

## Експериментальні дослідження

УДК 617.723/.35-005:616.547.26-778.317-092.9

### Ультроструктурні зміни клітин хоріоретинального комплексу очей щурів у віддалені строки після ін'єкції суміші 40% етанолу і 100% метанолу

Н. І. Молчанюк

ДУ «Інститут очних хвороб і тканинної терапії ім.

В.П. Філатова  
НАМН України»;  
Одеса (Україна)

E-mail: elmicroscop@gmail.com

**Актуальність.** Вживання низькоякісних алкогольних напоїв, до складу яких входить метанол, призводить до втрати зору і, в ряді випадків, до смерті. На даний час в літературі експериментальних і, особливо, морфологічних, відомостей стосовно впливу сурогатів алкоголю, які складаються із метанолу та етанолу, на органи та тканини експериментальних тварин, зокрема на орган зору, відсутні.

**Мета.** Вивчення ультроструктурних змін кооперації клітин хоріоретинального комплексу (ендотеліальні клітини хоріокапілярів – клітини пігментного епітелію сітківки – фоторецепторні клітини щурів у віддалені строки після внутрішньочеревної ін'єкції суміші спиртів (40% етанолу і 100% метанолу) у співвідношенні 3:1 при дозі метанолу 2,5 г/кг маси їх тіла.

**Матеріал і методи.** Робота виконана на 12 дорослих білих щурах лінії Вістар масою 250-300 г, підрозділених на 2 групи: I група (піддослідна) – одноразова внутрішньочеревна ін'єкція (ВІ) щурам суміші спиртів (40% етанолу і 100% метанолу) у співвідношенні 3:1 з дозою метанолу – 2,5 г/кг маси їх тіла; II група (контрольна) – одноразова ВІ тваринам 100% метанолу в дозі 2,5 г/кг маси тіла. Вивчалась ультроструктура ендотеліальних клітин хоріокапілярів (ХК), клітини пігментного епітелію сітківки (ПЕС) та фоторецепторні клітини (ФК) через 1 і 3 місяці після ВІ щурам вищевказаних речовин.

**Результати.** Через 1 місяць після ВІ суміші спиртів просвіт ХК та основна речовина мембрани Бруха осміофільні, що свідчить про підвищений вміст в них речовин ліпідної природи. В більшості ХК ендотеліальні клітини характеризуються явищем гідропічної дегенерації. В шарі ПЕС клітини мають поліморфні зміни: від клітин із глибокими дегенеративними змінами органел, місцями з повним спустошенням їх цитоплазми та пошкодженням плазмолем на базальній та апікальній поверхнях цих клітин, до клітин з ознаками компенсаційно-відновних процесів, спрямованих на внутрішньоклітинні репаративні процеси. В шарі ФК спостерігаються ознаки між- та внутрішньоклітинного набряку і дегенерація мембранних структур. Через 3 місяці спостереження ознаки гідропічної дегенерації в досліджуваних структурах хоріоретинального комплексу дещо зменшуються, але все ще залишаються суттєвими. Довгострокова токсична дія метанолу (в незначній його дозі) призводить до глибоких патологічних змін в клітинах хоріоретинального комплексу, до зниження резервних можливостей клітин, і, як результат, відображається в уповільненні репаративних процесів в період від 1 до 3 місяців спостереження, цим, можливо, і пояснюється довготривалий тяжкий стан постраждалих після отруєння сурогатами, про що свідчать клінічні дані.

**Заключення.** Одноразова ВІ щурам суміші спиртів (доза метанолу - 2,5 г/кг маси їх тіла) в період від 1 до 3-х місяців викликає в клітинах хоріоретинального комплексу як явища гідропічної дегенерації, так і явища репаративних процесів. 100% метанол (2,5 г/кг на маси тіла) зумовлює односпрямовані зміни в аналогічних структурах, що і суміші спиртів, але вони носять більш глибокий характер. Провідне місце в розвитку патологічних змін в структурах хоріоретинального комплексу після застосування суміші спиртів відводиться метанолу.

#### Ключові слова:

хоріокапіляри, пігментний епітелій сітківки, фоторецепторні клітини, ультроструктура, дистрофічні зміни, етанол, метанол,

**Вступ.** Вживання низькоякісних алкогольних напоїв (сурогатів) до складу яких, в найбільшій мірі, входить метанол, призводить до втрати зору і, в ряді випадків, до смерті. За даними літератури, метанол в першу чергу пошкоджує зоровий нерв, сітківку та тканини головного мозку [3, 10, 14, 15, 16]. Нами на протязі 12 років проводяться комплексні обширні дослідження по в'ясненню механізмів токсичної дії метанолу на тканини судинної і сітчастої оболонки очей щурів при застосуванні різних доз метанолу [5, 6]. Дослідження показали, що одноразова внутрішньочеревна ін'єкція (ВІ) метанолу в дозах 0,75 г/кг, 2,5 г/кг, 5,0 г/кг, 7,0 г/кг маси тіла щурів викликає первинні зміни в ендотеліальних клітинах судин і капілярів хоріоїдеї (ХО) та в клітинах пігментного епітелію сітківки і глибина їх пошкодження залежить від введеної дози метанолу.

На даний час в літературі експериментальних і, особливо, морфологічних, відомостей стосовно впливу сурогатів алкоголю, які складаються із метанолу та етанолу, на органи та тканини експериментальних тварин практично відсутні [2, 13]. Етанол, з одного боку, чинить токсичну дію на організм людини в великих дозах або при хронічному його вживанні, а з іншого – являється антидотом до метанолу [1, 3, 12]. Ряд авторів, при вивченні токсико-кінетичної взаємодії етилового і метилового спиртів в організмі білих мишей, прийшли до висновку, що під час транспорту речовин із шлунково-кишкового тракту в кровеносне русло етанол має більш високу швидкість адсорбції ніж метанол [9]. Інші дослідники виявили в експериментах на білих щурах, що етанол при використанні його в якості антидоту при гострій інтоксикації метанолом (LD50) викликає посилення імунотоксичних ефектів [2]. В опублікованій нами роботі показано, що одноразова внутрішньочеревна ін'єкція (ВІ) щурам суміші спиртів, в якій доза метанолу складає 2,5 г/кг маси їх тіла, викликає значні ультраструктурні зміни в судинах та капілярах хоріоїдальної оболонки та в клітинах пігментного епітелію сітківки (ПЕС) вже через 1 годину 10 хвилин, які, практично, залишаються до двох тижнів спостереження [7].

**Мета дослідження.** Вивчення ультраструктурних змін кооперації клітинного хоріоретинального комплексу (ендотеліальні клітини хоріокапілярів – клітини пігментного епітелію сітківки – фоторецепторні клітини) щурів у віддалені строки після ВІ суміші спиртів (40% етанолу і 100% метанолу) у співвідношенні 3:1 при дозі метанолу 2,5 г/кг маси їх тіла.

#### Матеріал і методи дослідження

Робота виконана на 12 дорослих білих щурах лінії Вістар масою 250-300 г, підрозділених на 2 групи: I група (піддослідна) – одноразова ВІ щурам суміші спиртів (40% етанолу і 100% метанолу) у співвідношенні 3:1 з дозою метанолу – 2,5 г/кг маси їх тіла; II група (контрольна) – одноразова ВІ тваринам 100% метанолу в дозі 2,5 г/кг маси тіла. Для щурів ефект ЛД50 при ВІ метанолу складає 9,5 г/кг маси їх тіла. Робота з тваринами

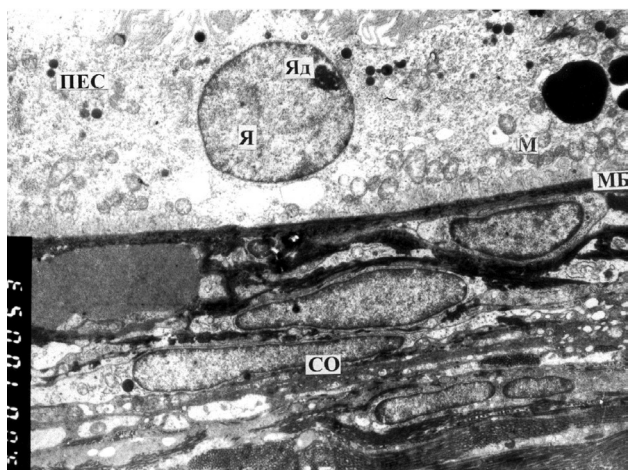
та їх евтаназія здійснювались відповідно до вимог Європейської конвенції (Страсбург, 1986).

Тканини для ультраструктурного дослідження оброблялись по загальноприйнятій в електронній мікроскопії методиці. Вивчалась ультраструктура ендотеліальних клітин хоріокапілярів (ХК), клітин пігментного епітелію сітківки (ПЕС) та фоторецепторних клітин (ФК) через 1 і 3 місяці після ВІ щурам вищевказаної суміші спиртів в електронному мікроскопі ПЕМ-100-01 (Україна).

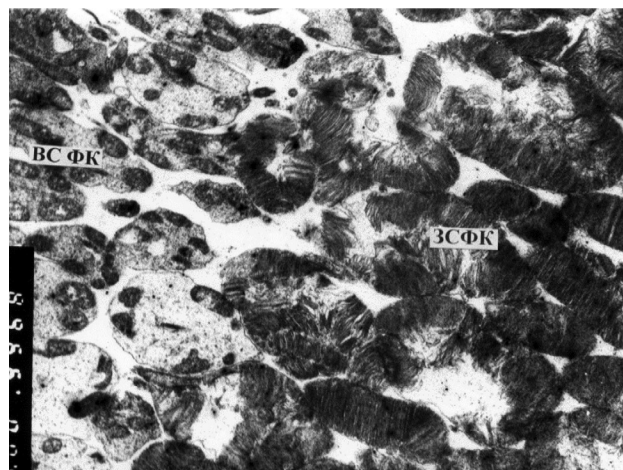
#### Результати

Через 1 місяць після ВІ суміші спиртів провіт хоріокапілярів та основна речовина мембрани Бруха осміофільні, що свідчить про підвищений вміст в ній речовин ліпідної природи. В більшості хоріокапілярів ендотеліальні клітини мають електронно-прозору гіалоплазму та набряк внутрішньомітохондріального матриксу з деструкцією частини крист мітохондрій та розширені поодинокі цистерни гранулярної ендоплазматичної сітки, що характеризується явищем гідропічної дегенерації цих клітин. Окрім того, в цих клітинах відмічається зменшення кількості вільних рибосом та полісом. Проте, в іншій частині хоріокапілярів ендотеліальні клітини – з практично нормальною ультраструктурою або з підвищеним вмістом їх типових органел, що відображає активацію метаболічної діяльності в них і, вочевидь, являється ознакою компенсаційно-відновних процесів, спрямованих на відновлення ультраструктури після пошкоджуючої дії спиртів, зокрема, метанолу, та підтверджується аналогічними змінами в матеріалі контрольної групи. В шарі пігментного епітелію сітківки клітини мають поліморфні зміни: від клітин із глибокими дегенеративними змінами органел, місцями з повним спустошенням їх цитоплазми та пошкодженням плазмолем на базальній та апікальній їх поверхнях, до клітин з ознаками компенсаційно-відновних процесів, які полягають в збільшенні кількості органел, таких як мітохондрії, полісоми та вільні рибосоми, що свідчить про посилення енергоутворюючої та білоксинтезуючої функцій в цих клітинах, спрямованих на внутрішньоклітинні репаративні процеси, але в цей строк вони проявляються в меншій мірі, ніж в перші два тижні спостереження [7]. Звертає на себе увагу значна кількість лізосом у всіх клітинах ПЕС. В шарі фоторецепторних клітин визначаються ознаки між- та внутрішньоклітинного набряку та дегенерація мембранних структур. Відламки дисків зовнішніх сегментів ФК, як з деструкцією мембран, так і з нормальною структурою, знаходяться скупчено під клітинами ПЕС. Слід зазначити, що патологічні зміни в фоторецепторних клітинах корелюють із змінами в клітинах пігментного епітелію сітківки. Окрім того, процеси фагоцитозу відпрацьованих дисків зовнішніх сегментів ФК клітинами ПЕС практично відсутні.

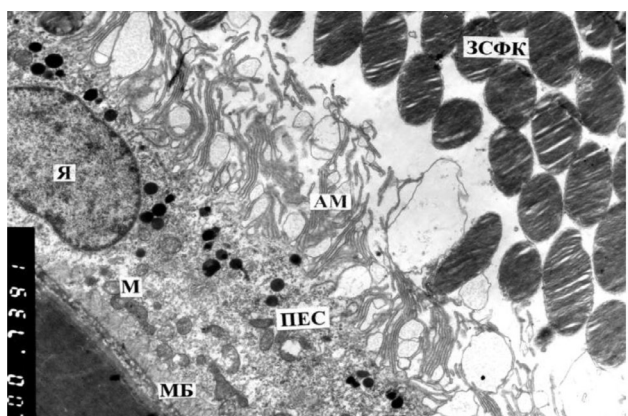
На 3-й місяць спостереження ознаки гідропічної дегенерації в досліджуваних структурах хоріорети-



**Рис. 1.** 3 місяці після введення суміші спиртів (доза метанолу - 2,5 г/кг маси тіла щура). Мембрана Бруха та просвіт хоріокапіляра осміюфільні, Гідропічна дегенерація ендотеліальних клітин хоріокапілярів та клітин пігментного епітелію сітківки. X 3 000. Умовні позначення: СО – судинна оболонка, МБ – мембрана Бруха, ПЕС – пігментний епітелій сітківки, Я – ядро, Яд – ядерце, М – мітохондрії.



**Рис. 2.** 3 місяці після введення суміші спиртів (доза метанолу – 2,5 г/кг маси тіла щура). Деструкція мембран дисків зовнішніх сегментів та міжклітинний набряк фоторецепторних клітин. X 6 000. Умовні позначення: ВСФК – внутрішні сегменти фоторецепторних клітин, ЗСФК – зовнішні сегменти фоторецепторних клітин.



**Рис. 3.** 3 місяці після введення 100% метанолу (доза метанолу – 2,5 г/кг маси тіла щура). Відновлення ультраструктури клітини пігментного епітелію сітківки. X 3 000. Умовні позначення: МБ – мембрана Бруха, ПЕС – пігментний епітелій сітківки, АМ – апікальні мікрворсинки, Я – ядро, М – мітохондрії ЗСФК – зовнішні сегменти фоторецепторних клітин.

нального комплексу (ХРК), в порівнянні з попереднім строком, дещо зменшуються, але вони ще суттєво мають місце (рис. 1, 2). Просвіт частини хоріокапілярів та мембрана Бруха більш просвітлені в порівнянні з попереднім строком та більш активно відбуваються процеси фагоцитозу відпрацьованих дисків фоторецепторних клітинами ПЕС. Однак явища внутрішньоклітинних репаративних процесів проявляються аналогічно з попереднім строком (рис. 1, 2).

Порівняння даного матеріалу з контрольним при аналогічних строках спостереження показало, що зміни в клітинах ХРК після ін'єкції 100% метанолу мають

односпрямований характер, але з більш значними патологічними змінами. Проте паралельно в досліджуваних клітинах ХРК відбувається відновлення внутрішньоклітинної ультраструктури (рис. 3).

#### Обговорення

Аналіз матеріалу показав, що у віддалені строки (1-3 місяці) після ВІ суміші спиртів (етилового і метилового) у співвідношенні 3:1 в кооперації клітин ХРК залишаються практично однотипові зміни, що і в строк 14 діб, які були опубліковані раніше [7], тобто спостерігаються як дегенеративні, різної глибини прояву, так і уповільнені репаративні процеси. В клітинах ПЕС вони більш активні, можливо, за рахунок їх високих регенеративних здібностей. Слід також відзначити, що нами виявлена закономірність, пов'язана з тим, що рівень пошкодження клітин ПЕС залежить від стану ендотеліальних клітин хоріокапілярів. Відомо, що живлення зовнішніх шарів сітківки щурів та людей відбувається з хоріокапілярів. В нашому випадку, патологічні процеси в ендотеліальних клітинах хоріокапілярів та в плазмі крові, які відбуваються під впливом суміші спиртів і, особливо, метанолу, призводять до порушення транспортних процесів із хоріокапілярів в клітини ПЕС, це викликає дефіцит поживних речовин в клітинах ПЕС і, в подальшому, в ФК. В науковій літературі наявні дані про шкідливу дію спиртів на мембрани клітин та описані зміни реологічних властивостей крові, деструкція білків, пошкодження формених елементів крові під впливом метанолу [12, 14]. Разом з тим не виключається і пряма пошкоджуюча дія спиртів, зокрема метанолу, на ендотелій хоріокапілярів, ПЕС і, потім, на інші клітини сітківки. Можливо тому і процес фагоцитозу відпрацьованих дисків зовнішніх сегментів фото-

рецепторних клітин клітинами ПЕС різко перерваний в перші години спостереження після ін'єкції як 100% метанолу, так і суміші його з етанолом [7]. Такі зміни спостерігаються на протязі трьох місяців. Це призводить до недостаті ретиналю, який звільнюється в клітинах ПЕС із мембран відпрацьованих дисків зовнішніх сегментів фоторецепторних клітин під час переварювання їх лізосомами. Крім того, настає дефіцит вітаміну А, який вступає з печінки через кровоносне русло в клітини ПЕС в нормальних умовах, а під впливом спиртів її структура також пошкоджується [1, 4]. Відсутність цих речовин унеможливило утворення зорового пігменту, який приймає участь в перетворенні світлової енергії в енергію нервового імпульсу, що і призводить до часткової, а при вживанні великих доз метанолу і до повної втрати зору. І в цілому це призводить до дистрофії сітківки [8]. Довгострокова токсична дія метанолу (в незначній його дозі) призводить до глибоких патологічних змін в клітинах хоріоретинального комплексу, до зниження резервних можливостей клітин, і, як результат, відображається в уповільненні репаративних процесів в період від 1 до 3 місяців спостереження, цим, можливо, і пояснюється довготривалий тяжкий стан постраждалих після отруєння сурогатами, про що є повідомлення в літературі [11].

Таким чином, одноразова внутрішньочеревна ін'єкція шурам суміші спиртів (доза метанолу – 2,5 г/кг маси їх тіла) в період від 1 до 3 місяців спостереження викликає в клітинах хоріоретинального комплексу явища як гідропічної дегенерації, так і репаративних процесів, які протікають уповільнено. 100% метанол (2,5 г/кг на маси тіла) зумовлює односпрямовані зміни в аналогічних структурах, що і суміш спиртів, але вони носять більш глибокий характер. Провідне місце в розвитку патологічних змін в досліджуваних структурах хоріоретинального комплексу після застосування суміші спиртів відводиться метанолу.

### Література

1. **Акимов П.А.** Влияние острой алкогольной интоксикации на содержание гликогена в печени и скелетных мышцах / П.А. Акимов, А.Г. Орбиданс, Г.А. Терехин, Н.А. Терехина // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2010. – № 2. – С. 15-17.
2. **Забродский П.Ф.** Влияние этанола на изменение иммунотоксичности метанола / П.Ф. Забродский, В.Г. Германчук // Эксперим. и клин. фармакол. – 2001. – Т.64, № 5. – С. 40-42.
3. **Забродский П.Ф.** Иммунотоксикологическая характеристика метанола. Коррекция нарушенных функций иммунной системы. Монография / П.Ф. Забродский, В.В. Серов. – Саратов, 2013. – С. 214.
4. **Молчанюк Н.И.** Ультраструктура гепатоцитов крыс в ранние сроки после внутрибрюшинного введения метанола. / Н.И. Молчанюк // Буковинський медичний вісник. – 2013. – №4. – С. 100-103.
5. **Молчанюк Н.И.** Свето- и электронно-микроскопическое изучение хориокапилляров, пигментного эпителия и фоторецепторных клеток сетчатки крыс в динамике после введения различных доз метанола / Молчанюк. Н.И. // Вісник Київського національного університету ім. Тараса Шевченка. Проблеми регуляції фізіологічних функцій – 2015. – 1(18). – С. 74-78.
6. **Молчанюк Н.И.** Ультраструктурні зміни в хоріоїдеї та сітківці очей щурів, викликані сумішшю спиртів (40% етанолу і 100% метанолу) / Н.И. Молчанюк // Журнал Київського національного університету ім. Т.Г.Шевченка. Серія Біологія. – 2019. – №79. – С. 16-24.
7. **Молчанюк Н.И.** Вплив суміші спиртів (40% етанолу і 100% метанолу) на ультраструктуру судинної та сітчастої оболонки очей щурів / Молчанюк Н.И. // Вісник проблем біології та медицини – 2019. Вип. 4.Т.1. – №153. – С. 222-227.
8. **Островский М.А.** Химия и молекулярная физиология зрения, светочувствительный белок родопсин / Островский М.А., Т.Б. Фельдман Т.Б. // Успехи химии – 2012. – Т. 81. – № 11. – С.1071-1090.
9. Токсико-кинетическое взаимодействие этилового и метилового спиртов в организме белых мышей / Н.Я. Головенко, В.Б. Ларионов, Н.В. Овчаренко, И.Ю. Борисюк, Е.Б. Лихота. // Современные проблемы токсикологии – 2008. – № 1. – С. 32-36.
10. **Manuchehri A. A.** A case of methanol poisoning leading to prolonged respirator dependency with consequent blindness and irreversible brain damage / Manuchehri A. A., Alijanpour E., Daghmechi M., et al // Caspian J. Intern. Med. – 2015. – Vol.6, № 3. – P.180-183.
11. **Paasma R.** Methanol poisoning and long term sequelae - a six years follow-up after a large methanol outbreak / Paasma R, Hovda K. E., Jacobsen D. // BMC Clin Pharmacol. – 2009. Vol.9. – P.5-9.
12. **Patra M.** Under the influence of alcohol: the effect of ethanol and methanol on lipid bilayers / M. Patra., E. Salonen, E. Teramaetal // Biophys. J. – 2006. —Vol.90. – №2. – P. 1121-1135.
13. **Pohanka M.** Toxicology and the biological role of methanol and ethanol: current view. Biomedical Papers. – 2015. –Vol.160, № 1. – P. 54-63.
14. **Rajamani R.** 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.
15. **Sweeting J. N.** Species differences in methanol and formic acid pharmacokinetics in mice, rabbits and primates / Sweeting J. N., Siu M., McCallum G. P., Miller L., Wells P. G. // Toxicology and Applied Pharmacology – 2010. – Vol. 247, № 1. – P. 28-35.
16. **Zhai R.** Evidence for Conversion of Methanol to Formaldehyde in Nonhuman Primate Brain / R. Zhai , N. Zheng, J. Rizak, X. Hu // Anal Cell Pathol (Amst) – 2016. – Vol. 10. – P. 459-454.

*Автори засвідчують про відсутність конфлікту інтересів, які б могли вплинути на їх думку стосовно предмету чи матеріалів, описаних та обговорених в даному рукопису.*

*Поступила 12.06.2020*

## Ультраструктурные изменения клеток хориоретинального комплекса глаз крыс в отдаленные сроки после инъекции смеси 40% этанола и 100% метанола

Молчанюк Н.И.

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

**Введение.** Применение низкокачественных алкогольных напитков (суррогатов) в состав которых, в наибольшей степени, входит метанол, приводит к потере зрения и, в ряде случаев, к смерти. В настоящее время в литературе экспериментальных и, особенно, морфологических, сведений о влиянии суррогатов алкоголя, состоящих из метанола и этанола, на органы и ткани экспериментальных животных, в частности на орган зрения, отсутствуют.

**Цель.** Изучение ультраструктурных изменений кооперации клеток хориоретинального комплекса (эндотелиальные клетки хориокапилляров – клетки пигментного эпителия сетчатки – фоторецепторные клетки) крыс в отдаленные сроки после внутрибрюшной инъекции смеси спиртов (40% этанола и 100% метанола) в соотношении 3:1 при дозе метанола 2,5 г / кг массы их тела.

**Материал и методы.** Работа выполнена на 12 взрослых белых крысах линии Вистар массой 250-300 г, подразделенных на 2 группы: I группа (подопытная) – одноразовая внутрибрюшная инъекция (ВИ) крысам смеси спиртов (40% этанола и 100% метанола) в соотношении 3:1 с дозой метанола 2,5 г/кг массы их тела; II группа (контрольная) – одноразовая ВИ животным 100% метанола в дозе 2,5 г/кг массы тела. Для крыс эффект ЛД50 при ВИ метанола составляет 9,5 г/кг массы их тела. Изучалась ультраструктура эндотелиальных клеток хориокапилляров, клеток пигментного эпителия сетчатки и фоторецепторных клеток в электронном микроскопе ПЭМ-100-01 (Украина) через 1 и 3 месяца после ВИ крысам вышеуказанных веществ.

**Результаты.** Через 1 месяц после ВИ смеси спиртов просвет хориокапилляров и мембрана Бруха осмиофильны, что свидетельствует о повышенном содержании в них веществ липидной природы. В большинстве хориокапилляров эндотелиальные клетки характеризуются явлением гидропической дегенера-

ции. В слое пигментного эпителия сетчатки клетки имеют полиморфные изменения: от клеток с глубокими дегенеративными изменениями органелл, местами с полным опустошением цитоплазмы, и повреждением плазмолемм на базальной и апикальной поверхностях этих клеток, до клеток с признаками компенсаторно-восстановительных процессов, направленных на внутриклеточные репаративные процессы. В слое фоторецепторных клеток наблюдаются признаки меж- и внутриклеточного отека, а также определяется дегенерация мембранных структур. Через 3 месяца наблюдения признаки гидропической дегенерации в исследуемых структурах хориоретинального комплекса, по сравнению с предыдущим сроком, несколько уменьшаются, однако они еще существенны. Длительное токсическое действие метанола (в незначительной его дозе) приводит к глубоким патологическим изменениям в клетках хориоретинального комплекса, к снижению резервных возможностей клеток, и, как результат, отражается в замедлении репаративных процессов в период от 1 до 3 месяцев наблюдения, чем, возможно, и объясняется ухудшение состояния пострадавших через 2-3 месяца после отравления суррогатами, о чем свидетельствуют клинические данные.

**Заключение.** Одноразовая внутрибрюшная инъекция крысам смеси спиртов (доза метанола - 2,5 г/кг массы их тела) в период от 1 до 3 месяцев наблюдения вызывает в клетках хориоретинального комплекса как явления гидропической дегенерации, так и явления репаративных процессов, которые протекают замедленно. 100% метанол (2,5 г / кг массы тела) приводит к однонаправленным изменениям в структурах хориоретинального комплекса, как и смесь спиртов, но они носят более глубокий характер. Ведущее место в развитии патологических изменений в исследуемых структурах хориоретинального комплекса после применения смеси спиртов отводится метанолу.

**Ключевые слова:** хориокапилляры, пигментный эпителий сетчатки, фоторецепторные клетки, ультраструктура, этанол, метанол