

УДК 617.73-07:615.9:547.261:615.456.032.381:611.018.8.013

Электрофизиологические и морфологические показатели состояния зрительного анализатора в динамике применения Трофина при интоксикации метанолом

Цымбалюк В.И., Носов А.Т., Чеботарева Л.Л., Васюта В.А.

Институт нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова АМН Украины, г. Киев
Национальный медицинский университет им. акад. А.А. Богомольца МЗ Украины, г. Киев

На основании анализа результатов экспериментальных исследований проведено сопоставление электрофизиологических и морфологических показателей морфофункциональной активности зрительного анализатора крыс при интоксикации метанолом с последующим применением Трофина.

Установлено, что при введении животным метанола возникали выраженные дистрофически-деструктивные изменения структуры зрительного анализатора, что подтверждено данными электрофизиологических исследований зрительных вызванных потенциалов (ЗВП), в которых показано, что нарушение структуры сетчатки, зрительного нерва и затылочной доли коры большого мозга способствует прогрессирующему увеличению латентного периода и снижению амплитуды потенциала действия зрительного анализатора.

Введение животным после интоксикации метанолом Трофина способствовало восстановлению структурной целостности зрительного анализатора с нормализацией латентного периода и амплитуды его действия, начиная с 14-х суток применения Трофина.

Ключевые слова: *сетчатка, зрительный нерв, кора затылочной доли, зрительные вызванные потенциалы, интоксикация метанолом, Трофин, электронная микроскопия.*

В последнее время наблюдают значительное увеличение частоты отравления алкоголем и его суррогатами. Одно из основных мест занимает отравление метиловым спиртом, который в процессе преобразования превращается в формальдегид и муравьиную кислоту — продукты летального синтеза [1, 2, 4, 5, 12]. Известна тропность метанола к зрительному анализатору: при поражении метанолом происходит демиелинизация зрительного нерва [9]; по данным экспериментальных и патологоанатомических исследований выявляют также некротические изменения [10–12, 14]. В митохондриях сетчатки нарушаются процессы окислительного фосфорилирования [3]. Возникают значительные морфологические изменения в зрительном анализаторе: генерализованный отек сетчатки, дистрофически-деструктивные изменения в ее нервном аппарате, волокнах зрительного нерва, нейронах затылочной доли коры большого мозга [7].

Проведение дезинтоксикационной терапии при отравлении метанолом способствует лишь частичному восстановлению зрительных функций.

В последнее время как в экспериментальной, так и практической медицине широко используют эмбриональную нервную ткань, в которой содержится большое количество биологически активных веществ, стадийспецифических белков, цитокинов, нейротрофических факторов, в значительной степени повышающих пролиферативную активность дистрофически-измененных клеток, обладающих антибактериальным и обезболивающим действием,

способствующих процессам внутриклеточной репаративной регенерации [1–4].

Наряду с трансплантацией эмбриональной нервной ткани, в клинической практике и в эксперименте все чаще используют клеточные суспензии или вытяжки из эмбриональной ткани, которые имеют ряд преимуществ по сравнению с фрагментами эмбриональной ткани: 1) возможно точно определить объем и жизнеспособность клеток; 2) более низкая иммуногенность; 3) минимальная травматичность процедуры; 4) возможность повторных инъекций; 5) более длительное хранение [13].

Одной из таких вытяжек из эмбриональной нервной ткани является препарат Трофин (патент Украины № 237663 А от 16.06.98), изготовленный в Институте нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова АМН Украины, который прошел клиническую апробацию в восстановительной нейрохирургии (при детском церебральном параличе, ишемическом инсульте, черепно-мозговой травме, паркинсонизме, рассеянном склерозе) [6, 8].

Поскольку Трофин представляет собой экстракт биологически активных водорастворимых молекул эмбрионального мозга и является биологическим стимулятором клеточных процессов, он активизирует репаративные процессы в нервной ткани и препятствует возникновению дистрофических процессов.

Целью работы была оценка эффективности применения Трофина в эксперименте у животных с интоксикацией метанолом.

Материалы и методы исследования. Экспериментальные исследования проведены у 40 крыс линии Вистар массой тела 200–250 г. Поражение зрительного анализатора моделировали путем внутрибрюшинного введения метилового спирта в дозе 1,8 г на 1 кг массы тела, предварительно разведенного в изотоническом растворе натрия хлорида до 1 мл. У 20 животных после интоксикации метанолом применяли Трофин внутрибрюшинно в дозе 0,2 мл, разведенный в изотоническом растворе натрия хлорида до 1 мл. Инъекцию Трофина повторяли через 3 сут.

Для записи ЗВП использовали анализатор вызванных потенциалов “B.A.S.I.S.E.M.P.” (ESA OTE Biomedica, Италия). Электрофизиологическое исследование проводили под внутрибрюшным наркозом смесью калипсола и реланиума в изотоническом растворе натрия хлорида (соответственно 5 мг на 100 г и 1 мг на 100 г массы тела). Животное фиксировали в положении лежа на животе на специальном штативе. ЗВП регистрировали с помощью платиновых игольчатых электродов, которые закрепляли под апоневрозом в затылочной области — активный электрод (с двух сторон), в теменной области — референтный электрод (с двух сторон), заземление — на ушной раковине. Использовали бинокулярную стимуляцию вспышками белого света с длиной волны 640 нм, интенсивностью 600 мКд, мощностью 0,25 Дж, длительностью 1 мс. Светодиодную лампу располагали на расстоянии 15 см. ЗВП регистрировали при чувствительности 10 мкВ/дел, 2 мс/дел, полосе частот 0,5–100 Гц, числе усреднений 252. ЗВП регистрировали на 7, 14-е и 30-е сутки исследования.

Электронно-микроскопическое исследование проводили после умерщвления животных путем передозировки наркозной смеси калипсола и реланиума. Фрагменты ткани сетчатки, зрительного нерва и затылочной доли коры головного мозга размером 1 мм после декапитации животных фиксировали в смеси 4% параформальдегида, 2,5% глутаральдегида и 4% сахарозы на фосфатном буфере pH 7,4 с последующей дофиксацией в 1% растворе осмиевой кислоты. Затем кусочки ткани обезвоживали в

спиртах возрастающей концентрации и оксипропилене. Препараты заливали в смесь эпоксидных смол (эпон-аралдит) по стандартным методам обработки материала для электронно-микроскопического исследования. Ультратонкие срезы толщиной 60 мкм изготавливали с помощью ультратомов ЛКБ и Рейхардт. Для повышения контрастности ультратонкие срезы окрашивали по Рейнтгольдсу и просматривали в электронном микроскопе EM-400 фирмы Phillips (Голландия).

Для прицельного ультратомирования и более углубленной оценки полученных данных с эпоксидных блоков изготавливали полутонкие срезы толщиной 100 мкм, окрашивали метиленовым синим-пиронином и просматривали в светоптической микроскопе.

Результаты и их обсуждение. У интактных крыс (контрольная группа параметры ЗВП составляли: латентный период N1 — $(25,2 \pm 2,5)$ мс, N2 — $(57,0 \pm 3,5)$ мс, P2 — $(75,0 \pm 4,4)$ мс при амплитуде потенциала действия зрительного анализатора для N — $(10,4 \pm 1,6)$ мкВ, P2 — $(7,4 \pm 1,3)$ мкВ. Эти показатели функциональной активности зрительного анализатора использовали в работе в качестве контрольных и учитывали во всех группах животных: после интоксикации метанолом и после применения Трофина.

У животных после интоксикации метанолом параметры ЗВП (латентный период и амплитуда) достоверно отличались от данных контроля.

На 7-е сутки исследования показатель N1, который является началом ответа на зрительный раздражитель, составил $(33,3 \pm 3,0)$ мс. Наиболее выраженные изменения латентного периода наблюдали на 14-е и 30-е сутки после введения животным метанола, его значения превышали контрольные показатели почти в 1,7 раза и составляли соответственно $(40,1 \pm 3,5)$ и $(42,1 \pm 4,0)$ мс (см. таблицу).

При изучении параметра N2, который является результатом стимуляции желтого пятна сетчатки и регистрации импульсов в 17-м поле по Бродману, изменения выявлены уже на 7-е

ЗВП у крыс после интоксикации метанолом

Группы животных	Латентность ЗВП, мс			Амплитуда ЗВП, мкВ	
	N1	N2	P2	N2 (N75)	P2 (P100)
Контроль (n=10)	25,2±2,5	57,0±3,5	75,0±4,4	10,4±1,6	7,4±1,3
Метанол 7 сут	33,3±3,0	72,0±3,8*	95,0±5,4	6,1±1,1	5,1±1,1
Метанол 14 сут	40,1±3,5*	96,9±5,5 ^Δ	120,0±8,4**	5,4±1,2	3,0±1,2
Метанол 30 сут	42,1±4,1*	113,3±8,5 ^Δ	128,8±9,4	2,3±0,8	1,7±0,6
Трофин 7 сут	30,3±2,8	72,04±4,0*	93,7±5,0*	6,0±1,4*	4,1±1,1*
Трофин 14 сут	33,1±2,6*	70,7±4,8*	92,0±5,6*	8,1±1,6	4,6±1,2
Трофин 30 сут	30,2±2,4	60,5±4,0 ^Δ	90,0±5,4*	9,2±1,5	5,8±1,3

Примечание. Различия показателей достоверны по сравнению с таковыми: * — в контроле; ** — на 7-е сутки исследования; ^Δ — на 14-е сутки

сутки после введения метанола. При этом время проведения нервного импульса по структурам зрительного анализатора увеличилось по сравнению с контрольным показателем почти в 2 раза. Амплитуда потенциала действия зрительного анализатора снизилась по сравнению с таковой в контроле более чем в 4,5 раза. Достоверные изменения латентного периода и амплитуды потенциала действия наблюдали между 14-ми и 30-ми сутками после введения животным метанола, что свидетельствовало о существенных изменениях функции зрительного анализатора в динамике патологического процесса и полностью соответствовало данным морфологического исследования структурных элементов сетчатки и зрительного нерва.

По данным электронно-микроскопического исследования в структуре нервного аппарата сетчатки в эти сроки наблюдения отмечены выраженные дистрофически-деструктивные изменения нервных элементов сетчатки с поражением структуры фоторецепторных, биполярных и ганглиозных клеток. В большинстве фоторецепторных клеток (рис. 1), наблюдали деструкцию наружного сегмента фоторецепторов (НСФ), а в ганглиозных клетках (ГК) сетчатки – деструкцию внутриклеточных органелл и основной массы аксонов, формирующих зрительный нерв (рис. 2). В структуре зрительного нерва выявлены дистрофически-измененные миелиновые волокна (МВ) с разволокнением миелиновой оболочки, неравномерным ее утолщением и натеками нейроплазмы, что, несомненно, обуславливало нарушение проводимости нервного импульса по аксонам ГК (рис. 3)

Параметр P2, максимальный по значению ЗВП, который отражает генерацию импульсов в 17-м и 18-м полях (по Бродману), значительно изменялся на 14-е и 30-е сутки. Так, на 30-е сутки латентный период потенциала действия был увеличен по сравнению с таковым в кон-

троле в 1,7 раза. При этом амплитуда ЗВП по сравнению с таковой в контроле снизилась в 4,35 раза. Важным является то, что наиболее выраженные изменения латентного периода и амплитуды потенциала действия зрительного анализатора наблюдали после 14-х суток, а наиболее выраженные деструктивные изменения наблюдали в синаптическом аппарате (СА) нейронов, где происходило нарушение целостности пресинаптических окончаний с деструкцией активной синаптической зоны и синаптических везикул (рис. 4).

Таким образом, у животных после интоксикации метанолом ЗВП изменялся по всем изучаемым параметрам: увеличивался латентный период, снижалась амплитуда, что обусловлено дистрофически-деструктивными изменениями зрительного анализатора и способствовало значительному ухудшению зрения.

У животных, которым после интоксикации метанолом назначали Трофин, отмечены следующие изменения параметров ЗВП. Достоверные изменения N1 по сравнению с контролем выявляли на 14-е сутки лечения. Показатель был в 1,3 раза выше такового в контроле. Через 30 сут лечения изменения показателя не были достоверными относительно контрольного уровня.

Параметр N2 был достоверно выше такового в контроле через 7 и 14 сут применения Трофина у животных после интоксикации метанолом соответственно в 1,26 и 1,24 раза. Через 30 сут лечения этот показатель параметра N2 был близок к контрольному и отличался от него лишь в 1,06 раза.

Амплитуда потенциала действия зрительного анализатора была в 1,7 раза ниже, чем в контроле только через 7 сут лечения с применением Трофина, через 14 и 30 сут лечения изменения показателя по сравнению с таковым в контроле были недостоверными.

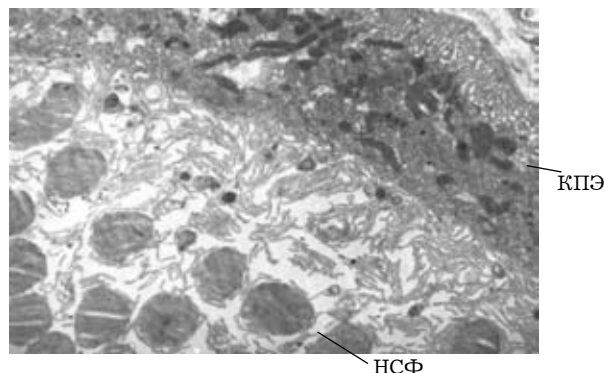


Рис. 1. Электронограмма. Сетчатая оболочка глаза крысы через 7 сут после введения метанола. Разрушение части наружного сегмента фоторецепторных клеток. Умеренно выраженный отек клетки пигментного эпителия (КПЭ). Ув. 13 000.

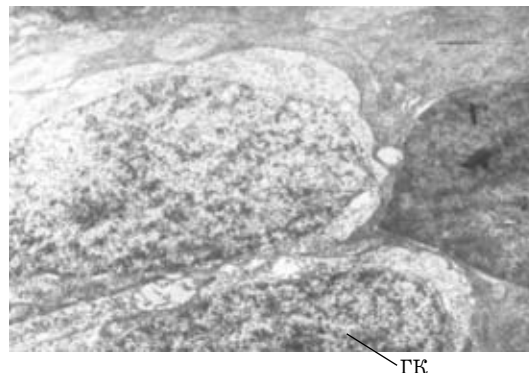


Рис. 2. Электронограмма. Сетчатая оболочка глаза крысы через 7 сут после введения метанола. Отек и умеренно выраженные дистрофически-деструктивные изменения в ГК сетчатки. Ув. 13 000.

По данным электронно-микроскопического исследования сетчатой оболочки глаза крыс под влиянием Трофина, начиная с 7–14-х суток наблюдали восстановление структурной целостности нейронов сетчатки, прогрессирование процессов внутриклеточной репаративной регенерации, восстановление структуры митохондрий, повышение активности рибосом

(рис. 5). При этом наиболее выраженные процессы внутриклеточной регенерации наблюдали в фоторецепторах, ГК и СА на 30-е сутки применения Трофина (рис. 6).

Изменения структуры зрительного нерва представлены активацией олигодендроглии (рис. 7) и восстановлением структуры миелиновых волокон, что, несомненно, способствовало

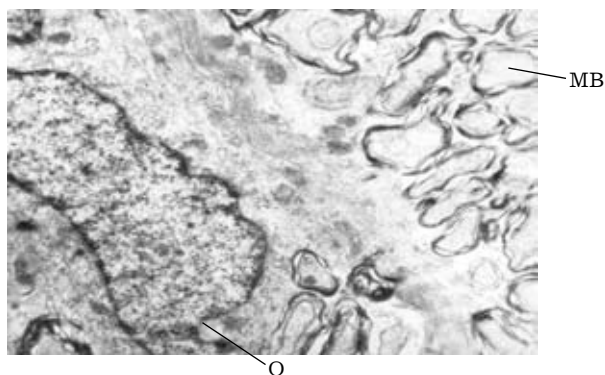


Рис. 3. Электронограмма. Дистрофические изменения МВ и олигодендроцитов (О) в структуре зрительного нерва через 30 сут после введения животным метанола. Ув. 13 000

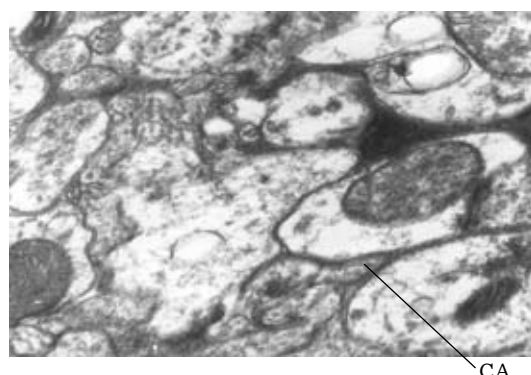


Рис. 4. Электронограмма. Дистрофические изменения СА нейронов затылочной области коры головного мозга крыс через 14 сут после введения метанола. Ув. 22 000

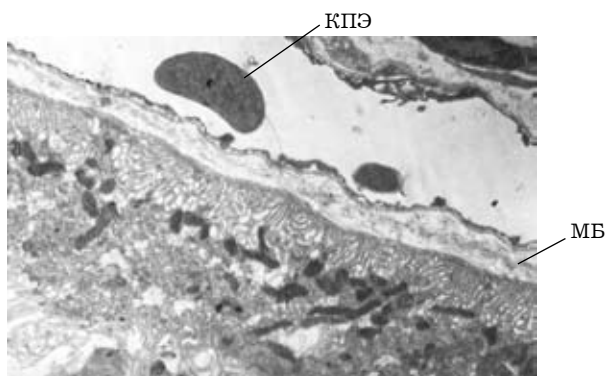


Рис. 5. Электронограмма. Функционально активная КПЭ, прилежащая к практически не измененной мембране Бруха (МБ), через 30 сут применения Трофина у животного после интоксикации метанолом. Ув. 13 000

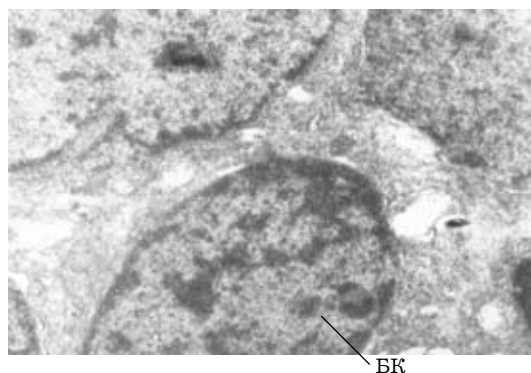


Рис. 6. Электронограмма. Биполярные клетки (БК) сетчатки в разных стадиях функциональной активности через 30 сут применения Трофина у животных после интоксикации метанолом. Ув. 13 000

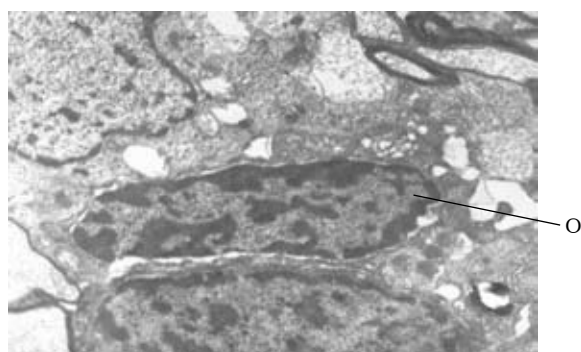


Рис. 7. Электронограмма. Гиперплазия О в зрительном нерве крысы через 14 сут применения Трофина у животных после интоксикации метанолом. Ув. 10 000

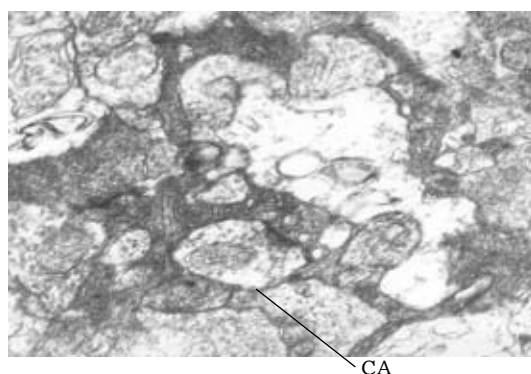


Рис. 8. Электронограмма. Функционально активный СА в нейронах затылочной доли коры головного мозга крыс через 30 сут применения Трофина у животных после интоксикации метанолом. Ув. 17 000

нормализации латентного периода и амплитуды потенциала действия пораженного метанолом зрительного анализатора.

Потенциал P2 был достоверно выше, чем в контрольной группе, во все сроки исследования. Наиболее выраженные изменения показателя определяли в первые 7 сут применения Трофина, когда он в 1,24 раза превышал контрольный уровень. Через 14 сут латентность снизилась, а через 30 сут — превышала контрольный уровень в 1,2 раза. При этом амплитуда ЗВП корковых отделов была достоверно снижена относительно контроля в 1,8 раза. Через 14 сут изменения этого показателя были незначительны (в 1,6 раза относительно контроля), на 30-е сутки — наблюдали повышение амплитуды, которая была однако ниже контрольного уровня в 1,27 раза. Данные электронно-микроскопического исследования подтверждены изучением структуры нейронов. В некоторых нейронах все еще наблюдали дистрофические изменения различной выраженности с деструкцией части внутриклеточных органелл и снижением белоксинтезирующей функции этих клеток, а также не полностью восстановленным СА нейронов (рис. 8).

Все это свидетельствовало о неполном восстановлении нейронов головного мозга крыс даже через 30 сут лечения после интоксикации метанолом с применением Трофина.

Выводы. 1. У животных после интоксикации метанолом отмечали удлинение латентного периода почти в 2 раза, снижение амплитуды потенциала действия зрительного анализатора в 4,5 раза по сравнению с этими показателями в контроле. Наиболее выраженные изменения латентного периода и амплитуды потенциала действия наблюдали на 14–30-е сутки после введения метанола.

2. Данные электронно-микроскопического исследования свидетельствовали об активизации процессов регенераторного характера в зрительном анализаторе под влиянием Трофина благодаря наличию в нем биологически активных водорастворимых молекул эмбрионального мозга, однако отмечено неполное восстановление СА, а в некоторых нейронах сохранились дистрофические изменения, что указывает на частичное улучшение морфологических параметров зрительного анализатора животных после применения Трофина.

3. У животных, которым после интоксикации метанолом внутривентриально вводили Трофин, выявляли уменьшение латентного периода и увеличение амплитуды ЗВП по сравнению с таковыми после интоксикации метанолом уже

начиная с 14-х суток; после двукратного внутривентриального введения Трофина латентный период и амплитуда ЗВП приближались к контрольным показателям, что свидетельствовало о восстановлении функциональной активности зрительного анализатора. Возможно, неповрежденные нейроны компенсаторно берут на себя функцию поврежденных, чем и обусловлено значительное улучшение ЗВП.

Список литературы

1. Бонитенко Ю.Ю., Ливанов Г.А., Бонитенко Е.Ю., Калмайсон М.А. Острые отравления алкоголем и его суррогатами (патогенез, клиника, диагностика и лечение). — СПб, 2000.
2. Интенсивная терапия. Реанимация. Первая помощь / Под ред. В.Д. Малышева. — М.: Медицина, 2000. — 463 с.
3. Лазарева Н.В. Вредные вещества в промышленности. — София, 1971. — 831 с.
4. Лужников Е.А. Клиническая токсикология. — М.: Медицина, 1999 — 414 с.
5. Маневич А.З., Плохой А.Д. Основы интенсивной терапии, реанимации и анестезиологии. — М.: Триада — X, 2000. — 379 с.
6. Патент 34141 А Украина. МПК А 61К 35/28. Спосіб отримання лікарського препарату з ембріонального мозку / Цимбалюк В.І., Васильєва І.Г. (Україна). — Заявл. 08.06.99; Опубл. 15.02.01 // Бюл. №1.
7. Радченко М.Р. Вплив аlogenної трансплантації ембріональної нервової тканини на морфофункціональний стан зорового аналізатора при отруєнні метиловим спиртом: Автореф. дис... канд. мед. наук.:14.01.18. — К., 2003. — 20 с.
8. Цимбалюк В.І., Лісяний М.І., Маркова О.В., Пічкур Л.Д. Результати хірургічного лікування експериментального алергічного енцефаломієліту // Трансплантологія. — 2003. — Т4, №1. — С.115–117.
9. Baumbach G., Cancilla P. et al. Methyl alcohol poisoning // Arch. Ophthalmol. — 1977. — V.95, N10 — P.1885–1898.
10. Baumbach G.L. Hayreh M. S., Hayreh S.S. et al. Methyl alcohol poisoning // Arch. Ophthalmol. — 1977. — V.95, N10 — P.1859–1865.
11. Gonzalez-Quevedo A., Orbejon F., Urbino M. et al. Effect of chronic methanol administration on amino acids and monoamines in retina, optic nerve and brain of the rat // Toxicol. Appl. Pharmacol. — 2000. — V.185, N2. — P.77–84.
12. Methanol. — Geneva: WHO, 1997. — 180 p. (WHO: Environmental Health Criteria; 196).
13. Schmidt R.H., Bjorklund A., Stenevi U. Intracerebral grafting of dissociated CNS tissue suspensions: a new approach for neuronal transplantation to deep brain tissue // Brain Res. — 1981. — V.218. — P.347–356.
14. Seme M.T., Summerfelt P., Neitz J. et al. Formate-induced inhibition of photoreceptor function in methanol intoxication // J. Pharmacol. Exp. Ther. — 1999. — V.289, N4. — P. 361.

Електрофізіологічні та морфологічні показники стану зорового аналізатора в динаміці застосування Трофіну при інтоксикації метанолом

Цымбалюк В.І., Носов А.Т., Чеботарьова Л.Л., Васюта В.А.

На основі аналізу результатів експериментальних досліджень співставлені електрофізіологічні й морфологічні показники морфофункціональної активності зорового аналізатора щурів при інтоксикації метанолом з наступним застосуванням Трофіну.

Встановлено, що при введенні тваринам метанолу виникали виражені дистрофічно-деструктивні зміни структури зорового аналізатора, що підтверджене даними електрофізіологічних досліджень зорових викликаних потенціалів, в яких доведено, що порушення структури сітківки, зорового нерва та потиличної частки кори головного мозку зумовлює прогресуюче збільшення латентного періоду і зниження потенціалу дії зорового аналізатора.

Введення тваринам після інтоксикації метанолом Трофіну сприяло відновленню структурної цілісності зорового аналізатора з нормалізацією латентного періоду і потенціалу його дії, починаючи з 14-ї доби застосування Трофіну.

Electrophysiological and morphological exponents of the visual analyzer condition in dynamics of the Trophin application in the methanol intoxication

Tsybalyuk V.I., Nosov A.T., Chebotareva L.L., Vasyuta V.A.

The comparing analysis of the electrophysiological and morphological exponents of the visual analyzer condition in rats of Trophin application.

It was determined that methanol makes degenerative-distrophical changes in the visual analyzer. It was confirmed with the help of visual evoked potentials which revealed that disturbances of the retina structure, visual nerve and occipital brain lead to prolongation of the latent period and decreasing of action potential.

Treating rats with the Trophin application promotes to restore the structure of visual analyzer and normalization of the visual evoked potentials from the 14 day after beginning of treatment.

Комментарій

к статье Цымбалюка В.И., Носова А.Т., Чеботаревой Л.Л., Васюты В.А. "Электрофизиологические и морфологические показатели состояния зрительного анализатора в динамике лечения Трофином при интоксикации метанолом"

Тяжесть последствий отравления метанолом, возникающего в большинстве своем в результате употребления суррогатов алкоголя и приводящих чаще всего к фатальному концу или же, "в лучшем случае", к полной утрате зрения, наряду с решением чисто социальных проблем профилактического плана обуславливает необходимость углубленного поиска методов лечения зрительных нарушений. В этом отношении предпринятое авторами статьи экспериментальное исследование результатов лечебного воздействия разработанного в Институте нейрохирургии препарата Трофин несомненно важно не только в чисто прикладном, но и в теоретическом плане. Предпринята попытка (на основании сопоставлений электрофизиологических и субмикроскопических исследований токсического действия метанола на различные звенья зрительного анализатора экспериментальных животных) выяснить результаты лечебного действия Трофина. Для исследований избраны сроки 7, 14 и 30 суток с момента затравки метанолом двух групп животных, подвергавшихся и не подвергавшихся лечебному действию Трофина. Электрофизиологические исследования зрительных вызванных потенциалов (ЗВП) свидетельствуют о терапевтическом эффекте Трофина на процессы функционального восстановления зрительного анализатора, пораженного метанолом, что находит свое подтверждение в положительных изменениях латентного периода и амплитуды ЗВП, установленных авторами в динамике эксперимента. Высказанное ими предположение о компенсаторном замещении нарушенных функций в известной мере подтверждается результатами морфологических исследований, в которых обнаружены в процессе лечебного действия Трофина на субмикроскопическом уровне признаки регенерации пораженных метанолом нейрональных структур зрительного анализатора.

Морфологическая часть исследования осуществлена лишь на субмикроскопическом уровне, иллюстрирована электрограммами и без дополнительных исследований на светооптическом уровне с использованием обзорных и, главное, специальных методик (окраска на миелин, серебрение, тионин) не позволяет достоверно судить о характере и степени поражения нейрональных структур звеньев зрительного анализатора и происходящих в них под действием Трофина регенераторных процессах. Изучение же лишь полутонких срезов, окрашенных метиленовым синим-пиронином, по нашему мнению, недостаточно. Исследования структурных изменений зрительного анализатора на светооптическом уровне позволили бы получить более полные и четкие представления об их объеме и характере.

В целом рассматриваемая работа затрагивает актуальные вопросы нейротоксикологии, которые несомненно интересуют как нейроофтальмологов, так и невропатологов, нейрофизиологов и, в известной степени, нейрохирургов.

*Профессор М.И.Шамаев
руководитель отдела нейропатоморфологии
Института нейрохирургии им.акад.А.П.Ромоданова АМН Украины*