

УДК 617.735–778.317–092.19:615.916

Особенности ультраструктуры хориоретинального комплекса крыс в динамике после введения повышенной дозы метанола

Н. Е. Думброва, д. мед. н., проф., Н. И. Молчанюк, канд. биол. н.

ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В. П. Филатова НАМН Украины» г. Одесса

E-mail: elmicroscop@gmail.com

Ключевые слова: хориоретинальный комплекс, метанол, ультраструктура, хориокапилляры, пигментный эпителий сетчатки, фоторецепторные клетки.

Ключові слова: хориоретинальний комплекс, ультраструктура, хориокапіляри, пігментний епітелій сітківки, фоторецепторні клітини, метанол

Вступ. Широке використання метанолу та його доступність збільшують ймовірність випадкового або хронічного впливу його на організм людини. У зв'язку з цим виникає важливість вивчення механізмів його токсичності для людини, а також для інших живих істот.

Мета дослідження — вивчення впливу метанолу на ультраструктуру хориоретинального комплексу (ХПК): (хориокапіляри (ХК) — пігментний епітелій сітківки (ПЕС) — фоторецепторні клітини (ФК) сітківки — (МБ) мембрану Бруха) білих щурів.

Матеріал і методи дослідження. Електронно-мікроскопічно вивчалися зміни в елементах ХПК білих щурів в динаміці (1–14 діб) після одноразового внутрішньочеревного введення метанолу в дозі 2,5 г/кг маси тіла.

Результати та їх обговорення. Показано, що патологічний процес тече хвилеподібно: у першу добу основні ультраструктурні зміни виявлялися в ХК і ПЕС. У ПЕС вони полягали в альтерації мітохондрій і каналців гладкої ендоплазматичної сітки, в вогнищевому руйнуванні плазматичних мембран, особливо апікальної області клітин. У клітинах ПЕС на третю добу виявлялися ознаки внутрішньоклітинних компенсаторно-відновних процесів в найбільшій мірі. Однак на 7–14 добу пошкодження структур поглиблювалися.

Висновок. Токсична дія метанолу в дозі 2,5 г/кг маси тіла на структури ХПК проявляється тривало. На застосовану дозу метанолу найбільшою мірою реагують клітини ПЕС.

Electronic — microscopic study of the ultrastructure of the chorioretinal complex of rats in dynamics after introduction of the increased dose of methanol

N. E. Dumbrova, N. I. Molchanjuk

SI «The Filatov Institute of Eye Diseases and Tissue Therapy of NAMS of Ukraine»

Key words: chorioretinal complex, ultrastructure, choriocapillaries, pigment epithelium of the retina, photoreceptor cells

Introduction. A wide use of methanol and its availability increase probability of casual or its chronic influence on the human organism. Therefore, it is important to study its mechanisms for the person as well as other alive creatures.

Purpose of the investigation. To study the influence of methanol on ultrastructure of the chorioretinal complex (CRC): (choriocapillaries (CC) — pigment epithelium of the retina (PER) — photoreceptor cells (PC) of the retina) of white rats.

Material and methods. Electronic- microscopic changes in the elements of CRC of white rats in dynamics (1–14 day) after unitary intraabdominal introduction of methanol in the dose of 2.5 g/kg of body weight were investigated.

Results and discussion. It is shown that the pathological process has a wavy course: on the 1st day the basic ultrastructural changes were revealed in CC and PER. In PER they consisted in alteration of mitochondria and canaliculi of the smooth endoplasmic net, in focal destruction of the plasmatic membranes, especially of the apical areas of cells. In PER cells signs of the endocellular compensatory-regenerative processes were revealed to the greatest degree on the 3rd day. However, damages of the structures were aggravated on the 7th — 14th day.

Conclusions. Toxic effect of methanol in the dose of 2.5 g/kg of the body weight on CRC structures is manifested for a long time. Cells of PER react to the applied influence to the greatest degree

Введение. Широкое использование метанола и его доступность увеличивают вероятность случайного или хронического воздействия его на организм человека [1]. В последние годы участились случаи массового отравления метанолом населения как в Украине, так и других странах, что связано также с распространением некачественной алкогольной продукции и может приводить к генетическим изменениям в определенных популяциях населения. Как известно, метанол является высокотоксичным одноатомным спиртом и представляет собой бесцветную прозрачную жидкость, по вкусу и запаху напоминающую этиловый спирт. В связи с этим возникает важность изучения механизмов его токсичности для человека, а также для других живых существ. Согласно клиническим данным, метанол первично поражает зрительный нерв, сетчатку и ткани головного мозга [5].

Экскурс в литературу показал, что вопросами влияния метанола на орган зрения исследователи интересовались давно, нами найдены работы еще 30-х годов XIX века. В 70–90 годы интерес к данному вопросу возрос в связи с новыми возможностями и методами исследования. Однако в научной литературе представлено небольшое число экспериментальных исследований, посвященных изучению структурных изменений и биохимических показателей в сетчатке и зрительном нерве животных в условиях действия метанола [5, 8, 9]. Кроме того, детальных ультраструктурных исследований всех слоев сетчатки и отделов зрительного нерва в динамике наблюдения после метаноловой интоксикации не проводилось. Проведенные нами ранее исследования ультраструктуры хориоретинального комплекса (ХПК) после однократного введения метанола в дозе 0,75 г/кг выявили обратимые и компенсаторные изменения в клетках изучаемого комплекса глаза [3]. Для нас представляет интерес изучение изменений данных структур при введении возрастающих дозировок данного вещества.

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния метанола на ультраструктуру ХПК: хориокапилляры (ХК) — пигментный эпителий сетчатки (ПЭС) — фоторецепторные клетки (ФК) сетчатки белых крыс 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. Доза 0,75 г/кг массы тела крысы вызывает слабо выраженную реакцию в тканях глаза. Поэтому дозу 2,5 г/кг мы считаем повышенной. 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.

Изучался материал через 1, 3, 7 и 14 суток после введения метанола. Исследовалась ультраструктура ХК, ПЭС и ФК сетчатки глаз крыс. Эвтаназия животных осуществлялась методом декапитации в соответствии с «Требованиями биоэтики Хельсинкской декларации об этическом регулировании медицинских исследований». Забор и обработка образцов для ультраструктурного исследования осуществлялись по общепринятой методике. Изучались и фотографировались объекты в электронном микроскопе ПЭМ-100–01.

Результаты исследования и их обсуждение

При электронно-микроскопическом исследовании установлено, что во все сроки после введения метанола в слое ХК сосудистой оболочки отмечался полиморфизм изменений среди эндотелиальных клеток (ЭК): наблюдались ЭК с признаками отека цитоплазмы и деструкцией крист митохондрий, ЭК с практически нормальной ультраструктурой, а также ЭК с увеличенным количеством органелл, участвующих в белковом синтезе. Последние имели крупные размеры и, практически, полностью перекрывали просвет ХК. Просвет большей части ХК заполнен электронно-плотным содержимым, содержащим эритроциты. В то же время наблюдались единичные ХК с нормальным, т. е. с умеренно электронно-плотным просветом. Следует отметить, что в динамике наблюдения в ХК увеличивается количество ЭК с признаками отека цитоплазмы и альтерации внутриклеточных органелл. Мембрана Бруха в динамике наблюдения выглядела электронно-плотной, что, по-видимому, связано с пропитыванием основного вещества мембраны содержимым просвета ХК. Через 7–14 суток наблюдались электронно-прозрачные очаги в осмиофильном основном веществе.

В слое ПЭС через сутки после введения метанола многие клетки отличались от контрольного материала деструкцией значительной части канальцев гладкой эндоплазматической сети (ГЭС) и элементами очаговой альтерации крист у большей части митохондрий. При этом ряд митохондрий имели разрушенную наружную мембрану, хотя встречались и органеллы небольших размеров с нормальной структурой (Рис. 1, 2). В этих клетках наблюдалось повышенное содержание лизосом, сглаженность базальных складок и очаговая фрагментация апикальных микровилл. Под такими клетками отмечалось скопление обломков наружных сегментов (НС) ФК, часть из которых были с очаговой деструкцией мембран дисков, что свидетельствовало о блокаде процесса фагоцитоза.

На третьи сутки в клетках ПЭС, параллельно с патологическими изменениями, аналогичными описанным в предыдущем сроке, отмечались признаки компенсаторно-восстановительных процессов, о чем свидетельствовало увеличение количества внутриклеточных органелл: митохондрий, часть из которых имели элементы деструкции крист, обильно развитой ГЭС, а также наличие 2–3 комплексов

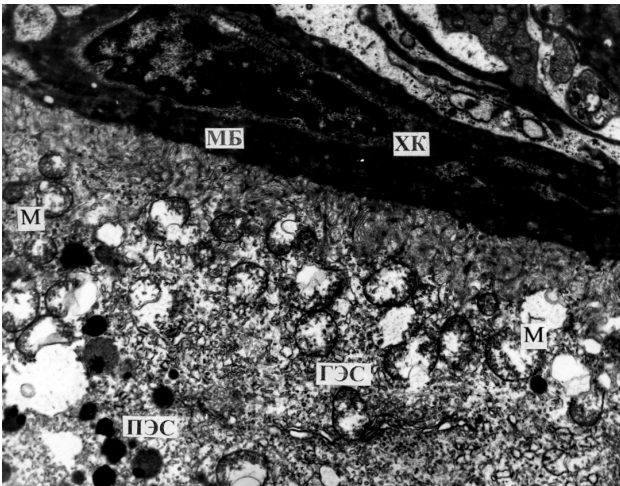


Рис. 1. Ультраструктура хориоретинального комплекса через 1 сутки после введения метанола. Выраженная осмиофилия всех структур хориокапилляра и мембраны Бруха. Фрагментация митохондрий и элементов гладкой эндоплазматической сети в клетке пигментного эпителия сетчатки. Электронная микрофотография. X 6 000. Условные обозначения: XK — хориокапилляр, МБ — мембрана Бруха, ПЭС — пигментный эпителий сетчатки, М- митохондрии, ГЭС — гладкая эндоплазматическая сеть.

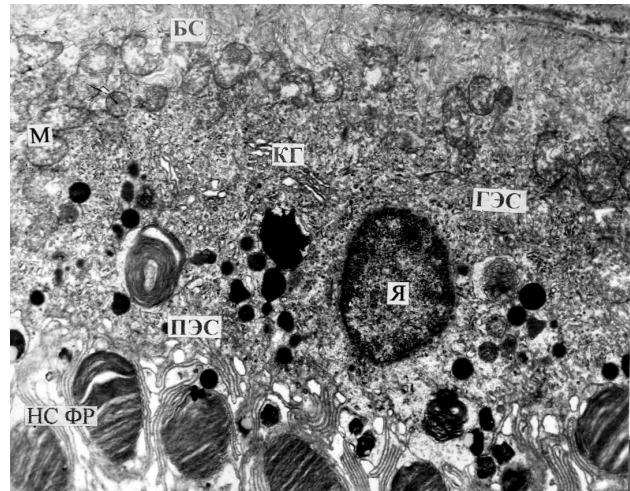


Рис. 3. Ультраструктура пигментного эпителия сетчатки через 3 суток после введения метанола. Признаки компенсаторно-восстановительных процессов в клетке. Электронная микрофотография. X 6 000. Условные обозначения: ПЭС — пигментный эпителий сетчатки, БС — базальные складки, Я — ядро, М- митохондрии, ГЭС — гладкая эндоплазматическая сеть, КГ — комплекс Гольджи.

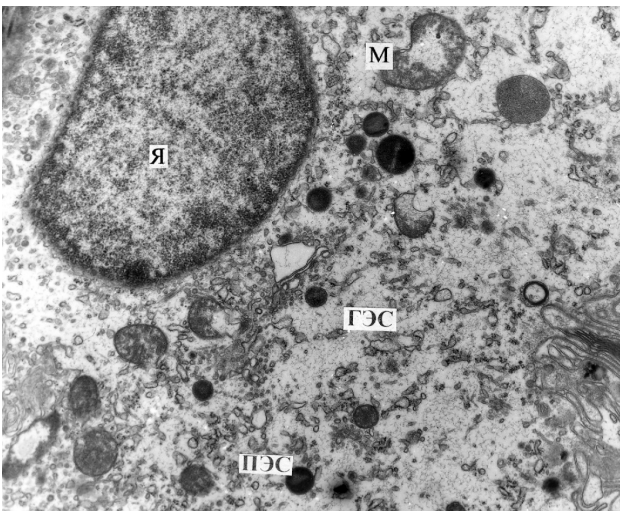


Рис. 2. Ультраструктура пигментного эпителия сетчатки через 1 сутки после введения метанола. Опустошение цитоплазмы клетки. Электронная микрофотография. X 8 000. Условные обозначения: Я — ядро, ПЭС — пигментный эпителий сетчатки, М- митохондрии, ГЭС — гладкая эндоплазматическая сеть.

Гольджи и большое скопление в цитоплазме фагосом, лизосом и вторичных лизосом. В этих клетках наблюдались хорошо выраженные базальные складки, которые глубоко проникали в цитоплазму, а также апикальные микровиллы, определялись признаки формирования фагосом (Рис. 3).

На 7–14 сутки исследования в слое ПЭС выявлялись клетки с различной степенью альтерации

органелл, вплоть до почти полного опустошения цитоплазмы, а сохранившиеся единичные органеллы были в состоянии деструкции. В таких клетках наблюдалось очаговое разрушение апикальных микровилл. Следует отметить, что в клетках ПЭС с признаками альтерации органелл определялись и элементы компенсаторно-восстановительного характера, заключавшегося в повышенном содержании митохондрий с нормальной структурой, полисом и окаймленных пузырьков, что свидетельствовало об усилении обменных процессов между ХК и ПЭС в этой области клеток (Рис. 4, 5).

В фоторецепторном отделе сетчатки во все сроки наблюдения выявлялись зоны очаговой деструкции мембран дисков НС, деформация части митохондрий с очаговой деструкцией крист во внутренних сегментах (ВС) и значительным расширением элементов зернистой эндоплазматической сети (ЗЭС) с дегрануляцией ее мембран, вплоть до образования крупных полостей в цитоплазме ФК, особенно в ранние сроки. В области ядер ФК отмечались признаки отека глиальных мюллеровских клеток, располагавшихся в области наружной пограничной мембраны. К 14 суткам в слое ФК также выявлялись очаги некроза этих клеток.

Таким образом, проведенные исследования показали, что однократное введение метанола в дозе 2,5 г/кг массы тела, вызывало патологические изменения в ультраструктурах ХПК, которые прогрессировали в динамике (1–14 сутки). В клетках ПЭС эти явления проявлялись в наибольшей степени и заключались, преимущественно, в альтерации митохондрий и канальцев ГЭС, в очаговом разруше-

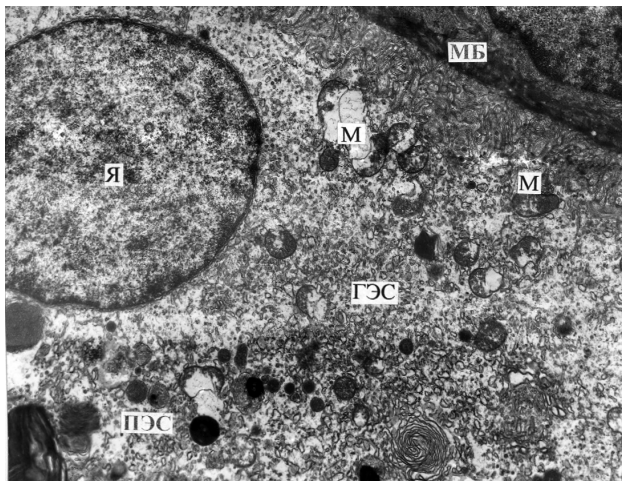


Рис. 4. Ультраструктура пигментного эпителия сетчатки через 14 суток после введения метанола. Выраженная фрагментация цитоплазматических органелл в клетке. Электронная микрофотография. X 5 000. Условные обозначения: ПЭС — пигментный эпителий сетчатки, Я — ядро, М — митохондрии, ГЭС — гладкая эндоплазматическая сеть.

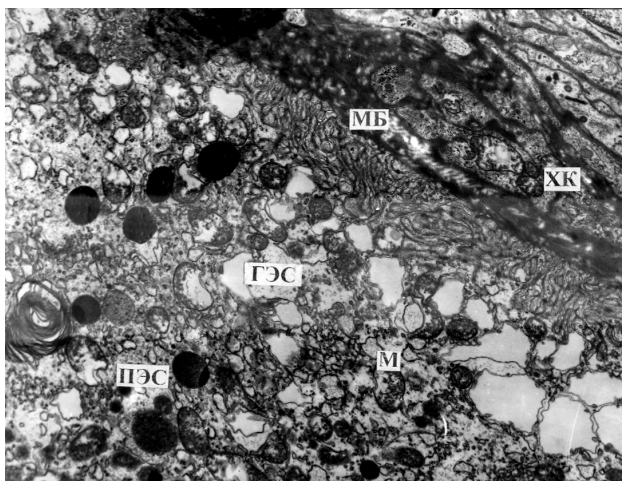


Рис. 5. Ультраструктура хориоретинального комплекса через 14 суток после введения метанола. Осмиофилия структур хориокапилляров и мембраны Бруха. Электронно-прозрачные очаги в местах разрушения элементов гладкой эндоплазматической сети в цитоплазме клетки пигментного эпителия сетчатки. Электронная микрофотография. X 6 000. Условные обозначения: ХК — хориокапилляр, МБ — мембрана Бруха, ПЭС — пигментный эпителий сетчатки, М — митохондрии, ГЭС — гладкая эндоплазматическая сеть.

нии плазматических мембран, что приводит к нарушению энергообразования, детоксикационной и других функций этих клеток. Отсутствие в части этих клеток базальных складок, особенно через сутки после введения токсического вещества, отражало нарушение их насосной функции. Это вызывало дефицит необходимых веществ, которые поступали из ХК в клетки ПЭС и, в целом, приводило к нарушению метаболических процессов в клетках

ПЭС. По данным литературы, метанол вызывает деструкцию белков плазмы крови, что снижало ее реологические свойства и поступление веществ в ткани [2]. Кроме этого, метанол также оказывает непосредственное повреждающее действие на липопротеидные комплексы плазматических мембран [4]. Фрагментация апикальных микровилл и скопление обломков мембран НС ФК под клетками ПЭС свидетельствовали о подавлении процесса фагоцитоза клетками. Однако следует отметить, что на третьи сутки в клетках ПЭС преобладали признаки усиления метаболических процессов, что отражалось в повышении числа типичных для этих клеток органелл и увеличении количества фагосом, указывающем на активацию процесса фагоцитоза. В то же время, в этих же клетках отмечалась реакция митохондрий по типу их истощения, что, возможно, связано с большим расходом энергии. Несмотря на вышеизложенное, к концу срока исследования (14 суток) процессы деструкции в клетках ПЭС нарастали, отмечались большие поля опустошения цитоплазмы, наблюдались признаки выраженной дегенерации органелл и очаги разрушения плазмолемм клеток, хотя рядом также проявлялись элементы компенсаторно-восстановительных процессов. В фоторецепторном отделе сетчатки выявляли изменения структур различной степени выраженности, особенно митохондрий во ВС ФК, вплоть до очагового некроза клеток. Степень проявления патологических изменений в ФК зависела от глубины нарушений в клетках ПЭС.

Таким образом, нами выявлено, что наибольшие изменения, вызванных примененной дозой метанола, наблюдались в клетках ПЭС. Они выражались во внутриклеточных структурных изменениях и нарушении насосной и фагоцитарной функций этих клеток. Особенно следует отметить разнообразное повреждение структуры митохондрий в ПЭС и ВС ФК.

В целом, существенным выводом из проведенных исследований являлось наличие глубоких нарушений биоэнергетических процессов в изучаемых тканях. В литературных источниках также имеются единичные сведения о повреждении митохондрий в сетчатке, в частности в фоторецепторных клетках и аксонах зрительного нерва крыс, вызванном метаноловой интоксикацией [7,9]. Авторы высказывают предположение, что не сам метанол, а продукты его распада — формиа-ты — вызывают вышеописанные изменения в тканях глаза, что приводит к дефициту энергии в клетках. Вы- сказанное предположение подтверждают данные биохимических исследований, свидетельствующие о том, что формиа-т селективно действует на митохондрии сетчатки, ингибируя синтез АТФ [6]. Результаты, полученные нами в этой работе, в определенной степени коррелируют с данными ультраструктурных исследований, авторы которых изучали изменения в структуре нервного аппарата сетчатки, вызванные внутри-

брюшинным введением метанола в дозе 1,8 г/кг и выявили выраженные дистрофически-деструктивные изменения в сетчатке и, особенно, в фоторецепторных, биполярных и ганглиозных клетках [5].

Представленные нами ультраструктурные исследования ХРК глаза являются фрагментом глубокого комплексного изучения изменений в тканях глаза и других органах крыс, вызванных действием метанола. Поэтому изучение тонких механизмов действия метанола на живые ткани на субклеточном уровне в дальнейшем позволит понять механизм повреждающего действия этого токсического фактора на органы и организм в целом, а также, возможно, откроет возможности изобретения более эффективных лекарственных средств.

Литература

1. **Битенский В. С.** Роль алкоголизма и наркомании в демографическом кризисе в Украине / **Битенский В. С.** / Журнал АМН Украины. — 2007. — т.13. — № 3. — С. 543–550.
2. **Долматова Л. С.** Особенности изменения активности антиоксидантных ферментов в различных типах лейкоцитов крови у больных хроническим алкоголизмом / Долматова Л. С., Ромашина В. В. / Патологическая физиология и экспериментальная терапия. — 2003. — № 2. — С. 17–19.
3. **Думброва Н. Е.** Ультраструктурные изменения элементов хориоретинального комплекса глаза крыс после действия метилового спирта / Думброва Н. Е., Молчанюк Н. Н. / Офтальм. журн. — 2009. — № 5. — С. 54–57.
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. / Вестник новых мед. технологий. — 2007. — Том XIV. — № 1. — С. 81–86.

References

1. **Bitenskii VS.** The role of alcohol and drug abuse in the demographic crisis in Ukraine. Zhurnal AMN Ukrainy. 2007;13(3):543–50.
2. **Dolmatova LS, Romashina VV.** Features of changes in the activity of antioxidant enzymes in different types of white blood cells in patients with chronic alcoholism. Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya. 2003;2:17–9.
3. **Dumbrova Nye, Molchanyuk NN.** Ultrastructural changes of chorioretinal complex elements of rat eyes after the action of methyl alcohol. Oftalmol Zh. 2009; 5: 54–7.
4. **Serov VV, Zabrodskii PF, Kirichuk VF.** Effect of acute methanol poisoning on lipid peroxidation and concentration in blood corticosterone. Vestnik novykh med. Tehnologii. 2007;XIV(1):81–6.
5. **Tsimbalyuk VI, Nosov AT, Chebatoreva LL, Vasyuta VA.** Electrophysiological and morphological exponents,

Выводы

1. Однократное внутривнутрибрюшинное введение метанола в дозе 2,5 г/ кг массы тела вызывало наиболее выраженные изменения в клетках ПЭС, заключающиеся преимущественно в альтерации митохондрий и канальцев ГЭС, в очаговом разрушении плазматических мембран, особенно апикальных микровилл.

2. В структурах ХРК параллельно с деструктивными изменениями в клетках отмечались признаки компенсаторно-восстановительных процессов, которые усиливались на третьи сутки исследования.

3. В динамике от 1 до 14 суток степень выраженности деструктивных процессов в исследуемых структурах нарастала.

5. Электрофизиологические и морфологические показатели, состояние зрительного анализатора в динамике применения трофина при интоксикации метанолом / [Цимбалюк В. И., Носов А. Т., Чеботарёва Л. Л., Васюта В. А.]. — Украинский нейрохирургический журнал. — 2004. — № 3. — С.97–102.
6. **Eells J. T.** Inhibition of retinal mitochondrial function in methanol intoxication. / Eells J. T., Salzman M. M., Trusk T. C. — 1995. — Toxicologist, 15: 21–23.
7. Methanol poisoning: Ocular toxicity produced by formate. [Martin-Amat G., McMartin K. E., Hayreh S. S., Tephly T. R.], — 1978. — Toxicol Appl Pharmacol, 45: 201–208.
8. Retinal toxicity in methanol poisoning / [Treichel J. L., Murray T. G., Burton T. C. at all.] / Retina. — 2004. —24. — P. 309–312.
9. Oxidative stress induced by methotrexate alone and in the presence of methanol discrete regions of the rodent brain, retina and optic nerve / [Rajamani R., Muthuvel A., Senthilvelan M, Sheeladevi R]. — Toxicol. Lett, 2006. — 12. — № 5. — P. 12–15.

Поступила 13.11.2013

the state of the visual analyzer in the dynamics of the Trophin application in the methanol intoxication. Ukrainkii neurokhirurgicheskii zhurnal. 2004; 3: 97–102.

6. **Eells JT, Salzman MM, Trusk TC.** Inhibition of retinal mitochondrial function in methanol intoxication. Toxicologist.1995; 15: 21–3.
7. **Martin-Amat G, McMartin KE, Hayreh SS, Tephly TR.** Methanol poisoning: Ocular toxicity produced by formate. Toxicol Appl Pharmacol. 1978; 45: 201–8.
8. **Treichel JL, Murray T G, Burton TC** at all. 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 discrete regions of the rodent brain, retina and optic nerve. Toxicol. Lett. 2006; 12(5):12–5.

Received 13.11.2013