Проект «**Донозологическая оценка патологии детей, рожденных от родителей, злоупотребляющих алкоголем, на основе изучения особенностей метаболического профиля**»

Грант РФФИ № **15-04-08621-А**

Сроки выполнения 2015-2017

Руководитель **Скальный А.В.**

**Цель и задачи фундаментального исследования**

Целью настоящего исследования является выявление специфических метаболических нарушений в организме детей, рожденных от родителей, злоупотребляющих алкоголем. Перед исследованием ставятся следующие задачи. Определить состояние здоровья беременных женщин, злоупотребляющих алкоголем. Оценить содержание спектра макро- и микроэлементов, витаминов, аминокислот в начале в организме беременных женщин на этапах первого и третьего триместра, а затем и у их новорожденных детей с последующим патронажем в течение 1 года с проведением комплексной оценки состояния здоровья и метаболического статуса. Провести поиск возможных "сигнальных" параметров изменения метаболизма в организме беременных и грудных детей при злоупотреблении матерями алкоголем. Выявление возможных индикаторов влияния алкоголя на организм беременных и новорожденных детей обеспечит возможность специализированного и углубленного медицинского сопровождения при скрытом злоупотреблении алкоголем будущими матерями. Принципиально новый подход к комплексной оценке состояния здоровья, с определением метаболического статуса позволит не только выявить возможные причины развития заболеваний детей, вызванных алкоголем и продуктами его метаболизма при злоупотреблении им матерями, а значит, и получить возможность провести своевременную профилактику патологии развития детей и в будущем улучшить эпидемиологические и демографические показатели населения области. Здоровье будущего поколения определяет социальную обстановку и экономические показатели общества.

**Важнейшие результаты, полученные в ходе реализации Проекта**

Характеристика обследуемых

Проведение анкетирования продемонстрировало различия между контрольной группой и группой риска в частоте и количестве потребления алкоголя. В частности, женщины из группы риска достоверно большее количество раз выпивали 1-2 (Параметр II), 3-4 (Параметр III), а также 5 и более (Параметр IV) алкогольных напитков за 1 сутки в месяц до начала беременности чем лица из группы контроля. В то же время, сравнение показателей новорожденных (Апгар, роста и веса) показало отсутствие различий между группами детей, рожденных от здоровых матерей и употреблявших алкоголь. В дальнейшем исследована взаимосвязь между данными показателями и исследуемыми показателями обмена веществ.

Концентрация химических элементов в сыворотке крови беременных женщин

Результаты исследования концентрации микроэлементов в сыворотке крови беременных женщин показали, что наиболее выраженным различиям был подвержен уровень цинка. Так, сывороточная концентрация цинка в 1 и 3 триместре у здоровых женщин превышала показатели обследуемых, страдающих алкоголизмом, на 24 и 26%, соответственно. Сывороточный уровень меди у женщин, страдающих алкоголизмом, в 1 триместре беременности был на 9% ниже контрольных значений в соответствующий период. При этом увеличение срока беременности у здоровых женщин было ассоциировано с некоторым повышением данного показателя. Напротив, у беременных на фоне употребления алкоголя наблюдалось снижение сывороточной концентрации меди с 1 по 3 период. Так, содержание меди в сыворотке крови страдающих алкоголизмом женщин характеризовалось достоверным снижением на 21% относительно контрольных значений в 3 триместре беременности. Подобные изменения отмечались и в случае измерения сывороточной концентрации железа. Несмотря на то, что уровень селена в сыворотке женщин контрольной группы в 1 и 3 триместре превышал соответствующие показатели группы риска на 21 и 24%, данные изменения не являлись статистически достоверными. Концентрация марганца в сыворотке крови как здоровых, так и страдающих алкоголизмом женщин оставалась стабильной в течение беременности. Интересно, что уровень никеля в период с 1 по 3 триместр беременности у женщин из контрольной группы характеризовался практически двукратным увеличением. Напротив, увеличение срока беременности у женщин, страдающих алкоголизмом, приводило к двукратному снижению данного показателя относительно исходного уровня (1 триместр). При этом, в 3 триместре уровень никеля у женщин группы риска был практически в 4 раза ниже соответствующих значений контрольной группы.

Корреляционный анализ показал, что у женщин, злоупотребляющих алкоголем, между показателями 1 и 3 триместра не было выявлено достоверных корреляций в содержании всех исследуемых элементов. Более того, если в случае контрольной группы большая часть показателей (за исключением Mn и Ni) характеризовалась прямой корреляцией, то у женщин, страдающих алкоголизмом, была выявлена обратная взаимосвязь различной степени.

Концентрация электролитов (Ca, K, Na, P) в сыворотке крови здоровых, а также злоупотребляющих алкоголем женщин во время беременности достоверно не различалась. В то же время, у обследуемых женщин из группы контроля обнаружена тенденция к увеличению сывороточной концентрации Ca, K, Na, P с 1 по 3 триместр беременности. В то же время, уровень данных электролитов в сыворотке крови женщин, злоупотребляющих алкоголем, напротив, характеризовался тенденцией к снижению.

Корреляционный анализ показал, что между уровнем кальция, натрия и фосфора в 1 и 3 триместры беременности у здоровых женщин существует достоверная прямая взаимосвязь. Стоит отметить также прямую зависимость между уровнем магния в различные временные периоды, которая приближалась к достоверной. При этом у женщин основной группы не было выявлено достоверных корреляций в содержании всех исследуемых элементов между показателями 1 и 3 триместра. Следует отметить тенденцию к изменению характера корреляционных связей у женщин, злоупотребляющих алкоголем до и в период беременности. Так, у них отмечена склонность к обратной зависимости между уровнем исследуемых элементов в сыворотке, что наиболее отчетливо прослеживается в случае кальция и фосфора.

Содержание химических элементов в волосах беременных женщин и детей  
Химический анализ волос методом ИСП-МС не выявил достоверных изменений содержания эссенциальных микроэлементов в волосах женщин в результате злоупотребления алкоголя. В то же время, статистически значимым являлось двукратное повышение уровня лития в образцах волос женщин из группы риска по сравнению с контрольными значениями. Обращает на себя внимание 40% снижение марганца в результате злоупотребления алкогольными напитками до беременности (р>0,1). Несмотря на выраженное 80% повышение уровня натрия в волосах женщин из группы риска, данное изменение не являлось достоверным.

Для выявления возможной зависимости между употреблением алкоголя до наступления беременности и содержанием микроэлементов в волосах обследуемых в каждой группе был проведен корреляционный анализ. Установлено, что в контрольной группе возраст первого употребления алкоголя напрямую коррелировал с уровнем калия (r = 0,616; p =0,033) в волосах и был обратно взаимосвязан с содержанием никеля (r = -0,719; p = 0,008). Стоит отметить, что уровень ванадия в волосах женщин контрольной группы достоверно коррелировал как с возрастом первого употребления алкоголя (r = 0,705; p = 0,010), так и количеством употребления 1-2 алкогольных напитков в сутки в течение месяца до начала беременности (r = 0,675; p = 0,016). При этом корреляционный анализ между уровнем элементов в волосах, а также другими параметрами провести не представлялось возможным в связи с отсутствием употребления алкоголя в больших дозах женщинами в контрольной группе.

Как и в случае контрольной группы, возраст первого употребления алкоголя у женщин, злоупотребляющих алкоголем до беременности, был достоверно взаимосвязан с уровнем калия в волосах (r = 0,714; p = 0,006). Статистически значимая корреляция с данным параметром была отмечена также в случае фосфора (r = 0,860; p = 0,000). Частота употребления 1-2 напитков в сутки в течение месяца до беременности характеризовалась достоверной взаимосвязью с концентрацией кобальта (r = 0,560; p = 0,046), хрома (r = -0,555; p = 0,049), а также цинка (r = 0,684; p = 0,010) в волосах женщин из группы риска. Стоит отметить, что месячная частота употребления больших доз алкоголя (5 и более) характеризовалась негативной корреляцией с уровнем меди (r = -0,596; p = 0,031) в волосах женщин, злоупотребляющих алкоголем.

Уровень большинства макро- и микроэлементов в волосах детей не был изменен под влиянием употребления алкоголя матерью, также как и у женщин. Единственное существенное различие между контрольной и основной группами детей было найдено в содержании лития в волосах. Интересно, что уровень лития волос у детей от матерей со злоупотреблением алкоголем были в 3 раза ниже, чем в контрольной группе. Несмотря на отсутствие существенных различий, содержание селена в волосах у детей, которые внутриутробно подвергались воздействию алкоголя, на 29% ниже по сравнению с контрольными значениями. Корреляционный анализ показал, что содержание лития в волосах у женщин из группы контроля и их детей характеризуется значительной положительной связью (r = 0,859; р <0,001). В то же время, наблюдалась обратная корреляция между содержанием ванадия в волосах детей и матери (r = -0,608; р = 0,036). Корреляция между уровнями содержания других макро- и микроэлементов в волосах матерей и их детей не было статистически значимым.

В основной группе с воздействием алкоголя на плод во время беременности было выявлено изменение корреляционных связей. В частности, наблюдалась прямая корреляционная связь между содержанием ртути в волосах (r = 0,766; р = 0,002) у женщин, употреблявших алкоголь, и их детей. В отличие от группы контроля, не было обнаружено значимой корреляции между содержанием лития в волосах матерей и детей (r = 0,005; р = 0,986). В то же время, как и в контрольной группе, содержание ванадия у матерей основной группы находилось в обратной зависимости по сравнению с соответствующей величиной у их детей (r = -0,528; р = 0,037).

При более углубленном изучении взаимосвязей химических элементов в волосах детей основной и контрольной групп было выявлено снижение соотношения Se-Hg у детей, рожденных от матерей, употреблявших алкоголь, на 41% по сравнению с детьми из группы контроля (2,93(1,90-4,83) vs 1,73(1,20-2,66), p<0,05). Корреляционный анализ показал значительную связь между соотношением Se-Hg в волосах всех обследованных детей и значениями Апгар.

Результаты анализов мочи основной и контрольной групп показали, что концентрация исследуемых микроэлементов и электролитов в данном биоиндикаторном субстрате у беременных характеризуется значительной вариабельностью, особенно в группе женщин, характеризующихся злоупотреблением алкоголем.

Концентрация химических элементов в цельной крови беременных женщин и их детей  
Полученные данные показывают, что употребление алкоголя оказывает влияние на содержание электролитов крови. В частности, значительное увеличение на 10% Са и 9% Na было выявлено у женщин, употреблявших алкоголь до беременности и в первом триместре. В то же время, не было обнаружено каких-либо существенных изменений в отношении микроэлементов в цельной крови.

В отличие от первого триместра беременности, в третьем триместре не было выявлено существенных межгрупповых различий в концентрации химических элементов. Тем не менее, женщины, употребляющие алкоголь, характеризовались значительным увеличением концентрации Co в цельной крови (на 17% ) по сравнению со значениями контрольной группы. В отношении других микроэлементов заметных различий не обнаружено. По сравнению со значениями, полученными в первом триместре беременности, никаких существенных изменений в третьем триместре у женщин контрольной группы обнаружено не было. В то же время, у женщин, употребляющих алкоголь, в третьем триместре концентрация Mn в цельной крови значительно увеличилась (на 39%) по сравнению таковой в первом. В отличие от этого, концентрация Ni в третьем триместре характеризовалась значительным снижением (на 32%) по сравнению с соответствующим значением первого триместра.

Уровень электролитов в пуповинной крови был достаточно стабилен. Было выявлено незначительное по сравнению с контролем снижение концентрации Са (на 7%) в пуповинной крови в группе детей, подвергшихся внутриутробному воздействию алкоголя. В то же время, употребление алкоголя матерью привело к значительному снижению уровня Сo и Mn в пуповинной крови (7% и 32%, соответственно) по сравнению с контрольными величинами. Уровень других микроэлементов не зависел от употребления алкоголя матерью.

С помощью корреляционного анализа выявлена значительная прямая связь между концентрацией в цельной крови Cd и Se в 1-м и 3-м триместрах беременности в группе контроля. Как и в случае с контрольной группой женщин, в основной группе установлена тесная взаимосвязь между концентрацией Cd в 1-м и 3-м триместрах. Несмотря на отсутствие какой-либо существенной групповой разницы в концентрации цинка, установлена прямая связь между значениями 1-го и 3-го триместра в группе женщин, употреблявших алкоголь до и во время беременности.

Была показана статистически значимая связь между содержанием электролитов в пуповинной и материнской крови. В частности, в первом триместре концентрация K в цельной крови женщин из контрольной группы значительно коррелировали с концентрацией в пуповинной крови.

В третьем триместре беременности значимая корреляция со значениями в пуповинной крови была обнаружена для Fe, Mg, P, а также концентрации Pb. Точно так же, целые концентрация K крови в первом триместре беременности у женщин, употребляющих алкоголь, была напрямую связана с содержанием электролита в пуповинной крови. С другой стороны, в третьем триместре беременности мы обнаружили тесную связь между следующими показателями в цельной крови матерей и пуповинной крови: Ca, Cd и Pb.

Наши данные свидетельствуют о том, что чрезмерное потребление алкоголя влияет на концентрацию электролитов и микроэлементов в материнской и пуповинной крови. В то же время, в первом триместре беременности наиболее заметные изменения были обнаружены в уровнях электролита цельной крови (Ca и Na), тогда как в третьем триместре беременности были затронуто содержание микроэлементов (Co и Mn). Кроме того, уровни микроэлементов в материнской крови в третьем триместре были значительно связаны с концентрацией таковых в пуповинной крови.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что нарушение обмена химических элеентов в организме беременных женщин ассоциировано с дисбалансом у их детей. Так, в частности, обращает на себя влияние повышение концентрации кобальта и марганца в крови, а также лития в волосах женщин, злоупотребляющих этанолом, тогда как у их детей, напротив, отмечалось выраженное снижение концентраций данных элементов в соответствующих биосубстратах. Одним из возможных механизмов подобных взаимосвязей может являться нарушение трансплацентарного переноса микронутриентов.  
  
Концентрация витаминов в крови беременных женщин и их детей

Результаты проведенного исследования показали, что женщины, злоупотребляющие алкоголем, не характеризуются достоверными отличиями витаминного спектра по сравнению с контролем. В то же время, обращает на себя внимание практически достоверное повышение концентрации витамина К в крови на 27%. Также имеется тенденция к снижению концентрации тиамина в крови, характеризующейся снижением на 21% у женщин, злоупотребляющих алкоголем.

Изменения уровня витаминов в крови были более выраженными у детей. Так, у детей от матерей, злоупотребляющих алкоголем, отмечалось 46% и 23% снижение концентрации витамина Е и С по сравнению с контрольными значениями, соответственно. Сколько-нибудь значимых погрупповых различий в концентрации других витаминов выявлено не было.

Корреляционный анализ продемонстрировал достоверную положительную взаимосвязь между концентрацией аскорбиновой кислоты в крови беременных женщин в 3 триместре беременности и детей в возрасте 1 года. В то же время, корцентрация других как водорастворимых, так и жирорастворимых витаминов в крови беременных женщин и их детей не характеризовалась достоверной корреляцией.

Несмотря на отсутствие достоверных различий в значениях величины по Шкале Апгар при рождении, а также массе тела в возрасте 1 года, данные показатели характеризовались достоверной взаимосвязью с уровнем витаминов в материнской и детской крови, соответственно. Так, в частности, концентрация витамина К и С в крови беременных женщин достоверно взаимосвязана со значениями по шкале Апгар при рождении. При этом в первом случае данная взаимосвязь носила обратный характер. Стоит отметить, что вся модель, включающая водо- и жирорастворимые витамины как независимый параметр, являлась достоверной и определяла 37% вариабельности величины по шкале Апгар.  
Концентрация витаминов в крови детей в возрасте 1 года также характеризовалась достоверной зависимостью с массой тела в этом возрасте. Так, установлено, что между массой тела в возрасте 1 года, а также концентрацией витаминов С и В12 имеется прямая взаимосвязь. Более того, общая модель, включающая уровень витаминов как независимые переменные определяла 48% вариабельности значений массы тела в возрасте 1 года.

Концентрация аминокислот в крови беременных женщин и их детей

Полученные данные свидетельствуют о влиянии избыточного употребления алкоголя на аминокислотный спектр сыворотки крови беременных женщин (Таблица 1). Так, у женщин, употребляющих алкоголь отмечалось достоверное снижение концентрации аргинина и глутамата на 25% и 33% относительно контроля, соответственно. Несмотря на то, что различия в концентрации других исследуемых аминокислот не являлись достоверными, стоит отметить выраженную тенденцию к снижению уровня таурина и повышению концентрации тирозина и глицина в сыворотке крови беременных женщин, злоупотребляющих алкоголем.

Установлено, что перинатальное воздействие алкоголя приводило к выраженным изменениям концентрации аминокислот сыворотки у детей (Таблица 2). Как и у беременных женщин, у детей, подвергшихся перинатальному воздействию алкоголя было выявлено достоверное 42% и 29% снижение концентрации глутамата и серина в сыворотке крови. Стоит также отметить наличие близкого к достоверному снижению концентрации аланина, аспарагина и гидроксипролина вследствие перинатального воздействия алкоголя на 17%, 36%, 31%.

Корреляционный анализ продемонстрировал взаимосвязь между концентрацией аминокислот в сыворотке крови общей выборки матерей и их потомства. Так, достоверная прямая корреляция отмечалась в случае аргинина, глутамата и валина.

Заключение

В ходе проведенных исследований установлено, что наиболее значимыми изменениями у детей, ассоциированными с перинатальным воздействие алкоголя, являются снижение в пуповинной крови концентрации кобальта и марганца, снижение уровня лития в волосах, низкая концентрация аминокислот глутамата и серина, а также витаминов С и Е. В ряде случаев, данные изменения взаимосвязаны с физиологическими показателями развития организма (шкала Апгар, физическое развитие в 1 год). При этом данные нарушения взаимосвязаны с нарушением обмена макро- и микроэлементов, витаминов и аминокислот в организме беременных женщин, подверженных воздействию алкоголя. Таким образом, мониторинг метаболического профиля и, особенно, выявленных характерных нарушений, как у беременных женщин, так и их детей является необходимым инструментом раннего выявления этанол-индуцированных нарушений.

**Сопоставление результатов, полученных в ходе реализации с мировым уровнем**

Алкоголизм или синдром алкогольной зависимости (F10.2 – МКБ-10) является актуальной проблемой отечественного [Заиграев, 2009] и мирового [Degenhardt et al., 2008] здравоохранения. Так, было продемонстрировано, что алкоголизм связан со снижением продолжительности жизни, рождаемости и повышением смертности [Халтурина, Коротаев, 2006] вследствие поражения ряда систем организма [Wang et al., 2010]. Учитывая роль эссенциальных микроэлементов в процессах эмбриогенеза [Fall et al., 2003], а также возможности генотоксического действия токсичных металлов [Thompson, Bannigan, 2008], справедливо предположить, что алкогольная фетопатия может быть, по крайней мере, отчасти, обусловлена алкоголь-ассоциированным дисбалансом микроэлементов.

Полученные данные, указывающие на снижение сывороточного уровня цинка у женщин, страдающих алкоголизмом, согласуются с результатами ранее опубликованных работ [Семенов, Скальный, 2009, Keen et al., Biofactors 2010]. Нами также проведен обзор мировой литературы, свидетельствующей о роли дефицита цинка в опосредовании токсических эффектов алкоголя [Skalny et al., 2017].

Согласно наблюдениям, концентрация меди в сыворотке имела тенденцию к увеличению в соответствии со сроком беременности в контрольной группе беременных женщин, но не у злоупотребляющих алкоголем, что может свидетельствовать о формировании медь-дефицитного состояния. Данное предположение косвенно подтверждается ранее опубликованными работами, указывающими на нарушение гомеостаза меди у лиц с алкогольным стеатогепатозом [Uhlikova et al., 2007]. Более того, экспериментальные данные также свидетельствуют в пользу усугубления дефицита меди под влиянием алкогольной интоксикации [Fields, Lewis, 1990, Keen et al., 1998, 2010].

Ранее было показано, что нарушение эмбрионального развития может быть ассоциировано с нарушением баланса цинка в организме [Flynn et al., 1981, Jones KL. 1986]. При этом избыточное воздействие свинца на плод может приводить к реализации тератогенного эффекта данного металла [Bellinger, 2005]. Повышенный риск тератогенного воздействия на плод также может иметь место при медь-дефицитном состоянии [Keen et al., 1998]. При этом вопрос о роли относительно дефицита никеля в организме беременной в развитии патологии плода остается дискуссионным, равно как и непосредственно эссенциальность данного металла [Schaumloffel, 2012].

Полученные данные также свидетельствуют об отсутствии выраженных нарушений минерального (макроэлементного) гомеостаза у беременных женщин, страдающих алкоголизмом. В то же время, существующие литературные данные указывают на наличие выраженных электролитных нарушений у лиц, страдающих алкоголизмом. Так, у 88,6% алкоголиков с абстинентным синдромом были выявлены те или иные нарушения электролитного обмена [Stasiukyniene, 2002]. Обследование 50 мужчин-алкоголиков и 20 здоровых волонтеров выявило достоверное снижение уровня калия, кальция, фосфора и магния в сыворотке крови по сравнению с контрольными показателями [Tabassum et al., 2000]. Снижение содержания Ca, Mg в волосах женщин, страдающих хроническим алкоголизмом, описано в литературе [Скальный с соавт., 1989]. Более поздние исследования также подтвердили данное наблюдение. Отмечается выраженное взаимное влияние электролитных нарушений при алкоголизме [Elisaf, Kalaitzidis, 2015]. При этом отмечается, что гипофосфатемия при алкоголизме требует заместительной терапии [Ghosh, Joshi, 2008]. Одним из вероятных механизмов развития гипоэлектролитных состояний является алкоголь-индуцированная экскреция данных элементов. Так, в частности, было продемонстрировано, что злоупотребление алкоголем приводит к интенсификации экскреции фосфора с мочой [Hayes, 2004]. Аналогичные данные были получены в отношении магния, показавшие увеличение экскреции магния в результате употребления алкоголя на 167-260% по сравнению с контрольными значениями [Rink, 1986]. В то же время, наблюдаемые противоречия между литературными данными и результатами настоящего исследования могут быть обусловлены различиями в обследуемых когортах. В частности, одним из основных факторов может являться выраженность алкоголизма.

Данные анализа волос свидетельствуют, что злоупотреблением алкоголем оказывает наиболее выраженное влияние на уровень лития в волосах беременных из группы риска по сравнению с контрольными показателями; это согласуется с данными, полученными нами ранее [Семенов, Скальный, 2009]. Классически, литий рассматривался как токсичный металл с фармакологической активностью [Aral, Vecchio-Sadus, 2008]. В то же время, ряд недавних исследований продемонстрировал признаки эссенциальности данного микроэлемента. Несмотря на отсутствие конкретных литий-зависимых биохимических процессов, имеются указания на взаимосвязь данного металла и активности ряда ферментов и уровня гормонов [Schrauzer, 2002]. Фармакологическая активность лития широко используется в лечении ряда психических заболеваний и в частности, биполярных расстройств [Grandjean, Aubry, 2009]. В то же время, была продемонстрирована способность лития тормозить развитие латерального амиотрофичечского [Fornai et al., 2008] склероза и снижать частоту попыток суицида [Kapusta et al., 2011]. Также установлено, что воздействие лития может стимулировать нейрогенез в гиппокампе, обладая нейротрофическим действием [Chen et al., 2000]. Многочисленные исследования были посвящены изучению потенциала соединений лития в качестве препарата для лечения алкоголизма [Merry et al., 1976]. Относительно недавние работы не позволяют судить об эффективности данного микроэлемента [Fawcett et al., 2000]. В то же время, проведенные исследования показали, что экзогенные соединения лития, воздействующие на организм в течение беременности, относятся к категории D, характеризующейся наличием достоверных указаний на их токсичность [Grandjean, Aubry, 2009]. В частности, пренатальное воздействие лития ассоциировано со снижением оценок по шкале Апгар, повышением частоты неврологических и нервномышечных расстройств у новорожденных [Newport et al., 2005]. Таким образом, литературные данные позволяют обозначить изменение уровня лития в волосах беременных, злоупотребляющих алкоголем, как проблему. Так, повышение уровня лития в организме может, гипотетически, являться компенсаторным механизмом, направленным на предотвращение алкоголь-ассоциированной нейротоксичности. С другой стороны, повышение уровня лития в организме беременной может обладать негативным влиянием на развитие плода

.Наши данные свидетельствуют о том, что чрезмерное потребление алкоголя влияет на концентрацию электролитов и микроэлементов в материнской и пуповинной крови. Существующие данные свидетельствуют о том, что употребление алкоголя отражается на снижении содержания кальция в сыворотке крови [Jorde и др., 2001] и кишечного транспорта Na [Mekhjian и др., 1975]. Предполагается, что беременность является важным фактором при употреблении алкоголя и может приводить к наблюдаемому увеличению.

Наиболее интересные данные были получены для кобальта в цельной крови. В частности, концентрация кобальта в третьем триместре беременности у женщин, употребляющих алкоголь, была значительна выше по сравнению с контрольными значениями. С другой стороны, употребление матерью алкоголя было связано со снижением данного элемента в пуповинной крови. Существующие данные об обмене кобальта при воздействии алкоголя ограничены. Тем не менее, Co выполняет структурную роль в витамине B12 и уровень последнего тесно связана со статусом Co. Самый недавний обзор показал, что изменение уровня витамина B12 разнонаправлено, начиная от снижения концентрации до ее повышения [Fragasso, 2013]. Увеличение концентрации кобальта в цельной крови у злоупотребляющих алкоголем женщин, как правило, соответствует повышению уровня в плазме витамина B12 у больных [Cylwik и др., 2010] и пациентов с алкогольным поражением печени [Baker и др., 2003]. Было высказано предположение, что алкогольное поражение печени приводит к перераспределению B12 и снижению запасов витамина [Baker и др., 2003]. Принимая во внимание связь между повышением уровня B12 в крови и снижением его запасов, можно предположить, что наблюдаемое снижение в пуповинной крови может свидетельствовать о уменьшении переноса витамина к плоду. Дефицит кобаламина связан с различными клиническими признаками, включая анемию и неврологические расстройства [Carmel, 2000]. В свою очередь, сам кобальт стимулирует выработку эритропоэтина путем стабилизации гипоксия-индуцированного фактора и имитации гипоксических состояний [Simonsen и др., 2012].

Обнаруженное нами снижение концентрации марганца в пуповинной крови на фоне употребления матерью алкоголя во время беременности также в целом согласуется с литературными данными. Большинство исследований показали значительное взаимодействие между этанолом и воздействием Mn на некоторые биологических функций [Bouchardи др., 2003]. В то же время, влияние этанола на обмен Mn не исследовался достаточно глубоко. В частности, ранее экспериментальные исследования показали положительное влияние потребления алкоголя на концентрацию Mn в тканях [Shukla и др., 1978]. С другой стороны, мы обнаружили значительное снижение концентрации микроэлемента в пуповинной крови детей, рожденных от женщин основной группы. Следует также отметить, что дефицит Mn значительно связан с задержкой внутриутробного развития [Wood, 2009].

Также проведено исследование влияния перинатального воздействия организма на аминокислотный и витаминный спектр сыворотки крови. Так, полученные данные свидетельствуют о том, что несмотря на отсутствие достоверных изменений в концентрации витаминов в крови беременных женщин, злоупотребляющих алкоголем, уровень витаминов С и Е у детей, подвергшихся перинатальному воздействию алкоголя, характеризовался достоверным снижением. Как витамин С, так и Е являются антиоксидантами. Учитывая роль окислительного стресса в реализации токсического действия этанола в целом (Comporti et al., 2010) и развитии ФАС в частности (Brocardo et al., 2011), снижение уровня антиоксидантных витаминов может являться следствием активации процессов свободнорадикального окисления и, как следствие, повышенной потребности в аскорбиновой кислоте и токофероле (Wu, Cederbaum, 2003). Справедливо предположить, что снижение уровня витаминов С и Е в условиях повышенной окислительной нагрузки вследствие перинатального воздействия этанола может существенно повышать восприимчивость нервной системы к повреждению. Показано, что применение антиоксидантов может иметь высокий потенциал при коррекции токсических эффектов перинатального воздействия этанола (Joya et al., 2015). Более того, также показано, что наряду с реализацией антиоксидантной функции, аскорбиновая кислота и токоферол играют важную роль в развитии мозга (Feltes et al., 2014). Так, в частности, продемонстрировано, что аскорбиновая кислота стимулирует дифференцировку нейронов (He et al., 2015). Соответственно, дефицит витамина С в материнском организме нарушает нейрогенез в мозге потомства (Tveden-Nyborg et al., 2012).

Ранее проведенные исследования продемонстрировали нарушение аминокислотного спектра у лиц, злоупотребляющих алкоголем, однако характер данных изменений существенно варьировал. Так, было отмечено снижение концентрации аминокислот с разветвленной цепью на фоне повышения уровня ароматических аминокислот (Shaw, Lieber, 1983). Отмеченное снижение концентрации триптофана у алкоголиков было связано со склонностью к агрессии и депрессии посредством взаимосвязи с нарушением обмена серотонина (Branchey et al., 1984). У пациентов с алкогольной болезнью печени отмечено повышение концентрации метионина и фенилаланина на фоне снижения уровня лейцина, изолейцина и валина по сравнению с контрольными значениями (Mukherjee et al., 2010). В то же время, результаты исследования влияния острого воздействия этанола показали, что через 60 минут после приема этанола в материнской плазме отмечалось повышение концентрации глутамата на фоне снижения уровня глутамина, цитруллина, лейцина, валина, аминокислот с разветвлёнными боковыми цепями, серина и аспарагина. При этом в плазме плода выявлено достоверное повышение уровня глутамина без значимых изменений уровня глутамата на фоне снижения концентрации аспарагина и триптофана (Washburn et al., 2013).

Наиболее выраженным как у беременных женщин, злоупотребляющих этанолом, так и у их потомства являлся дефицит глутамата в сыворотке крови. Ранее проведенные исследования продемонстрировали, что нейротоксичность этанола ассоциирована с нарушением глутаматергических механизмов в центральной нервной системе (Roberto et al., 2006). Так, у пациентов с алкоголизмом и ремиссией отмечалось повышение уровня глутамина на фоне снижения глутамата по сравнению с контролем (Thoma et al., 2011). Стоит отметить, что нарушение обмена глутамата в ЦНС сопровождается повышением тяги к алкоголю (De Witte, 2004). При этом, экспериментальными данными продемонстрировано, что прием L-глутамина (продукт аминирования глутамата) наряду с воздействием алкоголя во время беременности предотвращает этанол-индуцированное снижение массы тела и других морфометрических показателей и нарушение биодоступности аминокислот у потомства (Sawant et al., 2015). Также было продемонстрировано протективное влияние пренатального приема глутамина на гемодинамику и кислотно-основный гомеостаз плода в условиях воздействия этанола (Sawant et al., 2014).

Глутамат играет важную роль в регуляции дифференцировки, миграции и жизнеспособности нейронов в развивающемся мозге, причем блокада NMDA рецепторов (в том числе и этанолом) во время эмбриогенеза приводит индукции апоптоза в незрелых нейронах (Meldrum et al., 2000; Toriumi et al., 2012). Таким образом, развитие дефицита глутамата вследствие перинатального воздействия алкоголя может являться одним из механизмов развития алкогольного синдрома плода.

Несмотря на отсутствие достоверных погрупповых различий в концентрации аргинина у беременных женщин, наличие прямой корреляции между материнскими и детскими показателями свидетельствует о причинно-следственной взаимосвязи между воздействием этанола на материнский и детский организм и формированием дефицита аргинина у потомства. Так, было установлено торможение плацентарного транспорта аргинина под влиянием этанола, в то время как продукция оксида азота характеризовалась повышением (Acevedo et al., 2001).

Серин также играет важнейшую роль в период развития организма, являясь одним из источников образования нуклеотидов в периоды активного роста как in vivo, так и in vitro (Kalhan et al., 2003). Несмотря на то, что обмен серина в организме плода крайне высок, подавляющее большинство синтезируется из глицина печенью (Kalhan et al., 2012). Несмотря на отсутствие достоверных погрупповых различий в концентрации серина в сыворотке женщин, дети, подверженные перинатальному воздействию алкоголя, характеризовались снижением уровня серина. Данное наблюдение может являться как следствием перинатального воздействия алкоголя, так и постнатальных факторов (диета).

Таким образом, полученные в ходе реализации проекта данные согласуются с мировой литературой, свидетельствующей о возможной роли алкоголь-индуцированного дисбаланса микроэлементов, аминокислот и витаминов в развитии неблагоприятных эффектов для плода. В то же время, ряд изменений, например, изменение обеспеченности организма матери и ребенка литием и кобальтом, характер данных изменений (повышение уровня в организме матери с последующим снижением у ребенка) выявлены впервые. Соответствие результатов исследования мировому уровню подтверждается также публикацией результатов работы в зарубежных изданиях, индексируемых Scopus и Web of Science. В частности, журнал Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria имеет 2 квартиль цитирования в базе Scopus, тогда как European Journal of Nutrition относится к 1 квартилю цитирования и имеет импакт-фактор Thomson Reuters = 4.370.

**Методы и подходы, использованные в ходе реализации Проекта**

Характеристика обследуемых

Для реализации первого этапа проекта был использован комплекс следующих методов и подходов. Формирование группы беременных осуществлялось на основании анкеты-опросника с учетом состояния здоровья женщин, составленного при сотрудничестве с известными специалистами в области изучения фетального алкогольного синдрома плода из США (Jones, Chambers, Keen). Формирование групп осуществлялось по принципу соответствия критериям включения. В частности, набор женщин для обследования проводился с учетом их соответствия возрастным (20-35 лет) и росто-весовым характеристикам, что также позволило снизить вариабельность лабораторных параметров ввиду разницы в индексе массы тела и возраста, которые оказывают существенно влияние на элементный статус организма. Для формирования когорты брались только те женщины, у которых не наблюдалось выраженных патологий до беременности. Забор материала (волосы, кровь) для исследования проводился в 1 и 3 триместрах беременности.

Обследование детей включало определение росто-весовых характеристик при рождении, оценок по шкале Апгар, а также оценку физического развития в возрасте 1 года для выявления возможных отсроченных эффектов.

Настоящее исследование проведено в соответствии с принципами Хельсинкской декларации [World Medical Association, 2001] после получения информированного согласия на участие в обследовании.

Выбор субстратов для исследования

Выбор диагностических субстратов для оценки уровня макро- и микроэлементов в организме обследуемых осуществлялся на основании воспроизводимости результата и степени влияния внешних факторов на значения показателя. Анализ производился в сыворотке крови, которая отражает уровень минерального обмена за непродолжительный период. Учитывая наличие гомеостатических механизмов регуляции, данный показатель информативен лишь при условии оценки кратковременных изменений уровня цинка, селена и меди, а также других показателей элементного статуса. В связи с этим, дополнительным и наиболее информативным биосубстратом для оценки элементного статуса являлись волосы.

Волосы являются одними из наиболее часто используемых биоиндикаторов, характеризующихся неинвазивностью забора, высокой минерализацией и стабильностью элементного состава, а также отсутствием необходимости в специальных условиях хранения и транспортировки, которые делают волосы одними из наиболее перспективных образцов для биомониторинга воздействия металлов на организм человека [Esteban, Castano, 2009]. Одновременное использование биосубстратов обусловлено необходимостью дополнительной оценки взаимосвязи между уровнем исследуемых микроэлементов в волосах и жидких средах организма.

Забор образцов для исследования

Забор образцов волос проводился с соблюдением рекомендаций. В частности, производился забор проксимальных прядей волос длиной 3-5 см с затылочной части головы. Полученный материал хранился и транспортировался в лабораторию в бумажных конвертах для избегания внешней контаминации биосубстрата металлами.

Забор венозной крови производился в периоды регулярных обязательных лабораторных анализов в I и III триместров, а также у обследуемых детей в возрасте 1 года квалифицированным персоналом, имеющим сертификат на осуществление соответствующего вида деятельности, с использованием вакуумных контейнеров. Забор пуповинной крови также осуществлялся согласно процедуре. Полученная венозная кровь центрифугировалась с последующим забором сыворотки в полипропиленовые пробирки (эппендорфы).

Забор крови для анализа содержания витаминов производился в две пробирки-контейнеры по 10 мл, предназначенные для получения цельной крови и содержащие антикоагулянт Na2ЭДТА. Для анализа содержания аминокислот собирали сыворотку в специальные пробирки-контейнеры с активатором свертывания в виде геля или гранул. После взятия крови пробирки мягко переворачивали не менее 5 раз. Пробирки с сывороткой центрифугировали при 1500 об/мин 15 мин. Полученную сыворотку отбирали в микропробирку типа эппендорф. Далее все пробы хранились при температуре -18\*С вплоть до проведения пробоподготовки и ВЭЖХ-анализа, осуществляемых в АНО «Центр биотической медицины».

Пробоподготовка

Полученные образцы подвергались предварительной пробоподготовке. Обработка волос с помощью ацетона и дистиллированной воды обеспечивала удаление механического загрязнение и снижение степени внешней контаминации. После высушивания на воздухе образцы волос подвергались микроволновому разложению в концентрированной азотной кислоте с использованием системы Berghof Speedwave 4 system (Berghof Products & Instruments, Germany) для получения гомогенного раствора. Образцы сыворотки крови разбавлялись подкисленным дилюэнтом.

Пробоподготовку образцов сыворотки при выделении аминокислот проводили, усовершенствовав метод компании Waters (США). При этом вместо обращенно-фазных колонок Pico-Tag использовали картриджи, содержащие специальный сорбент на основе пористого кремнезема, поверхностно модифицированного слоем фторопласта. ВЭЖХ проводили в условиях, рекомендованных компанией Waters.

Пробоподготовку образцов крови при выделении витаминов проводили совместно разработанным ФГБУН ИБХ РАН и АНО «Центр биотической медицины» методом [Kapustin D.etal., 2012], включающим этапы осаждения белков крови двукратным объемом ацетонитрила, концентрирования надосадочной жидкости с последующей жидкофазной экстракцией четырех жирорастворимых витаминов (A, D, E, K) н-гексаном и твердофазной экстракцией полученных и сконцентрированных фракций жиро- и водорастворимых витаминов (B1, B5, B6, B12, С) на кремнеземном сорбенте, модифицированном фторопластом-42Л, проводя элюцию указанных фракций метанолом и 30% водным ацетонитрилом, соответственно. Способы синтеза фторполимерсодержащих сорбентов и методы их применения в пробоподготовке в медицинской диагностике описаны, например, в [Kapustin D.etal., 2011].

Анализ образцов

Химический анализ образцов крови и волос после пробоподготовки осуществлялся методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой на приборе NexION 300D (Perkin Elmer, США), оснащенном автоматическим дозатором ESI SC-2 DX4 (Elemental Scientific Inc., Omaha, NE 68122, USA). Использование в ходе анализа технологии Dynamic Reaction Cell позволяет снизить количество интерференций без потери чувствительности. Калибровка системы осуществлялась в диапазоне концентраций, характерных для исследуемых матриц, с использованием наборов Universal Data Acquisition Standards Kit (PerkinElmer Inc., USA). Помимо этого, для учета различного состава матриц использовалась внутренняя онлайн стандартизация с иттрием 89, приготовленным из Yttrium (Y) Pure Single-Element Standard (PerkinElmer Inc., USA). Для контроля качества полученных данных использовались стандартные образцы сыворотки/плазмы крови (ClinChek Plasma Control lot 129, Recipe, Германия), а также волос (GBW09101 (Shanghai Institute of Nuclear Research, PR China). В ходе анализа стандартных образцов было установлено, что воспроизводимость для всех элементов превышала 80%. Содержание исследуемых химических элементов в сыворотке крови выражалось в мкг/л.

Определение концентрации выделенных витаминов проводили методом ВЭЖХ (PerkinElmer S200, PerkinElmer, США). Витамины жирорастворимой фракции определяли на колонке PerkinElmerPecosphere RP C8 3 мкм, 80x4,5 мм с предколонкой PE NewGuard RP8, 7 мкм, 15x3,2 мм при 26С при 270 нм в градиенте метанола (А: метанол, В: вода - 0,5 мин, В 50%,0,7 мл/мин; 16 мин, А 100%, 0,7 мл/мин;2 мин, В 50%, 1,0 мл/мин; 5 мин, В 50%, 2,0 мл/мин).Витамины водорастворимой фракции определяли на колонке PerkinElmer Pecosphere RP C18 3 мкм, 80x4,5 мм с предколонкой PE NewGuard RP18, 7 мкм, 15x3,2 мм при 26С при 210 нм в градиенте ацетонитрила (А: ацетонитрил, В: 0,4 М LiClO4, рН 3,5 - 3,5 мин, В 100%, 0,8 мл/мин; 15 мин, В 80 %, 0,8 мл/мин;3 мин, В 80%, 2,0 мл/мин; 3 мин, В 100%, 2,0 мл/мин; 1 мин, В 100%, 1,0 мл/мин).  
Опредение концентрации аминокислот в сыворотке крови также проводилось методом ВЭЖХ на PerkinElmer S200 (PerkinElmer, США) относительно имеющихся стандартов аминокислот PerkinElmer (Alanine, Arginine, Asparagine, Aspartate, Glutamate, Glycine, Histidine, Hydroxyproline, Methionine, SerineTaurine, Threonine, Tyrosine, Valine).

Статистический анализ данных

Статистическая обработка полученных данных производилась с помощью программного пакета Statistika 10.0 (Statsoft) посредством первоначального определения характера распределения данных с помощью теста Шапиро-Уилка. В большинстве случаевраспределение данных о содержании анализируемых химических элементов в волосах характеризуется отсутствием нормального распределения (содержание не характеризуется Гауссовским распределением в соответствии с многочисленными исследованиями), в то время как в случае сыворотки крови может отмечаться нормальное распределение. В случае распределения данных, отличных от Гауссовского, для сравнения погрупповых значений применялся U-тест Манн-Уитни. Корреляционный анализ осуществлялся с использованием критерия ранговой корреляции Спирмена. Также применялся метод множественной линейной регрессии для определения достоверности статистического влияния отдельных предикторов на зависимую переменную.