

ГІСТОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ СТРУКТУР ГАНГЛІОЗНОГО ШАРУ СІТКІВКИ В РАННІ ТЕРМІНИ ПІСЛЯ ВНУТРІШНЬОЧЕРЕВНОГО ВВЕДЕННЯ МЕТАНОЛУ

ДУ «Інститут очних хвороб і тканинної терапії
ім. В.П. Філатова НАМН України» (м. Одеса)

elmicroscop@gmail.com

Дана робота є фрагментом НДР «Особливості впливу метанолу на ультраструктуру елементів хоріоретинального комплексу тканин ока щурів», № держ. реєстрації 0114U0048.

Вступ. Відомо, що алкоголізм є серйозною проблемою людства і відноситься до досить поширеної патології [1, 4, 6]. Вживання спиртних напоїв у великих дозах, або їх зловживання призводить до ураження життєво важливих органів і втягує в патологічний процес, в першу чергу, тканини головного мозку і органу зору, особливо сітківку і диск зорового нерва [2, 8]. Крім того, в літературних джерелах вказується, що хронічне вживання алкоголю призводить до ураження кровоносних судин мозку, що також ускладнює перебіг дистрофічного процесу в нервових клітинах [5, 8]. Однією з найсерйозніших небезпек широкого вживання алкоголю населенням полягає в тому, що значна частина напоїв з вмістом спирту, містить сурогати, які є токсичними продуктами і можуть приводити до патологічних та генетичних змін в організмі людини [1]. до токсичних домішок, присутніх в алкогольних напоях, в першу чергу, відносять метанол, потім ацетальдегід та інші. Останнім часом стали широко використовувати метанол в якості різних домішок до горючо-мастильних речовин, в лакофарбовій промисловості, на бензоколонках і інш. Клінічними роботами було показано, що при отруєнні метанолом в першу чергу знижується гострота зору, тобто пошкоджується сітківка і зоровий нерв [8]. Біохімічні дослідження на експериментальних тваринах показали, що метанол швидко всмоктується з травного тракту, повільно виводиться з організму. Мурашина кислота та іони формиату, що утворюються в результаті розщеплення метанолу, блокують SH-групи опсину. Нами знайдена незначна кількість робіт останніх років, присвячених вивченню морфологічних змін і біохімічних показників в сітківці і зоровому нерві людини і тварин, викликаних дією метанолу [2, 6, 7, 8]. Крім того, в літературних джерелах нами не знайдено морфологічних відомостей стосовно впливу мінімальних доз метанолу, що викликають структурні зміни органів, зокрема, очей, у експериментальних тварин. Стосовно щурів відомо, що максимальна літальна доза при внутрішньочеревному введенні метанолу становить 9,5 г/кг маси тіла.

Нами започатковані дослідження по вивченню впливу різних доз метанолу на тканини ока щурів. Ра-

ніше нами опубліковані дані стосовно ультраструктурних змін в хоріоретинальному комплексі [3]. Які викликані невеликою дозою метанолу.

Метою даного дослідження стало світло-електронно-мікроскопічне вивчення змін структур гангліозного шару сітківки в ранні терміни після внутрішньочеревного введення метанолу.

Об'єкт і методи дослідження. Робота виконана на 20 дорослих щурах лінії Вістар масою 250 – 300 г, розділених на 2 групи: I-я – дослідна, в якій щурам внутрішньочеревно, одноразово вводили метанол з розрахунку 0,75 г/кг маси тіла. У даній статті представлені дослідження впливу метанолу в мінімальній дозі, що викликає у щурів зміни, які не визначаються на світлооптичному рівні. Доза метанолу підбиралась, узгоджуючи з публікацією [7]. II-а група – контрольні тварини, яким вводили фізіологічний розчин в еквівалентному об'ємі. Вивчався матеріал через 40 хв., 1 час 20 хв., 1, 3, 7 і 14 добу після введення метанолу.

Утримання тварин та експерименти проводилися відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 2005), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених П'ятим національним конгресом з біоетики (Київ, 2013).

Досліджувались структури гангліозного шару сітківки ока: гангліозні клітини (ГК) і відростки мюллеровських клітин (ВМЮК). Для проведення дослідження шматочки тканин заднього відділу ока фіксувались в 2,5% розчині глутаральдегіду на фосфатному буфері при значенні рН 7,4 з наступною дофіксацією 1% розчином осміевою кислоти при тому ж рН буферного розчину. Потім тканини зневоднювались в спиртах висхідної концентрації. Матеріал заливали в суміш Епон-аралдіт. Оглядові напівтонкої препарати для світлооптичного дослідження фарбували 1% розчином метиленового синього. Ультратонкі зрізи контрастували розчинами ураніацетатом і цитрату свинцю. Вивчались і фотографувались об'єкти в електронному мікроскопі ПЕМ-100-01.

Результати досліджень та їх обговорення. Світлооптичні дослідження, на напівтонких препаратах, в шарі ГК сітківки, показали, що в перші терміни, через 40 хв. і 1 час 20 хв. після введення метанолу, в ГК і ВМЮК суттєвих змін не спостерігалось, тоді як починаючи з 1-ї до 14-ї доби відмічалось просвітлення

цитоплазми в дрібних ГК і на 14 добу в ряді великих ГК також відзначались елементи набряку цитоплазми.

При електронно-мікроскопічному дослідженні через 40 хв. і 1 час 20 хв. Ультраструктура ГК і ВМЮК не відрізнялась від норми. В деяких ГК спостерігалось підвищення кількості структур, які приймають участь в білок синтезуючій функції, тобто елементів зернистої ендоплазматичної сітки (ЗЕС), вільних рибосом і полісом. При цьому частина мітохондрій мали зменшену кількість крист, що, можливо, пов'язано з підвищеною витратою енергії на внутрішньоклітинні синтетичні процеси. У ВМЮК відзначалось розширення частини елементів гладкої ендоплазматичної сітки (ГЕС) (рис. 1).

Через 1 добу в шарі ГК спостерігалися неоднорідні зміни. Серед великих ГК частина клітин була зі збільшеним числом цитоплазматичних структур, інша частина – з вогнищевими просвітленнями цитоплазми і помірною кількістю органел, переважно на периферії клітини. У таких ГК відзначалась альтерація частини мітохондрій. У виявлених у цьому шарі дрібних ГК відзначались значні внутрішньоклітинні деструктивні процеси, які супроводжувались практично повним руйнуванням органел і спустошенням цитоплазми (рис. 2).

У той же час у ВМЮК, оточуючих великі ГК, зміни стосувались лише мітохондрій, в них визначалось просвітлення внутрішньомітохондріального матриксу і вогнищева деструкція крист. Однак у частини ВМЮК, які контактували з дрібними ГК, виявлялись ознаки набряку цитоплазми, розширення профілів деяких елементів ГЕС і більш виражені явища альтерації мітохондрій.

В період з 3 по 7 добу після введення метанолу стан дрібних ГК та ВМЮК, не відрізнявся від такого, який був описаний в попередньому терміні (рис. 3).

У великих ГК залишався той самий характер змін, який відзначався в попередньому терміні. Однак спостерігалось менше клітин із збільшеним вмістом ци-

топлазматичних органел і в той же час в більшій мірі в клітинах виявлялась альтерація мітохондрій, зменшення кількості елементів ЗЕС, а в тих елементах ЗЕС, які визначались виявлялась дегрануляція їх мембран (рис. 4).

В той же час частина ВМЮК, що безпосередньо не контактують з ГК, мали структуру близьку до нормальної або містили підвищену кількість елементів ГЕС і великих мітохондрій в стані набухання.

Через 14 дів в шарі ГК до змін, які спостерігались у дрібних ГК приєднувались більш виражені альтераційні зміни у великих ГК. У них посилювались явища набряку цитоплазми і деструкції цитоплазматичних органел. Тільки в навколо ядерної області цих клітин виявлялися поодинокі елементи ЗЕС з дегрануляцією мембран і розширенням їх профілів, а також спостерігалась вакуолізація мітохондрії з деформацією їх зовнішньої мембрани. У цитоплазмі з'являлися мієліноподібні тільця і обривки мембран. Периферія клітин була повністю спустошена. ВМЮК, які контактують з ГК, були в значній мірі змінені. В них визначалось просвітлення цитоплазматичного матриксу і зменшення елементів ГЕС. В поодиноких мітохондріях, які тут спостерігались, була виражена вакуолізація з деструкцією крист

Аналіз результату дослідження показав, що у відповідь на токсичний вплив метанолу, структури шару ГК відповідали лише з 1-ї доби спостереження і, в першу чергу, підлягали впливу дрібні ГК, а також ВМЮК, які оточують ці ГК. В той же час великі ГК відрізнялись збільшенням кількості внутрішньоклітинних органел, тобто в ГК відбувалось посиленням білоксинтезуючої діяльності. Однак в динаміці (до 14 доби) деструктивні зміни внутрішньоклітинних структур шару ГК сітківки наростали, що, очевидно, пов'язано з токсичним впливом метанолу на досліджувані структури. У ВМЮК спостерігався поліморфізм змін в діапазоні від спустошення цитоплазми у одних клітин і ознак

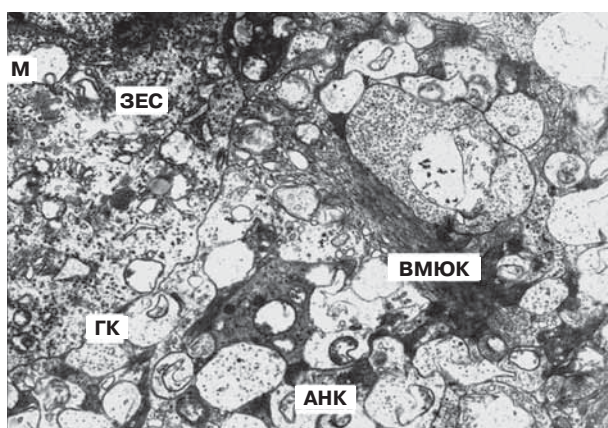


Рис. 1. 40 хвилин після одноразового внутрішньочеревного введення метанолу. Структури шару гангліозних клітин сітківки в нормальному стані.
Електронна мікрофотографія. X 6 000.
Умовні позначення: ГК – гангліозна клітина, ЗЕС – зерниста ендоплазматична сітка, М – мітохондрія, ВМЮК – відросток мюллеровської клітини, АНК – аксони нервових клітин.

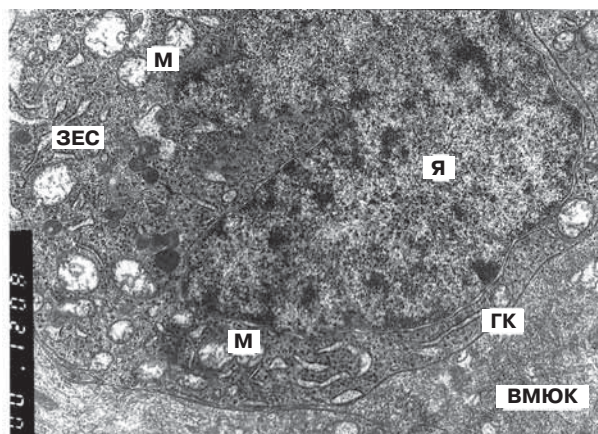


Рис. 2. 1-а доба після одноразового внутрішньочеревного введення метанолу. Гангліозна клітина з великою кількістю білоксинтезуючих органел і ядром.
Електронна мікрофотографія. X 8000.
Умовні позначення: ГК – гангліозна клітина, ЗЕС – зерниста ендоплазматична сітка, М – мітохондрія, ВМЮК – відросток мюллеровської клітини.

активації і відновлення внутрішньоклітинної діяльності у інших. У літературі є дані про шкідливу дію цього фактору на мембрани клітин [2]. Крім того, як показали наші попередні дослідження [3], метанол викликає суттєві зміни ультраструктури хоріокапілярів і елементів зовнішніх шарів сітківки, що не могло, звичайно, не відобразитись і на стані її внутрішніх шарів. В наукових джерелах описані зміни реологічних властивостей крові, деструкція білків, пошкодження формених елементів крові під впливом великих доз алкоголю [2, 5, 8]. Односпрямовані зміни, очевидно, відбувались і в хоріокапілярах після введення нами незначної дози метанолу, тобто в дозі 0,75 г/кг маси тіла, що в подальшому відобразилось і на ультраструктурі сітківки.

Таким чином, дослідження показали, що навіть порівняно невелика доза метанолу проявляла токсичну дію на сітківку, викликаючи цілий ряд ультраструктурних змін в ГК і ВМЮК, незважаючи на ознаки компенсаційно-відновних процесів, які спостерігались паралельно в цих клітинах.

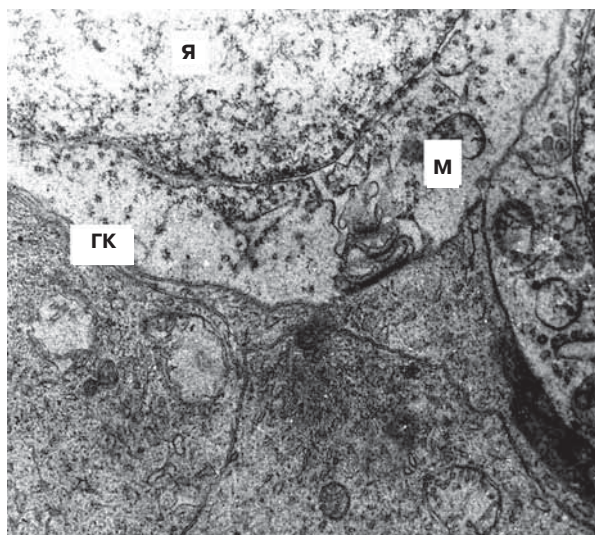


Рис. 3. 3-я доба після одноразового внутрішньочеревного введення метанолу. Дрібна гангліозна клітина з, практично, спустошеною цитоплазмою. Відростки мюллеровських клітин з набряком внутрішньомітохондріального матриксу і деструкцією крист.

Електронна мікрофотографія. Х 6 000.

Умовні позначення: ГК – гангліозна клітина, ЗЕС – зерниста ендоплазматична сітка, М – мітохондрія, ВМЮК – відросток мюллеровської клітини.

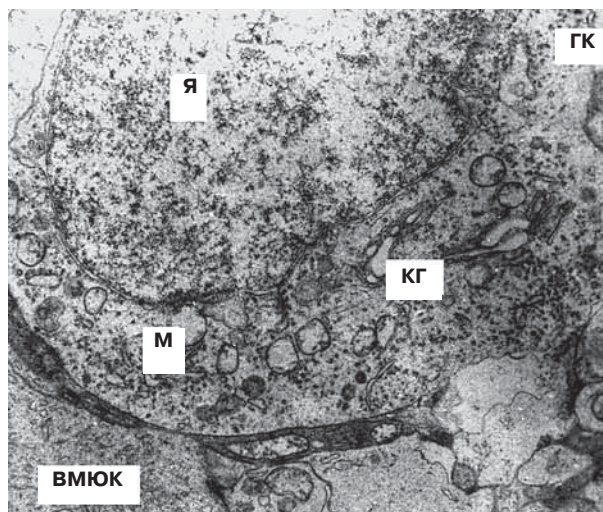


Рис. 4. 7 діб після одноразового внутрішньочеревного введення метанолу. Гангліозна клітина з електронно-світлою цитоплазмою і нуклеоплазмою. Різко знижений вміст елементів зернистої ендоплазматичної сітки.

Електронна мікрофотографія. Х 4 000.

Умовні позначення: ГК – гангліозна клітина, ВМЮК – відросток мюллеровської клітини, Я – ядро, М – мітохондрія, П – полісоми.

Література

1. Битенский В.С. Роль алкоголизма и наркомании в демографическом кризисе в Украине / В.С. Битенский // 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 / Л.С. Долматова, В.В. Ромашина / 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 / Н.Е. Думброва, Н.И. Молчанюк // Офтальм. журн. – 2009. – № 5. – С. 54-57.
4. Серов В.В. Влияние острого отравления метанолом на перекисное окисление липидов и концентрацию в крови кортикостерона / В.В. Серов, П.Ф. Забродский, В.Ф. Киричук / Вестник новых медицинских технологий. – 2007. – Т. XIV, № 1. – С. 81-86.

5. Солонский А.В. Развитие сосудов мозга эмбрионов и плода человека в условиях пренатального воздействия алкоголя / А.В. Солонский, С.В. Логвинов, Н.А. Кутепова // Морфология. – 2007. – Т. 131, № 2. – С. 63-66.
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 [и др.] // Украинский нейрохирургический журнал. – 2004. – № 3. – С. 97-102.
7. Rajamani R. Oxidative stress induced by methotrexate alone and in the presence of methanol discrete regions of the rodent brain, retina and optic nerve / R. Rajamani, A. Muthuvel, M. Senthilvelan [et al.] // Toxicol. Lett. – 2006. – Vol. 12, № 5. – P. 12-15.
8. Treichel J.L. Retinal toxicity in methanol poisoning / J.L. Treichel, T.G. Murray, T.C. Burton [et al.] // Retina. – 2004. – Vol. 24. – P. 309-312.

УДК 617.735-006.484+547.261-092.4

ГИСТОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ СТРУКТУР ГАНГЛІОЗНОГО ШАРУ СІТКІВКИ В РАННІ ТЕРМІНИ ПІСЛЯ ВНУТРІШНЬОЧЕРЕВНОГО ВВЕДЕННЯ МЕТАНОЛУ

Молчанюк Н. І.

Резюме. Світлооптично і електронно-мікроскопічно досліджувалися гангліозні клітини і відростки мюллеровських клітин сітківки щурів в ранні терміни (від 40 хв. до 14 діб) після одноразового внутрішньоочеревинного введення метанолу в дозі 0,75 г/кг маси тіла. В результаті проведеного дослідження показано, що реакція гангліозних клітин полягала в активації функціонування в початкові терміни спостереження (40 хв. і 1 ч. 20 хв.), що змінилася структурними ознаками внутрішньоклітинних деструктивних змін, які наростали в динаміці (до 14 діб). Однонаправлені зміни визначалися в контактуючих з гангліозними клітинам відростках мюллеровських клітин.

Ключові слова: гангліозні клітини, сітківка, відростки мюллеровських клітин, світлооптичні і ультраструктурні дослідження, метанол.

УДК 617.735-006.484+547.261-092.4

ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУР ГАНГЛИОЗНОГО СЛОЯ СЕТЧАТКИ В РАННИЕ СРОКИ ПОСЛЕ ВНУТРИБРЮШИННОГО ВВЕДЕНИЯ МЕТАНОЛА

Молчанюк Н. И.

Резюме. Светооптически и электронномикроскопически исследовались ганглиозные клетки и отростки мюллеровских клеток сетчатки крыс в ранние сроки (от 40 мин. до 14 суток) после однократного внутрибрюшинного введения метанола в дозе 0,75 г/кг массы тела. В результате проведенного исследования показано, что реакция ганглиозных клеток заключалась в активации функционирования в начальные сроки наблюдения (40 мин. и 1 ч. 20 мин.), сменявшаяся структурными признаками внутриклеточных деструктивных изменений, которые нарастали в динамике (до 14 суток). Однонаправленные изменения определялись в контактирующих с ганглиозными клетками отростках мюллеровских клеток.

Ключевые слова: ганглиозные клетки, сетчатка, отростки мюллеровских клеток, светооптические и ультраструктурные исследования, метанол.

UDC 617.735-006.484+547.261-092.4

Histological Analysis of Retinal Ganglionic Layer Structures in Early Time after Intraperitoneal Administration of Methanol

Molchanyuk N.I.

Abstract. The purpose of the research is light-and electron microscopic study of early retinal ganglionic layer structures lesions after intraperitoneal administration of methanol.

Methods and Materials. 20 Wistar senior rats, weighted 250-300 g, have been involved into study. The rodents were assigned into 2 groups. Animals from Group I (experimental) were single time administered with 0.75 g/kg methanol intraperitoneally. The paper considers the analysis of methanol effect in minimal doze, resulted in changes which do not detected on the photooptical level in rats.

Results and Discussion. The analysis of findings showed that the retinal ganglionic layer structures responded to methanol toxic effect only from day 1 of the observation; small ganglionic cells (GCs), as well as the Muller's cell processes (MCPs) were affected first. At the same time great GCs differed in increased number of intracellular organelles due to protein synthesis intensification. However, the lesions of intracellular retinal ganglionic layer structures increased dynamically (to day 14) that is apparently connected with methanol toxic effect on structures under study. Polymorphism of lesions has been noted in MCPs, within the rates from cytoplasm depletion in one cells to features of activation and restoration of intracellular activity in the other ones. The publications show the evidence of hazardous impact of this factor on cell membranes. Moreover, our previous investigations showed that methanol causes significant changes in ultrastructure of choriocapillaries and elements of retinal outer layers, inevitably affecting the state of its inner layers, too. The scientific studies describe changes of blood rheological properties, protein destruction, blood corpuscles impairments under the effect of high dozes of alcohol. Apparently, unidirectional lesions occurred in choriocapillaries, too, after administration of minor doze of methanol, i.e., 0.75 g/kg rat body mass, followed up by the affection of retinal ultrastructure.

Therefore, the study showed that even the relatively small dose of methanol had a toxic impact on retina, causing a number of ultrastructural changes in GCs and MCPs regardless the features of concurrent compensating restorative processes, detected in these cells.

Conclusions. Methanol in relatively small dose (0.75 g / kg rat body weight) caused lesions in retinal ganglionic cells and the Muller's cell processes. The response of ganglionic cells was in activation of functioning in early time of observation (40 min and 1 hr and 2 min), changing by structural features of intracellular lesions, increasing dynamically (to day 14).

Unidirectional lesions were detected in the Muller's cell processes, contacting ganglionic cells.

The data provided in the paper are the initial stage of the study of methanol impact on eye tissues. The further research will encompass more extensive and profound analysis of the toxic factor effect on the eye nerve structures, allowing to obtain more complete view of the nature of detected ultrastructural lesions in retina and facilitate representation of structural mechanisms of the alcohol effect on visual analyzer.

Keywords: ganglionic cells, retina, Muller's cell processes, photooptical and ultrastructural studies, methanol.

Рецензент – проф. Єрошенко Г.А.

Стаття надійшла 11.07.2015 р.