

Ранні зміни в ультраструктурі та показниках енергетичного обміну в зоровій корі щурів під впливом малої дози метилового спирту

Н.І. Молчанюк, І.М. Михейцева, С.Г. Коломійчук

ДУ «Інститут очних хвороб і тканинної терапії ім. В.П. Філатова НАМН України», Одеса;
e-mail: elmicroscop@gmail.com

З часом збільшилась кількість отруєнь метиловим спиртом. Насамперед він впливає на зоровий аналізатор, що призводить до погіршення гостроти зору або його втрати. Доволі мало відомостей стосовно ультраструктурних змін у цій зоровій системі при застосуванні незначної дози метанолу, що дасть можливість уявити механізми розвитку патологічного процесу в ній та сприяти прицільному використуванню належних лікарських засобів. Метою нашого дослідження було вивчення ультраструктурних змін у зоровій корі щурів та показників її енергетичного стану протягом тижня після одноразової внутрішньоочеревинної ін'єкції метанолу в дозі 0,75 г/кг. Встановлено, що в перші 3 год після його введення у зоровій корі спостерігалися реактивні зміни у відростках нервових та гліальних клітин, розташованих навколо капілярів, тоді як біохімічні показники функціонального стану мітохондрій практично не змінювалися. З 1-ї доби спостереження відбувалися зміни в нервових та гліальних клітинах, які проявлялись явищами гідропічної дистрофії, що призводило до розладу їх функціонування, до порушення проведення нервового імпульсу та до дефіциту поживних речовин у нервових клітинах через дисфункцію мітохондрій та безпосередню дію метанолу і продуктів його розпаду. До 7-ї доби в зоровій корі розширювалися ділянки із патологічними змінами, збільшувалися набрякові і деструктивні зміни та погіршувався енергетичний її стан. Паралельно в частині нервових клітин була підвищена кількість полісом, що носить компенсаторно-відновний характер. Таким чином, незначна доза метанолу викликає суттєві порушення функціональної діяльності структур зорової кори починаючи з 1-ї доби спостереження з подальшим прогресуванням до 7-ї доби.

Ключові слова: зорова кора; ультраструктура; АТФ; мітохондріальні ферменти; метанол.

ВСТУП

Метиловий спирт (метанол) є надто токсичною речовиною, однак його все частіше використовують у різних сферах нашого життя. Все більше зустрічається випадків отруєння людей, які були інтоксиковані парами метанолу, або вони проникали крізь шкіру при довготривалій роботі тощо [1–4]. За результатами наукових клінічних досліджень, при гострому отруєнні метанолом постраждалі відчувають часткову або повну втрату зору в результаті структурних та функціональних змін в головному мозку та органі зору, що підтверджують результати комп'ютерної та магнітно-резонансної

томографії, зокрема, реєструється оптична нейропатія та зміни в сітківці [1, 5–7]. Аналогічні зміни спостерігаються при застосуванні щурам великих і середніх доз метанолу [6, 8]. Метанол та продукти його розпаду, формальдегід та мурашина кислота, здебільшого впливають на енергетичні процеси в мітохондріях, викликаючи їх пошкодження та розлад внутрішньоклітинних реакцій, які потребують АТФ. Це призводить до системної гістотоксичної гіпоксії та до метаболічного ацидозу [1, 9, 10]. Раніше ми вивчали ультраструктурні зміни в тканинах ока щурів при застосуванні різних доз метанолу та визначали початкові зміни в судинній і сітчастій оболонках, в ендотелі-

альних клітинах судин та капілярів хоріоїдеї і в пігментному епітелії сітківки, а також у великих мієлінізованих аксонах нервових волокон та гліальних клітинах зорового нерва шурів [11, 12].

Метою нашої роботи було дослідження ранніх (протягом тижня) ультраструктурних та біохімічних змін у зоровій корі білих шурів після внутрішньоочеревинної ін'єкції малої дози метанолу.

МЕТОДИКА

Дослідження проведено на 40 дорослих щурах лінії Вістар масою від 250 до 300 г, які були розподілені на 2 групи. До дослідної групи ввійшли щури, яким одноразово внутрішньоочеревинно вводили метанол із розрахунку 0,75 г/кг маси тіла, розрахований його об'єм розводили навпіл з водою для ін'єкцій. Тваринам контрольної групи внутрішньоочеревинно вводили воду для ін'єкції аналогічним об'ємом, що і розчин метанолу. Ефект ЛД₅₀ для шурів при внутрішньоочеревинній ін'єкції метанолу становить 9,5 г/кг [13].

Роботи з щурами та виведення їх із досліду відбувалися згідно з «Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986). Стаття розглянута на біотичному комітеті інституту та отримала позитивне рішення щодо опублікування (протокол № 3, 19.05.2025 р.)

Для проведення ультраструктурного дослідження шматочки зорової кори фіксували в 2,5%-му розчині глютаральдегіду на фосфатному буфері при значенні рН 7,4 з наступною дофіксацією у 1%-му розчині осмієвої кислоти при тому самому рН буферного розчину. Потім зразки зневоднювали в спиртах висхідної концентрації. Матеріал просочували та занурювали в суміш епоксидних смол епон-аралдит. Методика обробки зразків для ультраструктурного дослідження докладно описана раніше [14]. Зорову кору шурів вивчали із застосуванням

електронного мікроскопа ПЕМ-100-01 (Україна) через 70 хв, 3 год, 1, 3 та 7 діб після ін'єкції рідин.

Біохімічні показники енергетичного обміну в мітохондріях зорової кори досліджували також у вищевказані строки. Для цього спочатку виділяли органели на холоді ($0 \pm 4^\circ\text{C}$). Тканини зорової кори подрібнювали та гомогенізували у скляному гомогенізаторі із тефлоновим поршнем у середовищі виділення, що містило (моль/л) сахарози – 0,25, тріс-НCl – 10 і етилендіамінтетраоцтової кислоти (EDTA) – 1 з рН 7,3. Цитозольні та мітохондріальні фракції розділяли диференціальним центрифугуванням (5 хв при 750g і 10 хв при 10,000g, двічі), отриманий осад мітохондрій суспендували в середовищі виділення. Перед аналізом до осаду мітохондрій, виділених з 1 г тканини додавали 1 мл 0,1%-го розчину детергенту тритон X-100. Суспендували в скляному гомогенізаторі, залишаючи на 30 хв на льоду.

У мітохондріях визначали активність сукцинатдегідрогенази та цитохромоксидази, тоді як вміст АТФ досліджували в надосадовій рідині (цитозольній фракції), отриманій після виділення мітохондрій. Метод визначення активності сукцинатдегідрогенази базується на відновленні фериціаніду калію, розчин якого має жовте забарвлення, до безбарвного фероціаніду калію сукцинатом під дією сукцинатдегідрогенази. Активність ферменту пропорційна кількості відновленого фериціаніду, яку досліджували при довжині хвилі 420 нм [15]. Принцип методу визначення активності цитохромоксидази полягає в окисненні N,N-диметилпарафенілендіаміну ферментом, в результаті чого утворюється пігмент з максимумом поглинання при довжині хвилі 510 нм, у кількості, пропорційній цитохромоксидазній активності [16]. При взаємодії гліцерат-3-фосфату з АТФ за участю ферменту фосфогліцераткінази утворюється гліцерат-1,3-фосфат, який відновлюється НАДН у гліцеральдегідфосфатдегідрогеназній реакції, а зміна оптич-

ної густини розчину при довжині хвилі 340 нм пропорційна вмісту АТФ [17]. Оптичну густину вимірювали на спектрофотометрі Spekol 210 (Німеччина). Статистичний аналіз біохімічних досліджень здійснювали з програмним забезпеченням JASP з використанням середньої величини (М) і стандартної похибки середніх (m). Для оцінки відмінностей між двома групами було застосовано критерій t Стюдента. Достовірними вважали зниження при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У перші години дослідження після ін'єкції метанолу зорова кора відреагувала незначним набряком нервових та гліальних клітин, особливо ці зміни стосуються їх відростків, які оточують капіляри. Самі капіляри відрізняються від таких у контрольній групі лише підвищеною щільністю плазми крові.

Надалі (1–3-тя доба) після введення метанолу поступово наростали деструктивні зміни в зоровій корі: розширюється її площа із набряком відростків нервових клітин та залученням мієлінізованих аксонів. У них деформувалась і розшарувалась ламелі у мієліновій оболонці, а також визначався набряк аксоплазми, рихлість нейрофіламентів та зменшення їх кількості і також осередкова деструкція крист мітохондрій. У перикаріоні нервових клітин спостерігали набряк каріоплазми та гіалоплазми і зменшення вмісту органел. У частині нервових клітин визначали явища хроматолізу. Водночас окремі нервові клітини перебували в стані метаболічної активності. Вони мали підвищений вміст полісом, мітохондрій і гіпертрофований комплекс Гольджі. У гліальних клітинах набряк цитоплазми був не тільки у відростках, але й розповсюджувався на їх тіла, з проявами альтеративних змін мембранних органел. В ендотеліальних клітинах мікросудин наявні реактивні зміни в мітохондріях, осередкове просвітлення цитоплазми, а з

часом поглиблення патологічних змін в органелах.

Через 7 діб після введення метанолу в структурах зорової кори прогресували гідропічні зміни, з залученням все більших її ділянок. У нейропілі спостерігалися безструктурні ділянки із зруйнованих груп та поодиноких нервових відростків або їх гомогенізація. У перикаріоні нервових клітин та в цитоплазмі визначалися більш глибокі деструктивні зміни. У мікросудинах з електронно-щільною плазмою ендотеліальні клітини були також з дегенеративними змінами органел. Окремі мікросудини мали електронно-прозорий просвіт та деструкцію мембранних органел в ендотеліальних клітинах. Це свідчить про тромбоз у попередніх їх відділах, що також негативно впливає на структурний та функціональний стан компонентів зорової кори (рис. 1; 2, а, б).

Біохімічні дослідження показали (таблиця), що в перші години після введення метанолу активність мітохондріальних ферментів зорової кори суттєво не змінювалася порівняно з контролем. Лише через добу активність цитохромоксидази в зоровій корі була достовірно знижена на 30,5%, а через 7 діб на 47,4% відносно контрольних значень, а активність сукцинатдегідрогенази в ній

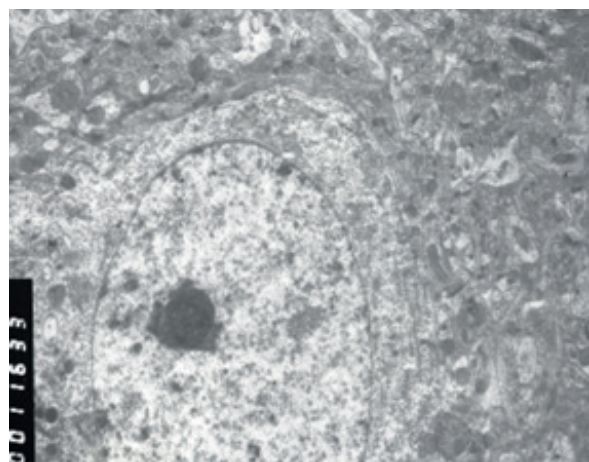


Рис. 1. Зорова кора (ЗК) шура контрольної групи через 70 хв. Нервова клітина (НК) та структури нейропілі (Н) в нормальному стані. Збільшення у 5 000 разів

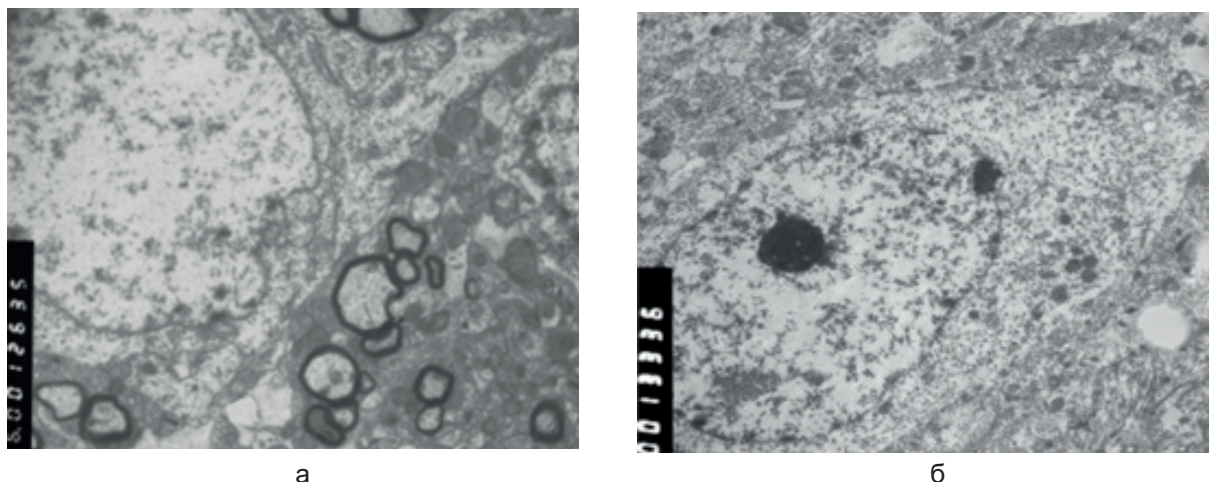


Рис. 2. Зорова кора (ЗК) шура через 70 хв та 7 діб після внутрішньоочеревинної ін'єкції метанолу (0,75 г/кг). На а – патологія мітохондрій нервової клітини (НК), просвітлення аксоплазми нервових волокон. Збільшення у 4 000 разів. На б – набряк каріоплазми та цитоплазми нервової клітини з деструкцією частини внутрішньоклітинних структур, гомогенізація елементів нейропілія (Н). Збільшення у 6 000 разів

достовірно знижувалася на 35,8% через добу і на 38,9% через 7 діб. При цьому значення показника енергетичного обміну – макроерга АТФ у шурів за умов токсичної дії метанолу через добу в зоровій корі було знижено на 25,7% і через 7 діб на 34,4% порівняно з контролем ($P < 0,05$).

Таким чином, отримані результати свідчать, що вже у перші години після внутрішньоочеревинного введення малої дози метанолу в структурах нейропілія зорової кори, які межують із капілярами, виникають гідропічні зміни. Ймовірно, вони зумовлені проникненням метанолу крізь ендотелій мікросудин та пошкодженням його ультраструктури, що

надалі призводить до ураження інших елементів зорової кори. Такі порушення викликають дисбаланс обмінних процесів між капілярами та відростками нервових і гліальних клітин, зміни аксоплазматичного транспорту та розлади синаптичної передачі нервового імпульсу.

Підвищена електронна щільність плазми крові в капілярах відображає накопичення речовин ліпідної природи, які появились в результаті токсичної дії як на структури крові, так і на мембрани ендотеліальних клітин капілярів, а потім і на інші структури зорової кори.

Нами також виявлено, що серед органел в клітинах зорової кори альтеративним змінам насамперед підлягають мітохондрії, що

Активність цитохромоксидази і сукцинатдегідрогенази (нкат/г тканини) та вміст АТФ (мкмоль/г тканини) у зоровій корі шурів після впливу метанолу ($M \pm m$; $n = 7$ на кожний строк)

Показники	Контроль	Введення метанолу		
		70 хв	24 год	7 діб
Цитохромоксидаза	254,12 $\pm$ 14,12 100%	221,84 $\pm$ 12,16 87,2%	176,61 $\pm$ 9,34* 69,5%	133,67 $\pm$ 7,14* 52,6%
Сукцинатдегідрогеназа	58,45 $\pm$ 2,03 100%	50,03 $\pm$ 3,28 85,6%	37,52 $\pm$ 2,23* 64,2%	28,41 $\pm$ 1,15* 48,6%
АТФ	2,18 $\pm$ 0,16 100,0%	1,96 $\pm$ 0,14 89,9%	1,62 $\pm$ 0,12* 74,3%	1,43 $\pm$ 0,08* 65,6%

$P < 0,05$ відносно контролю.

також корелює з даними інших дослідників, які вивчали зміни в нервових волокнах зорового нерва та сітківці [5, 7, 9]. У нашій роботі показано не тільки ультраструктурні пошкодження мітохондрій клітин зорової кори мозку щурів на ранніх строках отруєння метанолом, але й на молекулярному рівні доведено зниження продукції мітохондріями «енергетичного палива клітин» АТФ, що також підтверджується іншими авторами [9, 16]. Крім того, було встановлено суттєве зниження активності ферментів внутрішньої мембрани мітохондрій – сукцинатдегідрогенази та цитохромоксидази. Ці ферменти відіграють ключову роль у дихальному ланцюгу мітохондрій, їх активність забезпечує синтез молекул АТФ в процесі окисного фосфорилування, який здійснюється на внутрішній мембрані цих органел [10].

Результати нашого дослідження показали, що після одноразового внутрішньоочередового введення метанолу в зоровій корі відбуваються суттєві патологічні зміни з першої доби. Вони проявляються розвитком дистрофічних процесів у нервових та гліальних клітинах з альтерацією їх внутрішньоклітинних структур, що надалі призводить до розладу функціональної їх активності. В результаті порушується або блокується проведення нервового імпульсу, транспорту поживних речовин до нервових клітин та змінює взаємовідносини нервових і гліальних клітин. У постраждалих людей з метаноловим отруєнням це проявляється зниженням або втратою зору в перші 3 доби [5, 6, 8, 10]. Як свідчать наші експериментальні результати, зміни в зоровій корі прогресують до 7-ї доби спостереження із руйнуванням структур нейропіля та наростанням патологічних змін у її клітинах.

ВИСНОВКИ

1. Внутрішньоочередовна ін'єкція щурам метанолу в дозі 0,75 г/кг у період від перших

години до 7-ї доби дослідження викликало в структурах зорової кори прогресуючу гідропічну дистрофію з розвитком дегенеративних внутрішньоклітинних процесів, з розширенням площі її ушкодження, включаючи капіляри. Виявлені структурні зміни нервового апарату зорового аналізатора призводять до розладу його функціонування та порушення зору.

2. Введення зазначеної дози метанолу (0,75 г/кг) щурам викликало порушення енергетичного стану тканини зорової кори. На відрізок часу від одної до 7 діб після застосування отруйної речовини встановлено динамічне зниження активності мітохондріальних ферментів сукцинатдегідрогенази та цитохромоксидази, а також вмісту АТФ.

**N.I. Molchaniuk, I.M. Mikheyetseva,
S.G. Kolomiychuk**

EARLY CHANGES IN THE ULTRASTRUCTURE AND INDICATORS OF ENERGY METABOLISM IN THE HUMAN CORTEX UNDER THE INFUSION OF A SMALL DOSE OF METHYL ALCOHOL

*State Institution "The Filatov Institute of Eye Diseases and Tissue Therapy of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Odesa;
e-mail: elmicroscop@gmail.com*

Ultrastructural changes in the visual cortex of rats and the energy state of its mitochondria were studied during the week after a single intraperitoneal injection of methanol at a dose of 0.75 g/kg of their body weight was found that reactive changes in the structures of the visual cortex, located around the capillaries, began in the first hours after methanol injection, with insignificant changes in mitochondrial biochemical markers. From the 1st day of observation, changes occurred in nerve and glial cells, which were manifested by the phenomena of hydropic dystrophy, which led to a disorder of their functioning, to a violation of the conduction of nerve impulses and to a deficiency of nutrients in nerve cells due to mitochondrial dysfunction and the direct effect of methanol and its decomposition products on these components of the visual cortex. By the 7th day of the study, areas with pathological changes in the visual cortex were expanded, edematous and destructive changes increased in them, and the energy state decreased. At the same time, the number of polysomes increased in some nerve cells, which is of a compensatory and restorative nature. Key words: visual cortex; ultrastructure; ATP; mitochondrial enzymes; methanol.

REFERENCES

1. Sun Q, Sun M, Zhang Y, Wang S, Bai W, Wei S et al. Clinical characteristics of methanol-induced optic neuropathy: correlation between aetiology and clinical findings. *J Ophthalmol*. 2022;4671671 <https://doi.org/10.1155/2022/4671671>
2. Figuerola B, Mendoza A, Roca M, Lacorzana J. Severe visual loss by inhalation of methanol. *Rom J Ophthalmol*. 2021 Apr-Jun;65(2):176-9.
3. Ma Z, Jiang H, Wang J. Clinical analysis of severe visual loss caused by inhalational methanol poisoning in a chronic process with acute onset: a retrospective clinical analysis. *BMC Ophthalmol*. 2019;1(19):124.
4. Mojica CV, Pasol EA, Dizon ML, Kiat WA, Tru L, Dominguez JC, Tuaño, et al. Chronic methanol toxicity through topical and inhalational routes presenting as vision loss and restricted diffusion of the optic nerves on MRI: a case report and literature review. *Neurolog Sci*. 2020; 20.
5. Işık B, Ersoz MG, Dokur M, Yıldız, İslamoğlu MS. Novel optical coherence tomography findings in a patient with methanol toxicity: a case report. *Arq Bras Ophthalmol*. 2024; 87(3): 1-2 e20220068
6. Setiohadji B. The superoxide dismutase mimetic tempol and its effect on retinal ganglion cells in experimental methanol-intoxicated rats. *Ophthalmol Ther*. 2018 Jun;7(1):167-72.
7. Icel E, Suleyman H, Yazici GN, Bakan N, Sunar M. Effects of adenosine triphosphate on methanol-induced experimental optic nerve damage in rats: Biochemical and histopathological evaluation. *Cutan Ocul Toxicol*. 2020 Sep;39(3):244-8.
8. Tashly NG, Chimen FK, Karakurt Y, Uchak T, Mamedov R, Suleiman B, et al. Protective effects of rutin against methanol induced acute toxic optic neuropathy: An experimental study. *Int J Ophthalmol*. 2018;11(5):780-5.
9. Ahiskali I, Pinar CL, Kiki M, Cankaya M, Kunak CS, Altuner D. Effect of taxifolin on methanol-induced oxidative and inflammatory optic nerve damage in rats. *Cutan Ocul Toxicol*. 2019; 38(4):384-9.
10. Liberski S, Kaluzny BJ, Kocięcki J. Methanol-induced optic neuropathy: A stil-present problem. *Arch Toxicol*. 2022 ;96:431-51.
11. Dumbrova NE, Molchaniuk NY. Ultrastructural changes of elements of the optic nerve of rats in dynamics after the action of methanol. *Ophthalmol J*. 2010; 2: 64-66.
12. Molchanyuk NI. Light and electron microscopic study of choriocapillaries, pigment epithelium and photoreceptor cells of the rat retina in dynamics after administration of different doses of methanol. *Bull Taras Shevchenko Natl Univ Kyiv. Probl Regul Physiol Funct*. 2015;1(18):74-8.
13. McGreen MJ, Hunt WA. *Methanol environmental health criteria*. Geneva: WHO, 1997.
14. Mikheytsseva I, Molchanuk N, Amayed A, Kolomiichuk S, Siroshtanenko T. Features of ultrastructural changes in the neurosensory elements of the retina of rats in the modeling of diabetic retinopathy on the background of axial myopia. *Fiziol Zh*. 2024; 70(1):31-6.
15. Ahmad F, Alamoudi W, Haque S, Salahuddin M, Alsaman K. Simple, reliable, and time-efficient colorimetric method for the assessment of mitochondrial function and toxicity. *Bosn J Basic Med Sci*. 2018;18(4):367-74.
16. Ribalchenko VK, Koganov MM. Structure and functions of membranes. Kyiv: Vishcha School, 1988.
17. Javorek D, Gruber W, Bergmeyer HU. Adenosin-5'-triphosphat. Bestimmung mit 3-phosphoglycerat-Kinase. In: Methoden der enzymatischen analyse. Herausgegeben von HU. Bergmeyer. B. III. - Berlin: Akademie – Verlag; 1970.

Матеріал надійшов
до редакції 01.07.2025