeniem) okresu szczególnej wrażliwości na działanie teratogenu (alkoholu, nikotyny, narkotyków, wirusów, toksycznych związków środowiskowych i innych) w procesie reprodukcyjnym, określanym „krytycznym okresem embriogenezy" lub „okienkiem narażenia" mają bardzo bogatą literaturę, opartą przede wszystkim na doświadczeniach na zwierzętach oraz obserwacjach u ludzi. W przypadku teratogenezy alkoholowej okresami wrażliwości są:

(1) okres przed poczęciem (prekoncepcyjny, przedkoncepcyjny),

(2) okres przedimplantacyjny (po zapłodnieniu, ale przed zagnieżdżeniem) oraz

(3) stadium rozwojowe gastrulacja.

W następnych okresach rozwoju wady poszczególnych narządów, bądź układów powstają w stadium ich organogenezy (czyli w czasie intensywnych podziałów mitotycznych, wymagających dużych nakładów energetycznych na ciągle zmieniający się stan konformacyjny chromatyny jądrowej z nieczynnej heterochromatyny na aktywną transkrypcyjnie euchromatynę).

Komórki linii płciowej żeńskiej powstają w okresie prenatalnym i pod koniec którego rozpoczynają podział mejotyczny, który zostaje dwukrotnie zahamowany i faktycznie kończy się dopiero po owulacji. Ten wydłużony okres dojrzewania mejotycznego sprzyja epigenetycznym uszkodzeniom i w efekcie, owulowana w kolejnym cyklu miesiączkowym, komórka może być niekompetentna (aneuploidalny oocyt). Jeżeli w takim stanie zostanie zapłodniona, aneuploidalny stan (czyli z nieprawidłowym, nierównym podziałem chromosomów) zostaje przeniesiony do zygoty. Aneuploidalny zarodek bardzo często ulega obumarciu w pierwszych tygodniach ciąży (samoistne poronienie). Inny mechanizm dotyczy uszkodzenia wrzeciona podziałowego (centrioli) oogonii. Alkohol niszczy białka mikrotubul wrzeciona co także zaburza cały podział redukcyjny i w konsekwencji wpływa na rozdział chromosomów (i również spowodować aneuploidię).

Komórki linii płciowej męskiej także powstają w życiu prenatalnym, ale ich podziały (spermatogeneza) rozpoczynają się dopiero po okresie pokwitania, a cały cykl spematocytogeniczny trwa „zaledwie" 62 dni. Alkohol wpływa bardzo negatywnie na płodność męską, uszkadzając komórki poszczególnych stadiów spermatogenezy, jak i komórki Sertolego (poprzez przerwanie osi hormonalnej podwzgórze – przysadka – jadro). Analizując DNA, izolowany z jąder szczurów

Sprague Dawley, po ostrej ekspozycji na alkohol, stwierdzono uszkodzenia apoptotyczne w spermatogonia i spermatocytach. W innym mechanizmie alkohol obniża stężenia, zawartych w akrosomie plemnika enzymów, niezbędnych do strawienia osłony przejrzystej komórki jajowej, w trakcie procesu zapłodnienia.

Narażenie na działanie alkoholu przed poczęciem (w okresie przedkonepcyjnym), zarówno matki jak i ojca wiąże się z defektami u potomstwa. Pierwsze doniesienie na temat „roli czynnika męskiego" w teratogenezie alkoholowej ukazało się już w 1987 roku (badano masę ciała noworodków od 377 ciężarnych i stwierdzono , że noworodki pochodzące od ojców, którzy pili alkohol miesiąc przed ciążą ważyły o 189 g. mniej, od tych którzy pili okazjonalnie [49].

Bardzo liczne badania na zwierzętach (mysz, szczury, świnka morska) w różnych modelach doświadczalnych (ostre i przewlekłe narażenie na alkohol, podawanie alkoholu drogą inhalacyjną, dożołądkowo, dootrzewnowo, kojarzenie zwierząt w różnych kombinacjach: „alkoholizowana samica x niealkoholizowany samiec", „alkoholizowana samica x alkoholizowany samiec", „alkoholizowany samiec x niealkoholizowana samica" potwierdziły, iż alkohol stosowany w okresie przedkonepcyjnym u samców zwiększa ryzyko śmiertelności okołourodzeniowej potomstwa, a efekty są przenoszone na następną generację. Po raz pierwszy tego spostrzeżenia dokonał C. Stockard , w 1931 r., który zdrowe samice szczura kojarzył z samcami przewlekle narażonymi na alkohol [39]. Ten mechanizm teratogenezy alkoholowej, jak się okazało później, wiąże się, ze zmianami epigenetycznymi w gametach samców.

Podobnie w przypadku płci żeńskiej podawanie alkoholu w różnym czasie w okresie przedkoncepcyjnym (czyli nie w okresie ciąży) powoduje obniżenie masy ciała, opóźnienia rozwojowe u potomstwa oraz obniżenie płodności. W interpretacji należy jednak uwzględnić, iż skutki mogą być spowodowane innymi czynnikami (odżywienie, ogólne spowolnienie ruchowe zwierząt alkoholizowanych) [51].

Wykazano także, że szybkie upijanie się (ang. *binge drinking*) w okresie okołokoncepcyjnym może mieć fatalne skutki dla potomstwa. *Binge drinking* (picie biesiadowe, prywatkowe, hulaszcze) powszechnie definiuje się jako spożywanie dużej ilości alkoholu w krótkim okresie czasu. Dochodzi wtedy szybko do wysokiego stężenia alkoholu we krwi. Pojęcie *binge drinking* wprowadzono w USA w latach dziewięćdziesiątych XX w. W 2004 r. National Institute of Alcohol Abuse and Alcoholism (NIAAA) określiło te formę upijania się jako 4+/5+ jednostek alkoholu w ciągu 2 godzin. Dr Megan Patric z Uniwersytetu w Colorado dla populacji młodzieży 21 lat określiła 4+/5+ jako standardowe picie, a 10+/15+ jako picie intensywne (Ryc. 9). Według opracowania *International Center for Alcohol Polices – Module 20. Standard Drinks,* w poszczególnych krajach na świecie, odpowiednie wartości, w skali 8 do 14, są zróżnicowane. Dla Polski oraz Australii, Austrii, Francji, Irlandii, Nowej Zelandii i Hiszpani jeden standardowy drink (czyli 10 gramów 100% etanolu) odpowiada 10 jednostkom.

RYCINA 9. Jednostki alkoholu
FIGURE 9. Alcohol units

W Polsce znane są liczne przypadki urodzenia dzieci z FASD po epizodzie *binge drinking* przez młode, zdrowe kobiety nieświadome faktu, iż pijąc alkohol były w początkowym okresie ciąży.

Okres między zapłodnieniem, do którego dochodzi w jajowodzie, a zagnieżdżeniem w błonę śluzową macicy (około 6,5 dnia) charakteryzuje się szybkimi podziałami zygoty (bruzdkowaniem), powstaniem blastocysty, przekształcającej się następnie w węzeł zarodkowy. Patologia tego okresu rozwojowego jest stosunkowo mało poznana i opiera się uszkodzeniach wywołanych czynnikami fizycznymi, jak na przykład promieniowanie jonizujące. Losy zarodka określa się zasadą „wszystko, albo nic", czyli ewentualne uszkodzenie nie wpłynie na dalszy rozwój, bądź nastąpi obumarcie zarodka. Tuż po wniknięciu główki plemnika do cytoplazmy komórki jajowej, powstają z ich przekształconych jąder, przedjądrze żeńskie i męskie, które z kolei łączą się (koniugacja przedjądrzy) i następuje połączenie (wymieszanie) genomów. W czasie łączenia się przedjądrzy dochodzi do imprintingu genomowego – procesu w którym dochodzi do, często brzemiennej w skutkach, swoistej konkurencji między cechami genetycznymi przenoszonymi przez obie płci. Imprinting jest niezwykle „wrażliwym" okresem, a alkohol, wśród wielu innych, jest znanym czynnikiem szkodliwym. Nieliczne badania doświad-

czalne u szczurów i myszy wykazały, że alkohol podawany w 4. dpc (ang. *days post coitus*) spowodował wcześniejsze zagnieżdżanie się zarodków, a po implantacji zwiększał liczbę poronień zarodków. Zarodki myszy w stadium czterech blastomerów hodowane *„ in vitro”* w medium zawierającym alkohol i wszczepione następnie „myszce-donosicielce” rozwijały się prawidłowo, a wśród potomstwa nie obserwowano wad rozwojowych. To doświadczenie dowodzi, iż teratogeneza zależy także od wczesnego kontaktu zarodka z organizmem matki i jej ewentualnymi toksycznymi metabolitami.

Gastrulacja jest procesem, w którym powstaje trójwarstwowa tarczka zarodkowa składająca się z ektodermy, endodermy i mezodermy. Jest to zarazem początek morfogenezy czyli rozwoju różnych narządów i części ciała. Na początku tego okresu – około 14 dnia – powstaje z mezodermy smuga pierwotna. Smuga pierwotna wydłuża się w kierunku czaszkowym (głowowym), ku płytce przedstrunowej i powstają kolejne struktury zarodkowe – węzeł pierwotny, dołek pierwotny i przedłużenie głowowe, a pod nim wyrostek struny grzbietowej. Wyrostek struny grzbietowej tworzy mezodermę osiową zarodka. Dynamika procesów zachodzących w gastrulacji decyduje o szczególnym ryzyku uszkodzeń przez liczne czynniki (alkohol) na tym etapie embriogenezy.

Stosując duże dawki alkoholu myszom w okresie przedimplantacyjnym uzyskano uszkodzenia charakterystyczne dla FAS. Podanie alkoholu w 7 i 8 dpc doprowadziło do wad mózgowia; w 7, 8, 9 i 10 dpc wad narządu wzroku, w 9 i 10 dpc wad układu moczowo-płciowego, a w 9, 10 i 11 dpc do wad układu szkieletowego i kończyn. Podobnie cechy fenotypowe FAS uzyskano u myszy, którym w doświadczeniu przewlekłym podawano do picia wodę z alkoholem; wady układu sercowo-naczyniowego, szkieletowego oraz narządu wzroku ogólne cechy zahamowania w rozwoju wystąpiły po ekspozycji dniach 12-17 dpc (okres między 7, a 14 dpc u myszy koresponduje z 3-8 tygodniem ciąży u człowieka). Powyższe obserwacje wskazują na znaczenie, zarówno okresu ciąży, jak i stężenia alkoholu we krwi matki i płodu, w powstawaniu wad w okresie gastrulacji.

Układ nerwowy jest najczęściej uszkodzonym układem po narażeniu na alkohol w czasie ciąży. Do uszkodzeń może dojść w całym okresie od zapłodnienia do urodzenia, ale największe ryzyko wystąpienia uszkodzeń, o różnym nasileniu i charakterze, dotyczy wczesnego okresu ciąży [8, 69]. Dezorganizacja rozwojowa ośrodkowego układu nerwowego jest związana z zaburzeniami migracji neuronalnej i w konsekwencji prowadzi do: heterotopii komórek nerwowych i glejowych, mikrocefalii, anomalii pnia mózgu, móżdżku, jąder podstawy mózgu, hipokampa i ciała modzelowatego, przysadki oraz nerwu wzrokowego [12, 29, 32, 43, 61, 99, 101].

W modelu zwierzęcym uzyskano liczne wady (małogłowie *microcephalia*, wodogłowie *hydrocephalia*, brak sklepienia czaszki i odsłonięte mózgowie – *exencncephalia*, poszerzenie komór mózgowych). Najcięższą wadą rozwojową

powstającą już na etapie gastrulacji, a dotyczącą przodomózgowia, twarzoczaszki i jamy ustnej jest holoprosencefalia (jednokomorowe przodomózgowie, cyklop, cyklopia). Wada rozwija się przed zamknięciem otworu nerwowego przedniego (około 26 dnia w stadium rozwojowym 20-23 somitów). Holoprosencefalia występuje u 1 na 16 000 żywo urodzonych oraz u 1/250 płodów poronionych. W ponad 90% jest wadą letalną. Badania wykonane na szczepach myszy (wrażliwych na działanie alkoholu szczepie (C57BI/6J i C57BL/6N; istnieją bowiem szczepy niewrażliwe na alkohol, na przykład DBA/J), zarodku kurzym oraz rybce (szczepach zebrafish: AB, Ekkwill i Tuebingen) pozwalają na przekonywującą interpretację mechanizmów molekularnych wczesnego uszkodzenia układu nerwowego. Analizę morfologiczną i czynnościową uszkodzeń umożliwia współczesne nieinwazyjne narzędzie badawcze, jakim jest wysoko rozdzielcza mikroskopia rezonansu magnetycznego (*hrMRM*).

U człowieka początek rozwoju układu nerwowego przypada na około 17. dzień ciąży. Proces różnicowania komórek ektodermy w neuroektodermę indukowany jest przez wyrostek struny grzbietowej i mezodermę przedstrunową. Powstają trzy kolejne struktury – płytka, rynienka i cewa nerwowa. Od brzegów cewy nerwowej wyróżnicowują się grzebienie nerwowe. Alkohol w tym okresie rozwoju działa toksycznie zarówno na komórki cewy nerwowej, jak i grzebieni nerwowych i prowadzi do uszkodzeń mózgowia oraz twarzoczaszki, charakterystycznych dla FAS [8].

Mutacje w genie *SHH* (*SONIC HEDGEHOG*) u człowieka są najczęstszą przyczyną holoprosencefalii. Aklohol indukuje apoptozę w mezodermalnej płytce przedstrunowej, osłabia jej niezbędne, działanie indukcyjne na powstające nabłonkowe struktury nerwowe (płytkę, rynienkę i cewę nerwową oraz grzebień nerwowy) i w konsekwencji ogranicza rozwój przodomózgowia oraz struktur twarzoczaszki.

Podając alkohol myszom w 7 dpc i obserwując wady mózgowia i okolicy twarzowej (twarzowej u myszy ?) w 11 dpc stwierdzono, że narażenie na alkohol hamuje ekspresję *shh* w mezodermie przedstrunowej, a osłabiona ekspresja *shh* pobudza aktywność kinazy białkowej A. Wzrastająca aktywność kinazy białkowej A osłabia ekspresję shh w linii środkowej zarodka (kształtującego się przodomózgowia i struktur otaczających). Alkohol hamując shh, i tym samym aktywując kinazę, nasila apoptozę. Dr Susan Smith wraz z zespołem wykazała, że w miarę osłabiającej się ekspresji shh, włączają się kolejne molekuły sygnałowe kodowane przez geny *goosecoid, foxa2 i fgf8* warunkując (biorąc udział) rozwój cech fenotypowych dysmorfii twarzowej. Inny molekularny mechanizm dotyczy redukowania przez alkohol puli estrów cholesterolu, substratu niezbędnego do modyfikacji N-terminalnego białka shh, które jest potrzebne do połączenia się z błona komórkową i dalszych etapów sygnalizacji shh [4, 48].

Alkohol hamuje metabolizm energetyczny komórki wpływając na aktywność mitochondriów. W początkowym okresie rozwoju u ssaków zarodek korzysta z żółtka

pęcherzyka żółtkowego (mitochondrialny koenzym A uczestniczy w procesie dostarczania glukozy w procesie glikoneogenezy). Alkohol wpływa negatywnie na kilka składowych tlenowej, mitochondrialnej fosforylacji: (1) kilku białek kompleksu L/NADH dehydrogenazy alkoholowej, (2) oksydazę cytochromu, (3) syntezę ATP.

Najnowsze badania kilkudziesięciu klastrów genów zarodka myszy, kurczęcia, ryby wskazują na znaczącą rolę biogenezy rybosomów w dysmofii twarzowej (charakteryzującej holoprosencefalię, a także inne wady jak np. dyzostozę żuchwowo-twarzową – zespół Teacher-Collins i niedokrwistość Blackfana-Diamonda –anemia Diamond-Blackfan). Uszkodzona przez alkohol biogeneza rybosomów może być znaczącym, pierwotnym „targetem" w różnicujących się komórkach grzebienia nerwowego. Te badania potwierdzają znaczenie interakcji między genami, a czynnikami środowiskowymi w teratogenezie FAS [10].

Powyższe obserwacje potwierdzają szczególną toksyczność alkoholu we wczesnym okresie embriogenezy oraz zasadę, iż skutki działania w tym stosunkowo krótkim „okienku narażenia" są letalne, bądź powodują duże wady wrodzone, z wysoką śmiertelnością [60, 88].

Badania nad neuroteratogennym działaniem alkoholu są od dawana intensywne i stale dostarczają nowych informacji. Po zakończeniu procesu zamykania się otworu nerwowego przedniego (około około 26 dnia po zapłodnieniu) rozpoczyna się tworzenie kory mózgowej (nowej kory *neocortex*) określany także neurogenezą. Strukturą początkową dla przyszłej kory jest (nie mający odpowiednika w korze dorosłych) pierwotny wielorzędowy nabłonek nerwowy (*neuroepihelium*), składający się z czterech warstw (komorowej, podkomorowej, pośredniej-podkomorowej i brzeżnej) przodomózgowia, a później komór bocznych. Komórki nabłonkowe – neuroblasty są nerwowymi komórkami macierzystymi (ang. *neural stem cells*), cechującymi się szybkim cyklem mitotycznym. Kolejne generacje neuroblastów strefy (warstwy) komorowej wędrują do warstwy podkomorowej, gdzie, podlegają kolejnym podziałom mitotycznym, zanim ostatecznie zawędrują i utworzą płytę korową, z której powstaje wielowarstwowa nowa kora mózgowa. „Wyjściowe"komórki *neuroepithelium* posiadają, odchodzącą od ciała komórkowego długą promienistą wypustkę, wzdłuż której wędrują (wspinają się) do kolejnych warstw, stąd ich myląca nazwa glej promienisty (*radial glia*), zamiast pseudo-glejowe (rzekomoglejowe) komórki promieniste.

Większość komórek tkanki glejowej wywodzi się z *neuroepithelium.*

Obie populacje *neuroepitelium* dla różnicowania, wędrówki „wymagają" ekspresji licznych genów, czynników transkrypcyjnych, czynników wzrostowych. Genami indukującymi glioblasty są między innymi: *FOXG1, LHX2, PAX6, EMX2,* a przede wszystkim *GFAP.* Nerwowe komórki macierzyste (a właściwie ich pierwsza generacja – komórki prekursorowe) są uzależnione od takich genów jak: *TBR2, NGN2, CUX2, PAX6*, *NOTCH*. Ich migracja zależy także od dwóch neurotrofin: neurotrofiny4 (NT4) i neurotroficznego czynnika pochodzenia mó-

zgowego (BDNF – ang. *brain-derived neurotrophic factor*), oraz transformujących czynników wzrostu (ang. *transforming growth factors*) – TGFβ1 i TGFβ2. W miarę postępu badań poznajemy nowe molekuły białkowe związane z neurogenezą i gliogenezą oraz ich skomplikowane mechanizmy działania [7]. Przykładowo, takim białkiem jest relina. Relina jest białkiem syntetyzowanym przez komórki Cajal-Retziusa i wydzielanym do macierzy pozakomórkowej w określonych okolicach rozwijającego się mózgowia. Relina kontroluje migrację i pozycjonowanie (zajmowanie określonego miejsca w tworzącej się warstwowej strukturze nowej kory). Sygnalizacja reliny w migrujących neuronach zachodzi poprzez dwa białka związane z powierzchnią komórki – VLDLR (ang. *very low density lipoprotein receptor*) i ApoER2 (receptor typu 2 apolipoproteiny-E), oraz białko cytoplazmatyczne Disabled-1 (Dab1). Relina także łączy się z integrynami – α3 i β3 (białkami z rodziny kadheryn istotnymi w migracji neuronalnej). Relina w mózgowiu dorosłych moduluje potencjał synaptyczny, jest ważną molekułą interakcji międzykomórkowych – CAM (ang. *cell adhesion melecule*).

Neurotoksyczne działanie alkoholu zaburza procesy różnicowania i migracji neuronów korowych. Zahamowanie migracji prowadzi do gładkomózgowia (*lisencephalii*), bądź do powstania heterotopowych – wewnątrzkorowych, lub/i podkorowych skupień neuronów (w j. ang. określanych „*warts*”) [61]. „Nieuporządkowana struktura kory” może być, poza mniej lub bardziej zaawansowanymi uszkodzeniami charakterystycznymi dla FAS, także przyczyną licznych zaburzeń neurologicznych (padaczka, autyzm, dysleksja, zespół Aspergera, zespół Retta). Podkorowa heterotopia, zwana także zespołem podwójnej kory cechuje, między innymi, zespół Walker-Warburga.

Konsekwencją nadmiernej, nie uporządkowanej migracji neuronów mogą być również zespoły wrodzonej dystrofii mięśniowej.

Interpretacja wczesnych uszkodzeń kory mózgowej przez alkohol dotyczy wpływu na nerwowe komórki macierzyste. Generalnie, ich biologiczną właściwością jest duża wrażliwość na działanie alkoholu (nikotyny i innych neurotoksyn). Wykazano, że alkohol hamuje ich mitozę w fazie G1 co wpływa na ich odnowę oraz migrację.

Ostatnich latach liczne badania koncentrują się epigenetycznym mechanizmie uszkodzeń, w którym najważniejszą rolę przypisuje się microRNA. Pierwszych dowodów na udział microRNA w teratogenezie alkoholowej dostarczono w 2007 r. [76]. Ekspresja microRNA jest niezbędna do odnowy i dojrzewania komórek macierzystych, a wrażliwość na działanie alkoholu jest zależna od stadium rozwojowego. Wykazano w doświadczeniach na myszach, że krytyczny czas toksycznego działania przypada ona na okres odpowiadający drugiej połowie pierwszego trymestru ciąży i pierwszej połowie trzeciego trymestru. Wrażliwość teratogenna zależy także od klasy micro RNA.

W życiu prenatalnym człowieka (w końcu pierwszego trymestru i w trzecim trymestrze) z nerwowych komórek macierzystych powstaje większość neuronów

dojrzałego mózgowia. W okresie postnatalnym, dzięki komórkom macierzystym, neurogeneza jest kontynuowana przez kilkanaście – kilkadziesiąt lat.

Rzekomoglejowe, pseudo-glejowe komórki *neuroepithelium* znajdują się w kilku miejscach mózgowia u dorosłych: (1) jako tzw. dojrzałe komórki macierzyste (ang. *adult stem cells*) w strefie podkomorowej, (2) pod postacią komórek Müllera w siatkówce, oraz (3) komórek glejowych Bergmana w móżdżku.

Komórki glejowe stanowią prawie połowę komórek w mózgowiu człowieka [75, 88, 89, 90]. Ta zróżnicowana rozwojowo populacja komórkowa zwana także tkanką glejową składa się z: (1) astrocytów włóknistych i protoplazmatycznych, (2) oligodendrocytów, (3) komórek mikrogleju (mezogleju) (4) oraz komórki ependymy. Wszystkie wykazują, równie dużą co komórki nerwowe (zdaniem niektórych autorów nawet większą), wrażliwość na toksyczne działanie alkoholu [16, 96, 97, 104].

W ośrodkowym układzie nerwowym najliczniej występują astocyty. Wypustki astrocytów partycypują w wykształceniu błony granicznej glejowej (pod oponą miękką) oraz błony glejowej naczyniowej (struktury warunkującej wymianę krew-mózg). Alkohol, poprzez nie w pełni poznane mechanizmy, uszkadza powstawanie, różnicowanie i proliferację astrocytów, zaburza integralność morfologiczno-czynnościową błon glejowych, przyczyniając się generalnie do astrolizy i w konsekwencji do mikrocefalii.

Głównym markerem molekularnym astrocyów jest kwaśne białko włókienkowe gleju (ang. *glial fibrillary acid protein,* GFAP). Białko to buduje filamenty pośrednie cytoplazmy astrocytów i jest bardzo wrażliwe na działanie alkoholu. Astrocyty płodowe narażone na działanie alkoholu w hodowli komórkowej wykazują zmniejszona ekspresję GFAP i stopniowo obumierają. Spadek ekspresji GFAP potwierdzono także mózgu zwierząt doświadczalnych, po podaniu alkoholu po urodzeniu. Uszkodzenie nastąpiło w mechanizmie epigenetycznym, poprzez metylację DNA promotorowego genu *gfap*.

Fibroblastyczny czynnik wzrostowy (ang. *fibroblast growth factor,* FGF2), kolejna molekuła istotna dla funkcjonowania astrocytów, indukuje ekspresję genu astrocytów (GFAP) pośrednio, ułatwiając dostęp do GFAP poprzez rzęskowy czynnik neurotroficzny (ang. *cilliary neurotrophic factor,* CNTF*).* Inne czynniki wzrostu – płytkowy czynnik wzrostu (ang. *platelet-derived growth factor,* PDGF) i insulino podobny czynnik wzrostu (ang. *insulin-like growth factor,* IGF1) warunkują prawidłowy rozwój astrocytów. Zaburzenie ścieżki sygnałowej tych molekuł stwierdzono po dodaniu do hodowli astrocytów alkoholu (w rezultacie nastąpiło zahamowanie proliferacji astocytów – astroliza).

W hodowli komórkowej zarodkowego kresomózgowia, po podaniu do medium alkoholu, stwierdzono znaczne obniżenie aktywności dzielących się komórek prekursorowych astrocytów włóknistych. Nastąpiło to miedzy innymi z powodu osłabienia sygnalizacji Notch1 i Fgfr1 w prekursorowych astrocytach [74].

Kolejny mechanizm „alkoholowego" uszkodzenia astrocytów dotyczy generowania wolnych rodników. Pod wpływem alkoholu, w hodowli astrocytów, dochodzi do redukcji glutationu (GSH), zaktywowania cyklooksygenazy 2 (Cox-2) i w rezultacie do masywnego obumierania astrocytów, w mechanizmie apoptozy.

Mózgowie, które stanowi około 5% masy ciała, zawiera dużo bardzo cholesterolu (około 15-20 % całkowitej puli ustrojowej). W czasie rozwoju prenatalnego cholesterol jest niezbędny, miedzy innymi do proliferacji i przeżycia neurocytów, oraz aktywacji szlaku sygnałowego *sonic hedgehog*. Krążenie cholesterolu jest związane z wydzielaniem lipoprotein przez astrocyty. Astrocyty (a także mikroglej) cechuje wysoka ekspresja lipoproteiny E (apoE), która jest głównym składnikiem lipoprotein mózgowych. Alkohol zaburza proces uwalniania lipoprotein z astrocytów, co prowadzi do zwiększonego wypływu cholesterolu z astrocytów i neurocytów i w rezultacie do zaburzenia homeostazy cholesterolu.

Astrocyty cechuje dimorfizm płciowy [95, 96]. Astrocyty płci żeńskiej są bardziej wrażliwe na działanie alkoholu od astrocytów płci męskiej, a niektóre zburzenia narządu wzroku, jak nieskoordynowane ruchy gałek ocznych, występują częściej u dziewczynek. Ten fenomen ma swoje, częściowe, wyjaśnienie w powiązaniu neurotoksyczności alkoholu z ekspresją GFAP i glutaminianu.

Oligodondrocyty (komórki gleju skąpo wypustkowego) uczestniczą w mielinizacji włókien głównych szlaków nerwowych ośrodkowego układu nerwowego (mózgowia i rdzenia kręgowego). Pochodzący z *neuroepithelium* oligodendrocyt zbliża się do komórki nerwowej i swoja wypustką okręca się dookoła włókna aksonalnego tworząc koncentryczny układ blaszek osłonki mielinowej. Jeden oligodendocyt może brać udział w mielinizacji nawet kilkudziesięciu aksonów. W obwodowym układzie nerwowym mielinizacja odbywa się z udziałem lemocytów (komórek Schwanna). Cała komórka Schwanna zawija się dookoła jednego aksonu tworząc 1-20 zwojów mieliny. Liczne badania doświadczalne u myszy, szczurów, owiec i małp wykazały, iż alkohol redukuje liczbę oligodendrocytów, zaburza proces mielinizacji. Skutkiem jest zmniejszona objętość substancji białej mózgu i móżdżku, ciała modzelowatego i/lub spoidła przedniego, potwierdzona współczesnymi technikami obrazowania mózgu. Mapowanie uszkodzeń w istocie białej mózgu jest coraz bardziej precyzyjne i skorelowane z zaburzeniami (np. uszkodzenia włókien nerwowych w *splenium* – płacie ciała modzelowatego i defekty ruchowe oka) [83].

Wrażliwym na działanie alkoholu jest główny składnik mieliny – zasadowe białko mieliny (ang. *myelin basic protein,* MBP). Częstą wadą osób z FASD jest uszkodzenie narządu wzroku. W modelu zwierzęcym FASD obserwowano upośledzenie liczby oligodendrocytów, obniżoną ekspresję MBP i w rezultacie hipoplazję nerwu wzrokowego (mniej aksonów w nerwie, zredukowana osłonka mielinowa aksonów oraz liczne uszkodzenia mikroskopowo-elektronowe w jej strukturze).

Wg Strömlanda u dzieci z FAS występują różne wady wzroku (mikroftalmia, mikrokornea, zaćma, anomalia Petersa, wady ciała szklistego, tęczówki, naczyniówki i siatkówki, szczelina oczna, oraz najczęściej hipoplazja nerwu wzrokowego), powstające wskutek uszkodzenia różnych części rozwojowych oka [85, 86].

Komórki mikrogleju (mezogleju, komórki Rio Hortegi) pochodzą ze szpiku kostnego i z tego kompartymentu hematopoetycznego wędrują do ośrodkowego układu nerwowego, gdzie pełnią liczne, ciągle na nowo poznawane, funkcje. Posiadają zdolność rozpoznawania patogenu, mobilizowania komórek układu immunologicznego, usuwania patogenu i naprawy uszkodzeń. Wydzielając liczne cytokiny, czynniki wzrostowe, prostaglandyny, leukotrieny zapewniają homeostazę ośrodkowego układu nerwowego. Badania kliniczne i przedkliniczne sugerują, że mikroglej pełni kluczową rolę w neurotoksyczności, poprzez współudział w rekcjach zapalnych mózgu prowadzących do obumierania komórek nerwowych [13, 16, 21, 47, 100]. Toksyczne działanie alkoholu (apoptozę) wykazano także w niedojrzałych neuronach podwzgórza szczura (alkohol zwiększa wydzielanie czynników pochodzących z mikrogleju, które z kolei obniżają stężenie cyklicznego AMP oraz BDNF, a te następnie zwiększają stres oksydacyjny i apoptozę w neuronach podwzgórza).

Prozapalną, poalkoholową aktywność mikrogleju można osłabić pioglitazonem. Pioglitazon jest agonistą receptora jądrowego PPAR-gamma (ang. *peroxysome proliferator-activated receptor gamma*), członkiem rodziny białek receptora jądrowego. Jest lekiem stosowanym w cukrzycy typu 2. Wyniki tych badań zrodziły nieśmiałe nadzieje (spekulacje) na leczenie FASD [19, 36].

Ogólnie znany jest wpływa alkoholu na osłabienie odporności immunologicznej ustroju. Opierając się na tym fakcie oraz znaczeniu mikrogleju w rozwoju i funkcjonowaniu ośrodkowego układu nerwowego sformułowano hipotezę o neuroimmunologicznym mechanizmie teratogenezy alkoholowej [34]. Weryfikacja tej koncepcji wymaga dalszych badań.

Uważa się, że komórki glejowe są bardziej wrażliwe na toksyczne działanie alkoholu aniżeli neurocyty. Uszkodzenie komórek glejowych może nastąpić na początku neurogenezy (kształtowania się *neuroepithelium*), ale szczyt gliogenezy, i tym samym szczyt wrażliwości na działanie alkoholu przypada na trzeci trymestr ciąży.

W patologii chorób i wad układu nerwowego coraz częściej znaczącą role przypisuje się astrocytom, ologodendrocytom i komórkom mikrogleju. Uszkodzenia rozwojowe tych komórek mogą uczestniczyć, miedzy innymi, w rozwoju takich znanych wad jak: zespół Downa, zespół łamliwego chromosomu X, zespół Castello (twarzowo-skórno-szkieletowy). Dysfunkcje astrocytów kojarzone są z autyzmem oraz zespołami depresyjnymi, schizofrenią i innymi chorobami psychicznymi.

W taratogenezie alkoholowej krytycznym okresem jest synaptogeneza (powstawanie synaps), której szczyt przypada na trzeci trymestr ciąży. Synapsy, których liczba jest niewyobrażalnie duża, powstają także, co oczywiste, z życiu po-

stnatalnym w miarę rozwoju układu nerwowego. Astrocyty i mikroglej aktywnie kontrolują strukturalną i czynnościową plastyczność synaps w życiu płodowym i u dorosłych [89, 92]. Alkohol uszkadza jedno z najważniejszych białek – PSD 95 (ang. *postsynaptic density protein*), zaangażowanych w kaskadowe molekularne procesy przewodnictwa synaptycznego [67, 89, 90, 93].

Alkohol etylowy – teratogenny czynnik środowiskowy, działając poprzez mechanizm genetyczny i epigenetyczny zaburza rozwój licznych narządów. Uszkodzenia strukturalne i neurobehawioralne ujawniają się w różnych okresach życia, są trudne do rozpoznania i do korygowania. Mają rozliczne konsekwencje socjologiczne, psychospołeczne, ekonomiczne, prawne i inne.

Poznanie mechanizmów, oraz świadomość zagrożeń alkoholu dla potomstwa jest najważniejszym czynnikiem profilaktycznym, gdyż FASD jest wprawdzie bardzo ciężką wadą (określaną niekiedy tragiczną wadą), ale można jej skutecznie zapobiec.

LITERATURA

[1] Abel EL. Fetal alcohol syndrome and fetal alcohol effects. Plenum Publishing Corporation. New York. N.Y. Third Printing. 1993.

[2] Abel EL. Was the Fetal Alcohol Syndrome recognized by the Greeks and Romans? *Alcohol & Alcoholism* 1999; **34**(6): 868-872.

[3] Abel EL. Cerebral palsy and alcohol consumption during pregnancy: is the connection? *Alcohol & Alcoholism* 2010; **45**(6): 592-594.

[4] Aoto K, et al. Fetal alcohol exposure protein kinase A and impairs Shh expression in prechordal mesoderm cells in the pathogenesis of holoprosencephaly. *Birth Def Res Part A* 2008; **82**(4): 224-231 .

[5] Bager H, et al. Biomarkres for the detection of prenatal exposure: A review. *Alcohol Clin Exp Res* 2017; **41**(2): 251-261.

[6] Balaraman S, et al. Disregulation of microRNA expression and function contributes to the etiology of Fetal Alcohol Spectrum Disorders. *Alcohol Res* 2013; **35**(1): 18-24.

[7] Ballas N, et al. REST and its corepressors mediate plasticity of neuronal gene chromatin throughout neurogenesis. *Cell* 2005; **121**: 645-657.

[8] Bartel H. Embriologia. Podręcznik dla studentów. PZWL, Warszawa, Wyd. V. 2012.

[9] Becker HC, et al. Teratogenic actions of ethanol in the mouse: a minireview. *Pharmacol Biochem Behav* 1996; **55**: 501-513.

[10] Berres ME, et al. Transcriptome profiling identifies ribosome biogenesis as a target of alcohol teratogenicity and vulnerability during early embryogenesis. *PLoS One* 2017; January.

[11] Bolnick AD, et al. Nifedipine prevents apoptose of alcohol exposed first trimester trophoblast cells. *Alcohol Clin Exp Res* 2018; **42**(1): 53-60.

[12] Bookstein FL, et al. Damage to the human cerebellum from prenatal alcohol exposure: the anatomy of a simple biometrical explanation. *Anat Rec Part B* 2006; **289B**: 195-209.

[13] Boschen K, et al. Neonatal binge alcohol exposure increases microglial activation in the developing rat hippocampus. *Neuroscience*, 2016; **324**, 355-366.

[14] Burns L, et al. Fetal alcohol disorders in Australia: An update. Monograph of the Intergovernmental Committee of Drugs Working Party of Fetal Alcohol Spectrum Disorders. 2012; June, ISBN.

[15] Caputo C, et al. Impact of fetal alcohol exposure on body systems: A systematic review. *Birth Def Res Part C* 2016; **108**(2): 174-180.

[16] Chastain LG, Sarkar DK. Role of microglia in the regulation of ethanol neurotoxin action. *Int Rev Neurobiol* 2014; **118**: 81-103.
[17] Datta S, et al. Fetal alcohol syndrome (FAS) in C57BL/6 mice detected through proteomics screening of the amniotic fluid. *Birth Def Res Part C* 2008; **82**(4): 177-238.
[18] Delpisheh A, et al. Prenatal alcohol exposure, *CYP17* gene polymorphisms and fetal growth restriction. Eur J Obstet Gynecol and Reprod Med 2008; **138**(1): 49-53.
[19] Drew PD, Et Al. Pioglitazone block ethanol induction of microglial activation and immune responses in the hippocampus, cerebellum, ad cerebral cortex in a mouse of fetal alcohol spectrum disorders. *Alcohol Clin Exp Res*. 2015; **39**(3): 445-454.
[20] Eberhart JK, Parnell SE. The genetics of fetal alcohol spectrum disorders. *Alcohol Clin Exp Res* 2016; **40**(6): 1154-1165.
[21] Fernandez-Lizarbe S, et al. Critical role of TLR4 response in the activation of microglia induced by ethanol. *J Immunol* 2009; 1, **183**(7): 4733-4744.
[22] Flentke G, et al. The calcium-mediated repression of β-catenin and its transcriptional signaling mediates neural crest cell death in an avian model of fetal alcohol syndrome. *Birth Def Res Part A*. 2011; Jul **91**(7): 591-602.
[23] Fuglestad AJ, et al. Overweight and obesity among children and adolescents with fetal alcohol spectrum disorders. *Alcohol Clin Exp Res* 2014; Sep, **38**(9): 2502-2508.
[24] Gemma S. et al. Metabolic and genetic factors contributing to alcohol induced effects and fetal alcohol syndrome. *Neurosci Biobehav Rev* 2007; **31(**2): 221-229.
[25] Gomez-Roig MD, et al. Maternal hair testing to disclose self-misreporting in drinking and smoke behavior during pregnancy. *Alcohol* 2018; **67**(3): 1-6.
[26] Gross TS, et al. Ethyl linolenate is elevated in meconium of very-low-birth-weight neonates exposed to alcohol in utero. *Pediatr Res* 2017; **81**(3): 461-467.
[27] Haycock PC. Fetal alcohol spectrum disorders: The epigenetic perspective. *Biol Reprod* 2009, Oct; **81**(4): 607-617.
[28] Heller M, Burd L. Review of ethanol dispersion, distribution, and elimination from fetal compartment. *Birth Def Res Part A* 2014; **100**(4): 277-283.
[29] Jones KL, et al. Pattern of malformation in offspring of chronic alcoholic mothers. *Lance*t 1973; **1**: 1267-1271 .
[30] Jones KL, Smith DW. Recognition of the fetal alcohol syndrome in early infancy. *Lancet* 1973, 3; **302(**7836): 999-1001.
[31] Jones KL. The effects of alcohol on fetal development. Birth Def Res Part C 2011; **93**(1): 3-11.
[32] Kajimoto K, et al. Fate analysis of adult hippocampal progenitors in a murine model of fetal alcohol spectrum disorder (FASD). *PLoS One* 2013; **8**(9): 1-11.
[33] Kaminen-Ahola N, Ahola A, Maga M, et al. Maternal alcohol consumption alters the epigenotype and the phenotype in mouse model. *PloS Genetics* 6: 2010b, 1-10.
[34] Kane C, et al. Neuroimmune mechanism in fetal alcohol spectrum disorder. *Develop Neurobiol* 2012; **72**:1302-1316.
[35] Kane CJ, et al. Proceedings of the 2010 annual meeting of the Fetal Alcohol Spectrum Disorders Study Group. *Alcohol* 2012; **46**(1): 107-114.
[36] Kane CJ, et al. Protection of neurons and microglia against ethanol in mouse model of fetal alcohol spectrum disorders by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists. *Brain Behav Immun* 2011; **25**: S137-S145. Doi: 10.1016/j.bbi.2011.02.016.
[37] Kelly SJ, et al. Animal models of fetal alcohol spectrum disorders: impact of the social environment. *Dev Disabil Res Rev* 2009; **15**: 200- 208.
[38] Knuiman S, et al. Children adopted from Poland display a high risk of foetal alcohol spectrum disorders and some may go undiagnosed. *Acta Pediatr*. 2015; **104**(2): 206-211.
[39] Kobor MS, Weinberg J. Focus on: Epigenetics and fetal alcohol spectrum disorders. *Alcohol Research & Health* 2011; **34**(1):29 -37.

[40] Konovalov HV, et al. Disorders of brain development in the progeny of mothers who used alcohol during pregnancy. *Early Hum Dev* 1997; **48**: 1-2, 153-166.
[41] Kulaga V, et al. Fatty acid ethyl esters (FAEE); comparative accumulation in human, guinea pig hair as biomarker for prenatal alcohol exposure. *Alcohol & Alcoholism* 2006; **41**(5): 534-539.
[42] Kulaga V, et al. Hair analysis of fatty acid ethyl esters in the detection of excessive drinking in the context of fetal alcohol spectrum disorders. *Ther Drug Monit* 2009; **31**(2): 261-266.
[43] Kumada T, et al. Reversal of neuronal migration in mouse model of fetal alcohol syndrome by controlling second-messenger signaling. *J Neuroscience* 2006; **26**(3): 742-756.
[44] Kvigne VL, et al. Characteristics of grandmothers who have grandchildren with fetal syndrome or incomplete fetal alcohol syndrome. *Maternal Child Health J.* 2008; **12**(6):760-765.
[45] Lemoine P, et al. Les enfantes de parents alcoholiques: anomalie observees a propos de 127 cas. *Quest Medical* 1968; **21**: 476-482.
[46] Lemoine P. The history of alcoholic fetopathies. *J FAS Int* 2003; **1**: e2.
[47] Li Q, Barres BA, Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. *Nature Rev Immunol*. 2018; **18**: 225-242.
[48] Lipinski RJ, et al. Ethanol-induced face-brain dysmorphology patterns are correlative and exposure-stage dependent. *PLoS One* 2012; **7**(8): e 43067.
[49] Little RE, Sing CF. Father's drinking and infant birth weight: report of an association. *Teratology* 1987; **36**: 59-65.
[50] Littner Y. Elevated fatty acid ethyl esters in meconium oh sheep fetuses exposed *in utero* to ethanol. – A new animal model. *Pediatr Res* 2008; **63**: 164-168.
[51] Livy DJ, et al. Long-term alcohol exposure prior to conception results in lower fetal body weights. *Birth Def Res Part B* 2004; **71**: 135-141.
[52] Lussier AA, et al. Epigenetics studies of fetal alcohol spectrum disorder: where are we now? *Epigenomics* 2017; **9**(3): 291-311.
[53] Mason S, Zhou FC. Editorial: Genetics and epigenetics of fetal alcohol spectrum disorders. *Front Genet* 2015; **6**: 146. lub 16 April 2015. https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00146.
[54] May PA, et al. Epidemiology of fetal alcohol syndrome in a South African community in the Western Cape province. *Am J Public Health* 2000; **90**(12): 1905-1912.
[55] May PA, Gossage JP. Maternal risk factors for fetal alcohol spectrum disorders: Not as simple as it might seem. *Alcohol Res Health* 2012; **34**(1): 15-25.
[56] McClure KD, et al. A Drosphila model for fetal alcohol syndrome disorders: role for insulin pathway. *Dis Model Mech* 2011; **4**: 335-346.
[57] McCormack C, et al. Prenatal alcohol consumption between conception and recognition of pregnancy. *Alcohol Clin Exp Res* 2017; **41**(2): 369-378.
[58] Mead EA, Sarkar DK. Fetal alcohol spectrum disorders and their transmission through genetic and epigenetic mechanism. *Front Genet* 2014; **5**: 154. doi: 10.3389/fgene.2014.00154.
[59] Miłkowski J, Chudzik W. Zespół alkoholizowanego płodu. *Pol Tyg Lek* 1982; **37**(9-10): 281-289.
[60] Miranda RC. MicroRNAs and fetal brain development: implications for ethanol teratology during the second trimester period of neurogenesis. *Front Genet* 2012; **16**(3): 77.
[61] Mooney SM, et al. Ethanol induces heterotopias in organotypic cultures of rat cerebral cortex. *Cerebral Cortex* 2004; **14**(10): 1071-1080.
[62] Moore EM, et al. Fetal alcohol spectrum disorders recent neuroimaging findings. *Curr Dev Disord Rep* 2014; **1**(3): 161-172.
[63] Murawski NJ, et al. Advances in diagnosis and treatment of fetal alcohol spectrum disorders. *Alcohol Res* 2015; **37**(1): 97-108.
[64] Okulicz-Kozaryn K, et al. FASD prevalance among schoolchildren in Poland. *J Appl Res Intellect Disabil* 2017; **30**(1): 61-70.
[65] O'Leary-Moore SK, et al. Magnetic resonance-based imaging in animal models of fetal alcohol spectrum disorders. *Neuropsychol Rev*. 2011; Jun, **21**(2): 167-185.

[66] Petkovic G, et al. Prevalence of fetal alcohol syndrome and maternal characteristics in a sample of schoolchildren from a rural province of Croatia. *Int J Environ Res Public Health* 2013; **10**(4): 1547-1561.
[67] Pfrieger FW. Roles of glial cells in synapse development. *Cell Mol Life Sci* 2009; **66(**13): 2037-2047.
[68] Popova S, et al. Estimation of national, regional and global prevalence of alcohol use during pregnancy and fetal alcohol syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health* 2017; **5**(3): 290-299.
[69] Popova S, et al. What research is being done on prenatal alcohol exposure and fetal alcohol spectrum disorders in Russian research community ? *Alcohol Alcohol* 2014; Jan, **49**(1): 84-95.
[70] Reilly M. Role of non-coding RNAs in the neuroadaptation to alcoholism and fetal alcohol exposure. *Front Genet*. 2012; **3**: 70. doi:10.3389/fgene.2012.00070.
[71] Riley EP, et al. Fetal alcohol spectrum disorders: An overview. *Neuropsychol Rev* 2011; **21**(72): 73-80. doi: 10.1007/s11065-9166-x.
[72] Roozen S, et al. Worldwide prevalence of fetal alcohol spectrum disorders: a systematic literature review including meta-analysis. *Alcohol Clin Exp Res* 2016; **40**(1): 18-32.
[73] Rosett HL, Weiner L. Alcohol and the fetus. *A clinical perspective*. 1984, New York, Oxford University Press.
[74] Rowitch DH, Kriegstein AR. Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification. *Nature* 2010; **468**(7321): 214-222.
[75] Rubert G, at al. Ethanol exposure during embryogenesis decreases the radial glial progenitor pool and affects the generation of neurons and astrocytes. *J Neurosc Res* 2006; **84**(3): 483-496.
[76] Sathyan P, et al. Competing interactions between micro-RNAs determine neural progenitor survival and proliferation after ethanol exposure: evidence from an ex vivo model of the fetal cerebral cortical neuroepithelium. *J. Neurosci.* 2007; 8, **27**(32): 8546-8557
[77] Schardein JL, Macina OT. Human Developmental Toxicans. *Aspects of Toxicology and Chemistry.* 2007. Taylor & Francis Group. LLC 6000 Broken Sound Parkway NW, Suite 300. Boca Raton, FL.
[78] Siler-Marsiglio KI, et al. Effects of acute ethanol exposure on regulatory mechanisms Bcl-2-associated apoptosis promoter, Bad, in neonatal rat cerebellum: differential effects during vulnerable and resistant developmental periods. *Alcohol Clin Exp Res* 2006; **30**(6): 1031-1038. 77a
[79] Sioda T. Wpływ alkoholu na prokreację i wczesny okres macierzyństwa. *Pediatr Pol* 2009; **84**(4): 344-361.
[80] Smith SM. Genetic factors that shape craniofacial outcome and neural crest vulnerability in FASD. *Front Genet* 2014; **5**: 224.
[81] Smith SM, et al. Neural crest development in fetal alcohol syndrome. *Birth Def Res Part C* 2014; **102**(3): 210-220.
[82] Solzak JP, et al. Commonality in Down and fetal alcohol syndromes. *Birth Def Res Part A* 2013; **97**(4): 187-197.
[83] Sowell ER, et al. Mapping white matter integrity and neurobehavioral correlates in children with fetal alcohol spectrum disorders. *J Neurosci* 200; **28**(6): 1313-1319.
[84] Streissguth AP, Deheane P. Fetal alcohol syndrome in twins of alcoholic mothers: concordance of diagnosis and IQ. *Am J Med Genet* 1993; **47**(6): 857-861.
[85] Strömland K. Visual impairment and ocular abnormalities in children with fetal alcohol syndrome. Addict Biol 2004, 9, 153-157; discussion 159-160. doi:10.1080/13556210410001717024.
[86] Strömland K, et al. Fetal alcohol spectrum disorders among children in Brazilian orphanage. *Birth Def Res Part A* 2015; **103**(3): 178-185.
[87] Sulik KK, et al. Fetal alcohol syndrome: embryogenesis in a mouse model. *Science* 1981; **214**(4523): 936-938.
[88] Tunc-Ozcan E, et al. Hipothesis: genetic and epigenetic risk factors interact to modulate vulnerability and resilience to FASD. *Front Genet* 2014; **5**: 261.
[89] Ullian EM. Role for glia in synaptogenesis. Glia 2004, 47, 3, 209-216.

[90] Vainchtein ID. Astrocyte-derived interleukin-33 promotes microglial synapse engulfment and neural circuit development. *Science* 01. Feb. 2018. Doi: 10.1126/Science. al 3589. vol 359, issue 6375.
[91] Viljoen D, et al. *Alcohol dehydrogenase-2*2* allele is associated with decreased prevalence of fetal alcohol syndrome in the mixed-ancestry population of the Western Cape Province, South Africa. *Alcohol Clin Exp Res* 2001; **25**: 1719-1722.
[92] Vyas Y, Montgomery JM. The role of postsynaptic density proteins in neural degeneration and regeneration. *Neural Regen Res* 2016; **11**(6): 906-907.
[93] Warren KR, Li TK . Genetic polymorphism: Impact on the risk of fetal alcohol spectrum disorders. *Birth Def Res Part A* 2005; **73**: 195-203.
[94] Wells PG, et al. Fetal oxidative mechanism of neurodevelopmental deficits and exacerbation by ethanol and methamphetamine. *Birth Def Res Part C* 2016; **108**(2,10): 108-130.
[95] Wetherill L, et al. Meta-analysis of externalizing disorders: genetics or prenatal alcohol exposure ? *Alcohol Clin Exp Res* 2018; **42**(1): 162-172.
[96] Wilhelm CJ, Guizzetti M. Fetal Alcohol Spectrum Disorders: An overview from the glia perspective. *Front Integr Neurosci* 2015; **9**(65) – on line 2016 Jan 11. doi. 3389/fuint. 2015. 00065.
[97] Wilhelm CJ. Astrocyte disfunction induced by alcohol in females but not in males. *Brain Path* 2016; **26**(4): 443-451.
[98] Williams AL, Bohnsack B. Neural crest derivatives in ocular development: Discerning the eye of the storm. *Birth Def Res Part* C 2015; **105**(2): 87-95.
[99] Wilson SE, et al. Focus on: the use animal models for study of fetal alcohol spectrum disorders. *Alcohol Res Health* 201; **34**(11): 92-98.
[100] Wong EL, et al. What the spectrum of microglial functions can teach us about Fetal Alcohol Spectrum Disorders. *Front Synaptic Neurosci* 2017: **9**; 11.
[101] Wozniak JR, et al. Microstructural corpus callosum anomalies in children with prenatal alcohol exposure: An extension of previous diffusion tensor imaging findings. *Alcohol Clin Exp Res* 2009; 13(10): 1825-1835.
[102] Zelner I, Koren G. Pharmacokinetics of ethanol in the maternal-fetal unit. *J Popul Ther Clin Pharmacol* 2013; **20**(3): 259-265.
[103] Yang Y, et al. Abnormal cortical thickness alternations in fetal alcohol spectrum disorders and their relationships with facial dysmorphology. *Cereb Cortex* 2012; **22**(5): 1170-1179.
[104] Zhang X, et al. Regulation of DNA methylation by ethanol induces tissue plasminogen activator expression in astrocytes. *J Neurochem* 2014; **128**(3): 334-349.
[105] Zhou FC, et al. Moderate alcohol exposure compromises neural tube midline development in prenatal brain. *Brain Res Dev Brain Res* 2003; **144**: 43-55.
[106] Zhu Y, et al. Maternal periconceptional alcohol consumption and congenital heart defects. *Birth Def Res Part A* 2015; **103**: 617-629.

Redaktor prowadzący − Maciej Zabel

Otrzymano: 23.10.2019
Przyjęto: 19.11.2019
Hieronim Bartel
Zakład Histologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
90-752 Łódź, ul. Żeligowskiego 7/9