

УДК 617.735:615.91:616-076.4-092.9

Ультраструктурные изменения ганглиозных и мюллеровских клеток сетчатки глаз крыс, вызванные метаноловой интоксикацией

Н. Е. Думброва, проф., д-р мед. наук, Н. И. Молчанюк, канд. биол. наук

ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В. П. Филатова НАМН Украины»; Одесса (Украина)

E-mail: elmicroscop@gmail.com

Вступ. Метиловий спирт (метанол), сильна токсична речовина. Смертельна доза метанолу, за різними даними, складає від 30 до 250 мл, а 10 мл його прийому внутрішньо призводить до втрати зору. Метанол широко застосовується в якості розчинника, наприклад, в лакофарбовій промисловості, на бензоколонках, являється компонентом антифризу та ін.. Все разом взяте збільшує можливість випадкового або хронічного впливу метанолу на організм людини. Згідно клінічних та експериментальних даних, метанол первинно пошкоджує зоровий нерв, сітківку та тканини головного мозку. У зв'язку з цим виникає необхідність більш глибокого вивчення на субклітинному рівні тонких механізмів пошкоджуючої дії метанолу на живі тканини, а саме, на сітківку експериментальних тварин.

Мета — електронно-мікроскопічне вивчення змін гангліозних клітин (ГК) і відростків мюллеровських клітин (ВМЮК), які оточують ГК сітківки, в динаміці (1–14 діб) після одноразового внутрішньочеревного введення метанолу в дозі 2, 5 г/кг маси тіла.

Матеріал і методи дослідження. Робота виконана на 18 білих щурах лінії Вістар масою 250–300 г, які підрозділялись на дві групи: I — піддослідна, в якій щурам одноразово внутрішньочеревно вводили метанол в дозі 2,5 г/кг маси тіла; II група — контрольні тварини, яким вводили фізіологічний розчин в еквівалентному об'ємі. Досліджувалась ультраструктура ГК і ВМЮК сітківки щурів в строки 1, 3, 7 і 14 діб після введення метанолу, в електронному мікроскопі ПЕМ-100-01.

Результати дослідження. Показано, що метанол викликав первинні і суттєві пошкодження гангліозних клітин (ГК) сітківки. Серед ГК найбільш вразливими були клітини дрібних і середніх розмірів. В динаміці спостереження деструктивні зміни наростали як в ГК, так і в відростках мюллеровських клітин (ВМЮК). Виявлено, що найбільш чутливими до пошкодження ультраструктурами досліджуваних клітин є мітохондрії, що веде до суттєвих порушень енергетичної функції клітин. Паралельно з явищами деструкції в ГК відмічались ознаки посилення білоксинтезуючої діяльності, що є проявом компенсаційно-відновлювальних процесів в них.

Ключевые слова: сетчатка, ганглиозные клетки, отростки мюллеровских клеток, ультраструктура, метанол.

Ключові слова: сітківка, гангліозні клітини, відростки мюллеровських клітин, ультраструктура, метанол.

Ultrastructural changes of ganglionic and Müller's cells of the rat's retina caused by methanol intoxication

N. E. Dumbrova, N. I. Molchanyuk

SI «Filatov Institute of Eye Diseases and Tissue Therapy of NAMN of Ukraine»\$ Odessa (Ukraine)

Introduction. Methyl alcohol (methanol) is a strong toxic substance, which is used in varnish-and-paint industry, at the petrol stations, etc that increases the possibility of its incidental or chronic influence on the human organism. According to the clinical and experimental data methanol primarily damage the optic nerve, retina and the brain tissues. Therefore, it is important to study mechanisms of the damaging effect of methanol on live tissues, namely, the retina of the experimental animal deeper at the subcellular level.

Objective. Electronic-microscopic study of changes of the ganglionic cells (GC) and processes of Müller's cells (PMC) that surround GC of the retina of white rats in dynamics (1–14 days) after single intraabdominal introduction of methanol in the dose of 2.5 g/kg of the body mass.

© Н. Е. Думброва, Н. И. Молчанюк, 2015

Key words. Retina, ganglionic cells, processes of Müller's cells, ultrastructure, methanol

Material and methods. The work was done on 18 white Wistar's rats of 250–300 g of weight, which were subdivided into two groups: I – a group under study where the rats were given single injection of methanol in the dose of 2.5 g/kg of the body mass. II – a group with control animals, which were introduced a physiological solution in the same volume. There was investigated the ultrastructure of GC and PMC of the rats' retina in 1, 3, 7 and 14 days after introduction of methanol in the electronic microscope PEM-100–01.

Results. It is shown that methanol caused primary and considerable damage of GC of the retina. The cells of small and middle size were the most vulnerable of GC. During the follow-up investigation destructive changes increased both on GC and PMC. It was found that mitochondria were the most vulnerable structures to the damage resulting in significant energy dysfunction of the cells. Parallel to the destruction signs there were signs of increased protein-synthesized activity in GC, which was a manifestation of compensation-restoration processes in them.

Введение. Метиловый спирт (метанол) относится к одноатомным спиртам и является сильным токсическим веществом. Он относится к числу примесей, от которых трудно избавиться при ректификации этилового спирта. Метанол нередко является источником случайных отравлений, так как по внешнему виду, вкусу и запаху мало отличается от этилового спирта. Смертельная доза метанола, по разным данным, колеблется от 30 до 250 мл, причем 10 мл его приема внутрь приводят к потере зрения. Согласно ГОСТу, для спиртных напитков объемная доза метанола, в пересчете на безводный этиловый спирт, не должна превышать 0,05 % или 400 мг/л. Кроме того, он стал применяться в качестве растворителя, например, в лакокрасочной промышленности, его используют на бензоколонках, он является компонентом антифризов и др. В результате такого широкого его применения участились случаи отравления им населения Украины [1, 5]. Такая доступность метанола увеличивает вероятность случайного или хронического воздействия его на организм человека. По немногочисленным клиническим и экспериментальным данным, метанол первично поражает зрительный нерв, сетчатку и ткани головного мозга [4, 5, 6, 8]. Предполагается, что в результате метаноловой интоксикации происходит глубокое нарушение биоэнергетических процессов в данных тканях [7, 9]. В связи с этим возникает необходимость более глубокого изучения на субклеточном уровне тонких механизмов повреждающего действия метанола на живые ткани, в частности, на сетчатку подопытных животных.

Ранее нами были опубликованы результаты исследования по влиянию метанола в дозе 0,75 г/кг массы тела крысы на ультраструктуру сетчатки (доза, при которой выявляются начальные изменения в структурах). Было установлено, что на данную незначительную дозу метанола наиболее чувствительными к его действию являлись: клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС), гангли-

озные клетки (ГК) и отростки мюллеровских клеток (ОМЮК). Реакция клеток ПЭС заключалась в активации их функционирования, сменявшейся структурными признаками внутриклеточных нарушений, а затем — способностью быстрого восстановления путем усиления белоксинтезирующей и энергообразующей функций клетки. ГК характеризовались нарастанием деструктивных изменений ультраструктуры в течение всего периода наблюдений. Однонаправленные изменения определялись в контактирующих с ГК ОМЮК. Обратила на себя внимание выраженная реакция митохондрий, являющихся энергообразующими структурами клетки [2, 3]. Однако представляет интерес действие и более значительных доз метанола на сетчатку. Поэтому целью настоящего исследования явилось электронно-микроскопическое изучение изменений ГК и окружающих их ОМЮК сетчатки белых крыс в динамике после однократного внутрибрюшинного введения метанола в дозе 2,5 г/кг массы тела.

Материал и методы

Работа выполнена на 18 взрослых белых крысах линии Вистар массой 250–300 г, подразделенных на две группы: I — опытная, в которой крысам внутрибрюшинно однократно вводили метанол из расчета 2,5 г/кг массы тела. Для крыс эффект ЛД₅₀ при внутрибрюшинном введении метанола достигается в дозе 9,5 г/кг массы тела животного. II группа — контрольные животные, которым вводили физиологический раствор в эквивалентном объеме. Эвтаназия животных осуществлялась в соответствии с требованиями Европейской конвенции по защите экспериментальных животных (86/609 ЕЕС).

Исследовалась ультраструктура ГК и ОМЮК сетчатки крыс. Материал забирался через 1, 3, 7 и 14 суток после введения метанола. Обработка образцов осуществлялась по общепринятой методике. Объекты изучались и фотографировались в электронном микроскопе ПЭМ-100–01.

Результаты и их обсуждение

Через 1 сутки после введения метанола в слое ГК сетчатки подвергались изменениям сами ГК и, в

первую очередь, клетки мелких и средних размеров. Они выражались в отеке цитоплазмы, в деструкции значительной части внутриклеточных органелл, особенно митохондрий. Лишь местами в околоядерной области этих ГК оставались островки из скоплений небольшого количества полисом и элементов зернистой эндоплазматической сети (ЗЭС), мелких единичных митохондрий с набухшим внутримитохондриальным матриксом, с частичным или полным разрушением крист (Рис. 1).

Однако среди крупных ГК наблюдались клетки со структурой, близкой к нормальной, которые отличались лишь просветлением кариоплазмы, слабо развитой сетью элементов ЗЭС и патологией митохондрий: набухшим внутримитохондриальным матриксом и разрушенными кристами, часть из них с деформацией наружной мембраны. В то же время, ряд крупных ГК характеризовались увеличенным количеством органелл, в частности, элементов ЗЭС, полисом, мелких митохондрий. Это указывает на усиление белоксинтезирующей и энергообразующей функций и метаболических процессов в них. В этих же клетках отмечалось также и повреждение крупных митохондрий (Рис. 2).

В сроки 3 и 7 суток наблюдения в ГК отмечались изменения, которые были характерны для этих клеток в предыдущем сроке, а также определялись изменения в мелких клетках с менее выраженными признаками гидропических изменений, исключая митохондрии, которые находились в набухом состоянии. В таких клетках определялось округлой формы ядро с просветленной кариоплазмой и извилистой кариолеммой, вокруг ядра располагались единичные узкие цистерны ЗЭС, лишённые рибо-

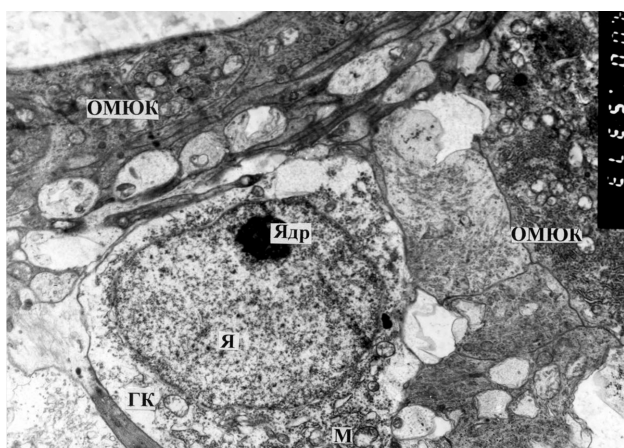


Рис. 1. Ультраструктура ганглиозного слоя сетчатки крысы через 1 сутки после внутрибрюшинного введения метанола в дозе 2,5 г/кг массы тела. Мелкая ганглиозная клетка с признаками гидропических изменений в цитоплазме. Электронная микрофотография. X 4 000. Условные обозначения: ГК — ганглиозная клетка, Я — ядро, Ядр — ядрышко, М — митохондрии, ОМЮК — отростки мюллеровских клеток.

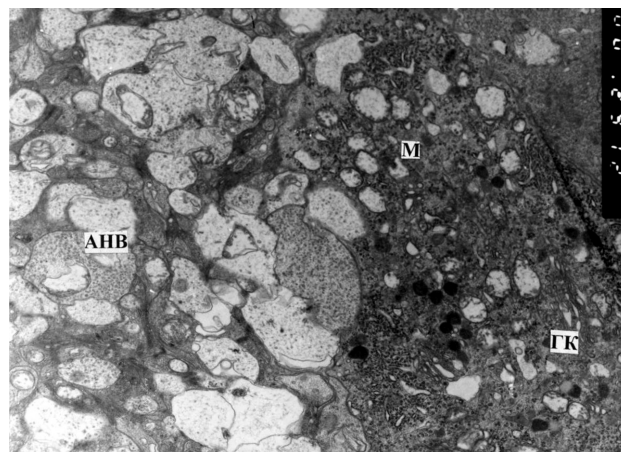


Рис. 2. Ультраструктура ганглиозного слоя сетчатки крысы через 1 сутки после внутрибрюшинного введения метанола в дозе 2,5 г/кг массы тела. Фрагмент цитоплазмы крупной ганглиозной клетки, насыщенной органеллами и имеющими гидропические изменения митохондрий. Электронная микрофотография. X 5 000. Условные обозначения: ГК — ганглиозная клетка, М — митохондрии, АНВ — аксоны нервных волокон.

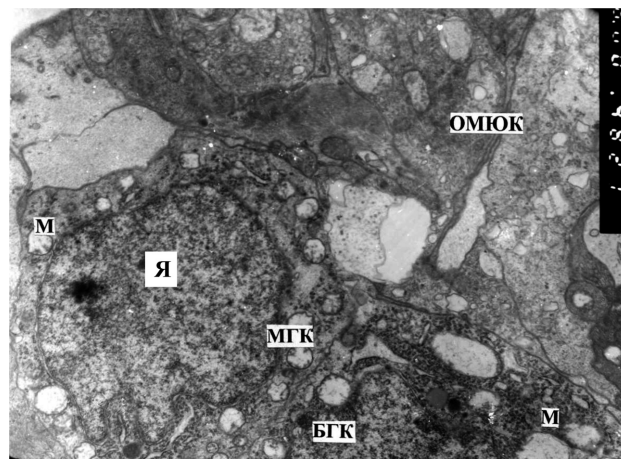


Рис. 3. Ультраструктура ганглиозного слоя сетчатки крысы через 7 суток после внутрибрюшинного введения метанола в дозе 2,5 г/кг массы тела. Контакт между мелкой и крупной ганглиозными клетками. Электронная микрофотография. X 6 000. Условные обозначения: МГК — маленькая ганглиозная клетка, БГК — большая ганглиозная клетка, М — митохондрии, Я — ядро, ОМЮК — отростки мюллеровских клеток.

сом на их мембранах. По всей цитоплазме диффузно лежало незначительное число полисом и свободных рибосом. Изменения в крупных ГК были однотипными с описанными в предыдущем сроке. Следует лишь отметить, что в эти сроки выявлялся также тесный контакт между ГК крупных и мелких размеров (Рис. 3).

К 14 суткам наблюдения в ГК — как мелких, так и крупных — усиливались процессы внутриклеточной деструкции цитоплазматических орга-

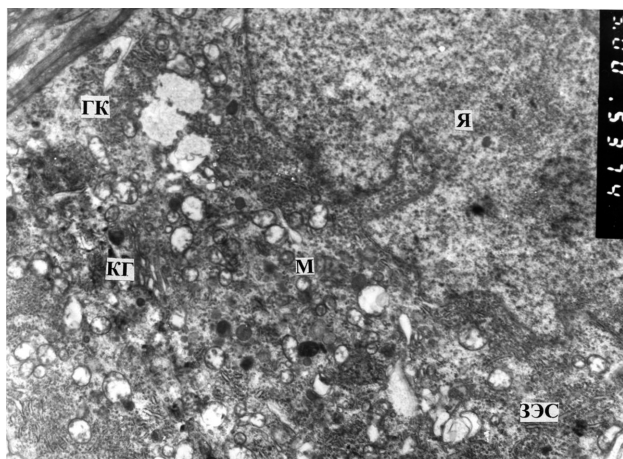


Рис. 4. Ультраструктура ганглиозного слоя сетчатки крысы через 14 суток после внутрибрюшинного введения метанола в дозе 2,5 г/кг массы тела. Крупная ганглиозная клетка с фестончатым ядром, большим количеством типичных органелл в цитоплазме и вакуолизированными крупными митохондриями. Электронная микрофотография. X 5 000. Условные обозначения: ГК — ганглиозная клетка, Я — ядро, М — митохондрии, ЗЭС — зернистая эндоплазматическая сеть, КГ — комплекс Гольджи.

нелл. Среди мелких ГК выявлялось больше клеток с электронно-прозрачным матриксом цитоплазмы и, практически, почти полным опустошением органелл, определялись лишь единичные полисомы и обрывки органелл. В крупных ГК, в отличие от изменений в предыдущие сроки, отмечались очаги разрушения органелл на периферии этих клеток. Кроме того, в части такого типа клеток в цитоплазме отмечалось больше митохондрий различных размеров, среди них выявлялись и мелкие, т.е. юные органеллы. Однако митохондрии средних и, особенно, крупных размеров, имели патологические изменения ультраструктуры, вплоть до разрыва наружной мембраны. Следует отметить, что признаки усиления белкового синтеза в ГК всех типов на-

блюдались во все сроки исследования параллельно с явлениями альтерации (Рис.4).

При изучении ультраструктуры отростков глиальных клеток, окружающих ГК, во все сроки наблюдения в большей их части определялись признаки отека цитоплазмы, расширение везикул гладкой эндоплазматической сети, отмечалась очаговая или полная деструкция крист митохондрий с образованием крупных электронно-прозрачных вакуолей. В то же время, часть ОМЮК была более сохранной, отмечалась лишь реакция митохондрий в виде очаговой или полной деструкции крист. Следует также отметить, что в динамике исследования признаки патологии в ОМЮК нарастали.

Заключение. Метанол в дозе 2,5 г/кг массы тела вызывал у крыс первичные и существенные повреждения ГК сетчатки. Среди ГК наиболее уязвимыми являлись клетки мелких и средних размеров. В динамике наблюдения деструктивные изменения нарастали как в ГК, так и в глиальных элементах, т.е. ОМЮК, этого слоя сетчатки. Показано также, что наиболее повреждаемыми ультраструктурами являлись митохондрии, что свидетельствовало о выраженном нарушении энергетической функции клеток. В литературных источниках имеются данные о том, что после острого отравления метанолом в сетчатке наблюдается повреждение митохондрий, а в диске зрительного нерва — изменения его аксонов, отек и патология митохондрий с образованием везикул, что также ведет к дефициту энергии [7, 9]. Однако параллельно с явлениями деструкции в ГК отмечались признаки усиления белоксинтезирующей деятельности, что являлось проявлением компенсаторно-восстановительных процессов в них.

Результаты исследований показали, что использованная доза метанола 2,5 г/кг массы тела крысы вызывала в структурах слоя ГК изменения, однонаправленные с теми, которые наблюдались нами при применении дозы 0,75 г/кг, однако более выраженные и стойкие.

Литература

1. Битенский В. С. Роль алкоголизма и наркоманий в демографическом кризисе в Украине // Журн. АМН Украины. — 2007. — № 3. — С.543–550.
2. Думброва Н. Е. Ультраструктурные изменения элементов хориоретинального комплекса глаз крыс после действия метилового спирта. / Н. Е. Думброва, Н. И. Молчанюк // Офтальмол. журн. — 2009. — № 5. — С. 54–57.
3. Думброва Н. Е. Влияние метанола на ультраструктуру нервных элементов сетчатки глаза крыс / Н. Е. Думброва, Н. И. Молчанюк // Журн. АМН Украины. — 2010. — Т.16. — № 3. — С. 507–514.
4. Серов В. В. Влияние острого отравления метанолом на перекисное окисление липидов и концентрацию в крови кортикостерона / Серов В. В., Забродский П. Ф., Киричук В. Ф. // Вестн. новых мед. технологий. — 2007. — Том XIV. — № 1. — С.81.
5. Шульпина Н. Б. Алкогольная интоксикация и орган зрения / Н. Б. Шульпина, В. Е. Рожнов, Ф. Р. Галиаскарова // Вестн. офтальмол. — 1987. — № 1. — С.62–65.
6. Цимбалюк В. И. Электрофизиологические и морфологические показатели, состояние зрительного анализатора в динамике применения трофина при интоксикации метанолом / В. И. Цимбалюк, А. Т. Носов, Л. Л. Чеботарёва, В. А. Васюта // Укр.нейрохирургич. журн. — 2004. — № 3. — С.97–102.
7. Nicholls P. Formate as an inhibitor of cytochrome c oxidase / P. Nicholls // Biochem Biophys Res Commun. — 1975. — Vol. 67. — P. 610–616.

8. Retinal toxicity in methanol poisoning / J. L. Treichel, T. G. Murray, T. C. Burton et al. // *Retina*. — 2004. — Vol.24. — P. 309–312.
9. Oxidative stress induced by methotrexate alone and in the presence of methanol in discrete regions of the rodent

brain, retina and optic nerve / R. Rajamani, A. Muthuvel, M. Senthilvelan, R. Sheeladevi // *Toxicol. Lett.* — 2006. — Vol.12. — № 5. — P.12–15.

Поступила 10.10.2014

References

1. **Bitenskii VS.** The role of alcohol and drug abuse in the demographic crisis in Ukraine. *Zhurn. AMN Ukrainy*. 2007;3:543–50. In Russian.
2. **Dumbrova N. E., Molchanyuk N. I.** Ultrastructural changes in the elements of the choroids-retinal complex of the eyes of rats after the action of the methyl alcohol. *Oftalmol Zh.* 2009;5:54–7. Russian.
3. **Dumbrova N. E., Molchanyuk N. I.** Influence of methanol on ultrasound structure of retinal neural cells in the rat's eye. *Zhurn. AMN Ukrainy*. 2010;16(3):507–14. In Russian.
4. **Serov VV, Zabrodskii PF, Kirichuk VF.** Effect of acute methanol poisoning on lipid peroxidation and corticosterone concentration in blood. *Vestn. Novykh med. Tekhnologii*. 2007;14(1):81. In Russian.
5. **Shulpina NB, Rozhnov VE, Galiaskarova FR.** Alcohol intoxication and organ of vision. *Vestn Oftalmol.* 1987;1:62–5. In Russian.
6. **Tsymbalyuk VI, Nosov AT, Chebatoreva LL, Vasyuta VA.** Electrophysiological and morphological parameters, the state of the visual analyzer in the dynamics of the use of trofin in methanol intoxication. *Ukr. Neirokhirurgich. Zhurnal*. 2004;3:97–102. In Russian.
7. **Nicholls P.** Formate as an inhibitor of cytochrome c oxidase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1975;67:610–6.
8. **Treichel JL, Murray TG, Burton TC et al.** Retinal toxicity in methanol poisoning. *Retina*. 2004;24:309–12.
9. **Rajamani R, Muthuvel A, Senthilvelan M, Sheeladevi R.** Oxidative stress induced by methotrexate alone and in the presence of methanol in discrete regions of the rodent brain, retina and optic nerve. *Toxicol. Lett.* 2006;12(5):12–5.

Received 10.10.2014