

УДК 591.8:577.152.1]:591.463:591.044

## ГИСТОХИМИЯ NADPH-ДИАФОРАЗЫ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ САМЦОВ КРЫС В НОРМЕ И ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ НЕБЛАГОПРИЯТНЫХ ФАКТОРОВ

Дмитриева О.А., Шерстюк Б.В., Аверьянова Ю.А.

*Кафедра судебной медицины (зав.каф. – проф. Т.М. Федченко) Владивостокского государственного медицинского университета, Владивосток*

**В центральных и периферических отделах нервной системы, осуществляющих регуляцию копулятивной функции самцов крыс, широко представлены нервные клетки, обладающие активностью NADPH-диафразы. В переднем гипоталамусе они представлены нейронами двух типов (с высокой и низкой активностью), в боковых рогах тораколумбального отдела спинного мозга – нейронами с высокой активностью фермента. Высокая активность NADPH-диафразы выявлена также в вегетативных микроганглиях и нервных волокнах наружных и внутренних половых органов, а также – гладкомышечных элементах кавернозных тел. Активностью фермента в различной степени помимо вышеуказанных отделов обладают интерстициальные клетки семенных канальцев, эпителий концевых отделов и протоков простаты, семенных пузырьков, мочевыводящих путей. Под воздействием неблагоприятных (острый и хронический стресс, острая и хроническая алкогольная и наркотическая интоксикация) отмечено увеличение числа NADPH-реактивных структур и активности фермента в них.**

Копулятивный цикл находится под контролем ядер гипоталамуса, спинальных центров, нейроэндокринного аппарата половых органов. Важнейшую роль в регуляции половых функций занимает монооксид азота (NO) и ферменты его синтеза [10, 14, 17, 19]. Одним из специфических топахимических маркеров активности NO в тканях является NADPH-диафораза [1, 3, 4, 5, 12]. Возрастное снижение продукции NO в гипоталамусе, кавернозных телах приводит к ослаблению копулятивной функции грызунов [11, 12, 18]. Показана роль iNOS в развитии интракавернозного фиброза у стареющих грызунов, а также экспрессия фермента под влиянием никотина [20]. У мужчин сексуальные дисфункции возникают под влиянием целого ряда неблагоприятных факторов: психоэмоциональный стресс, табакокурение, алкогольная и наркотическая интоксикация [2]. Одним из звеньев патогенеза соматических нарушений при наиболее «злокачественной» форме наркоманий - эфедроновой наркомании, является интоксикация ионами марганца [7, 15]. Сведения об изменениях NO-реактивных структур копулятивной системы самцов под влиянием неблагоприятных факторов многочисленны и противоречивы [8, 9, 10, 16]. В на-

стоящей работе исследовали локализацию и активность NADPH-d репродуктивной системы самцов крыс в норме, а также при воздействии неблагоприятных факторов (стресс, алкогольная и марганцевая интоксикация) в условиях острого и хронического эксперимента.

Исследование выполнено на 18 грызунах (самцы белых крыс линии Wistar в возрасте 3-5 месяцев с массой тела 200 – 250г), разделённых на 6 групп и подвергнутых воздействию: а) острого (3) и хронического (3) холодового стресса (-20°, 20 мин. - однократно, а также ежедневно в течение 10 дней); б) острой (3) и хронической (3) алкогольной интоксикации (интрагастральное введение 20% этанола в дозе 9 г/кг – однократно, а также ежедневно в течение 14 дней); в) острой (3) и хронической (3) марганцевой интоксикации (интраперитонеальное введение хлорида марганца в дозе 150мг/кг – однократно, а также ежедневно в течение 14 дней). В качестве контроля использовали трёх животных того же возраста и массы. Эксперименты проведены в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». Предварительно анестезированных животных, забивали декапитацией. Исследовали крупноклеточные

ядра переднего гипоталамуса, тораколумбальный отдел спинного мозга, половые органы. На криостатных срезах проводили гистохимическую реакцию по выявлению NADPH-d (Hope, Vincent; 1989). Часть срезов докрашивали по Нисслю, квасцовым кармином. Метрические параметры NADPH-реактивных нейронов оценивали с применением видеокомпьютерной системы (микроскоп Carl Zeiss, компьютер Duron 750 Mb, графический редактор Jasc Paint Shop Pro 6.00, программа IMAGE PROCESSING TOOLBOX пакета MATLAB R12 version 6.0.88 (Mathworks, Inc) с применением ранговой и медианной фильтрации. Относительное количество NADPH-реактивных нейронов, оптическую плотность продукта гистохимической реакции выражали в % и условных единицах оптической плотности (ЕОП) соответственно. Математическая обработка полученных результатов проводилась методами вариационной статистики на компьютере IBM PC/AT с использованием профильного программного пакета GB STAT GRAPHIC.

*Гипоталамус.* В ядрах переднего гипоталамуса содержится различное количество (от 1-2 до 50%) нейронов, обладающих активностью NADPH-d. В отделах, содержащих низкое число клеток, они представлены крупными нейронами веретеновидной или полигональной формы с очень высокой активностью фермента. Продукт гистохимической реакции плотно заполняет цитоплазму, окрашивая её в интенсивно тёмно-синий цвет. На этом фоне иногда определяются контуры ядра, а также, в единичных нейронах, вакуоли и деформация клеточных тел. Преципитат, образующийся при гистохимической реакции, отчётливо маркирует несколько отростков нейронов на значительном протяжении. Отростки, как правило, имеют умеренно ветвящуюся или прямолинейную форму. NADPH-d, в виде густой сети, маркирует дистальные сегменты отростков нервных клеток с многочисленными синаптическими бляшками. При этом активность фермента по ходу отростков ниже, чем в синаптических бляшках. Активность фермента выявляется также в стенке сосудов, распределение продукта гистохимической реакции неравномерно в сосудах резистивного звена, где отмечается преимущественно продольная «исчерченность». Обменные микрососуды маркируются слабо (рис.1а). Вторым типом нейронов переднего гипоталамуса, обладающих активностью NADPH-d, являются клетки со средней и низкой степенью активности фермента. Размеры клеток

меньше, но их количество может достигать половины числа нейронов, формирующих ядро. Гранулы диформаза, оставляя свободной область ядра, бледно окрашивают цитоплазму и короткие отрезки проксимальной части отростков. Нейропил в таких ядрах не содержит интенсивно окрашенной сети отростков нейронов, вместе с тем более интенсивно диффузно окрашен (рис.1б). Эпендима желудочков мозга обладает низкой активностью NADPH. В белом веществе активность фермента самая низкая.

*Спинной мозг.* Тораколумбальный отдел спинного мозга крысы отличается высокой активностью NADPH-диафоразы задних и боковых рогов. Низкая и средняя активность фермента наблюдается в мотонейронах центральных и латеральных ядер передних рогов. В боковых рогах активностью обладают нейроны крупных размеров, полигональной формы. Гранулы формаза интенсивно окрашивают отростки нейронов на значительном протяжении боковых канатиков. Гомогенное отложение продуктов гистохимической реакции отмечается и в нейропиле латеральных ядер спинного мозга (рис. 1в).

*Интрамуральные микроанглии половых органов.* В клетчатке, наружной оболочке простаты, семенных пузырьков с постоянством обнаруживаются интрамуральные микроанглии, включающие в себя от 8 до нескольких десятков нейронов. Нейроны имеют крупные, средние и малые размеры с преобладанием двух последних. Среднее количество NADPH-позитивных нейронов в микроангилах составляет 57% (рис.1г).

*Периферические нервные элементы.* Высокая активность фермента обнаружена в нервах наружных половых органов. В составе нервных стволов встречаются широкие лентовидные NADPH-позитивные волокна и узкие, умеренно извитые. Активность фермента, как правило, высокая (рис.1д). Умеренная активность фермента отмечается в клетках Лейдига яичек, низкой активностью обладают эпителий мочевыводящих путей, эпителий протоков и концевых отделов предстательной железы и семенных пузырьков.

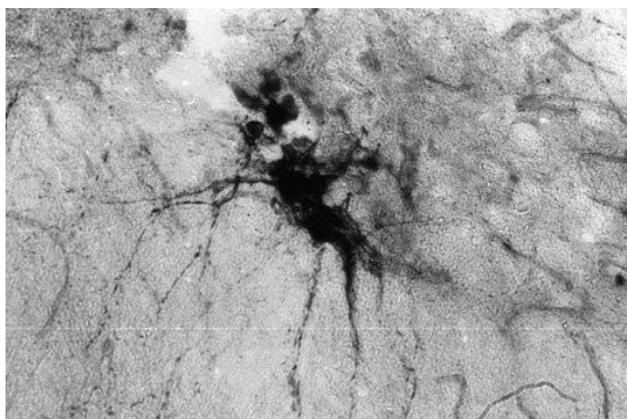
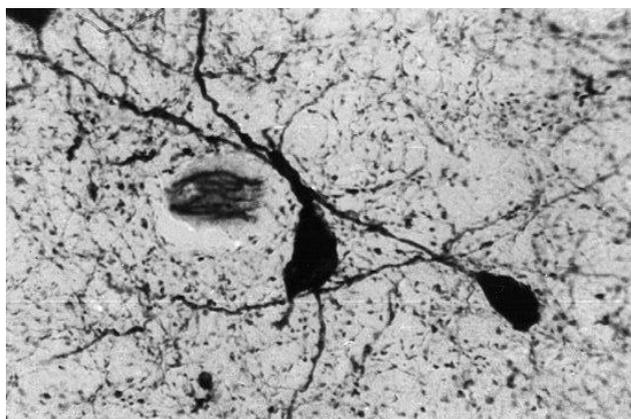
*Половой член.* Кавернозные тела представлены сосудами синусоидного типа, состоящими из трабекул, сформированных гладкомышечными клетками и соединительнотканью элементами. Наружный отдел кавернозных тел сформирован в виде слоя гладкомышечных клеток, ориентированных циркулярно и перпендикулярно продольной оси полового члена. Они обладают высокой активностью NADPH-d. Границы клеток

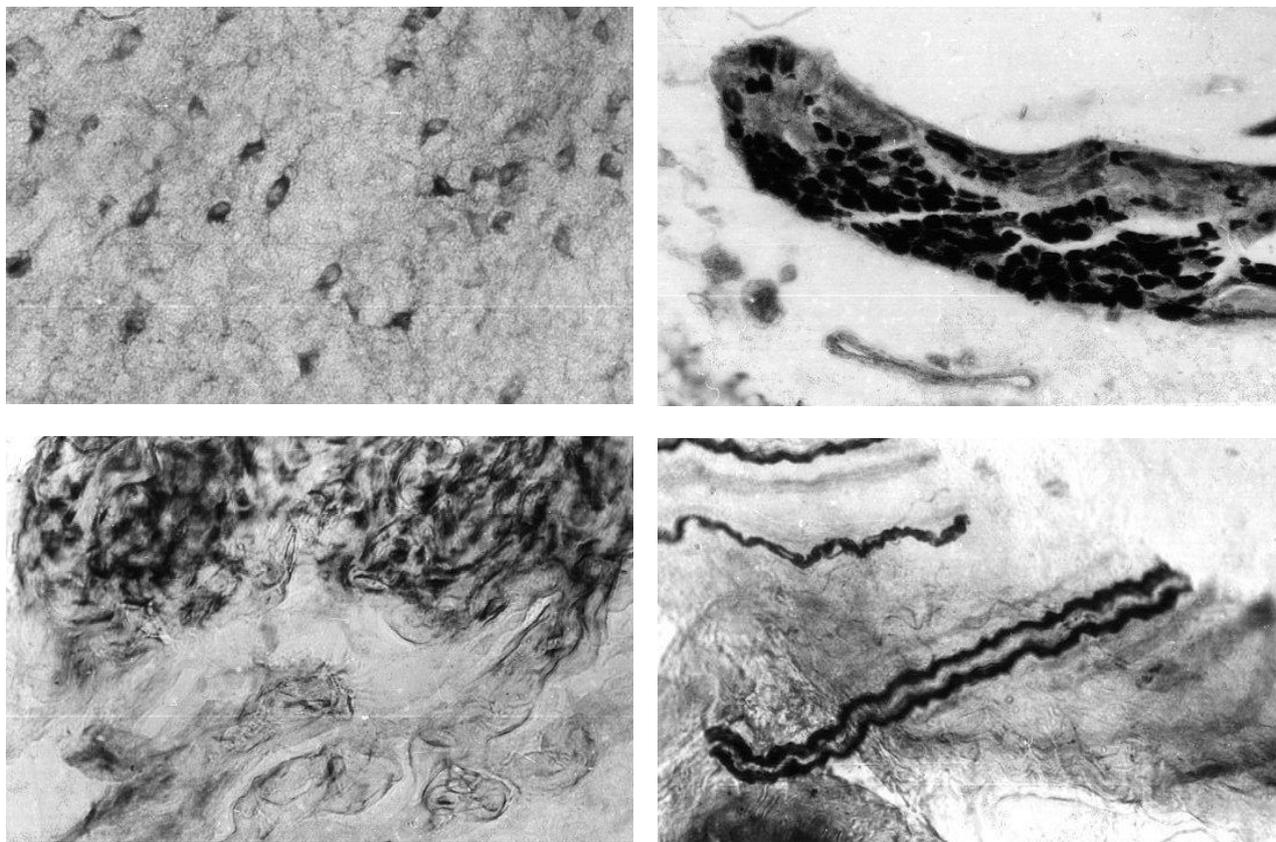
плохо различимы, ядра имеют крупные размеры. Продукт гистохимической реакции выявляется в цитоплазме клеток, а также внеклеточно, интенсивно окрашивая межклеточные пространства. В то же время, активность NADPH-d в клетках стенок синусоидных сосудов относительно низкая (рис.1e). Высокой активностью NADPH-d обладают базальные эпидермоциты кожи полового члена.

В экспериментальных исследованиях изменения активности NADPH-d и количества NADPH-позитивных нейронов носят односторонний характер и выражается в увеличении метрических параметров (рис.2). Под влиянием острого холодового стресса наблюдается увеличение активности NADPH-d нейронов гипоталамуса, боковых рогов спинного мозга, а также нейронов вегетативных ганглиев. При этом относительное количество нейронов изучаемых отделов увеличивается недостоверно ( $P>0.5$ ), а активность фермента достоверно ( $P<0.001$ ). Под действием хронического стресса увеличение числа нейронов и активности фермента было недостоверным ( $P>0.5$ ). Острая алкогольная и марганцевая интоксикация также вызывали недостоверное увеличение числа NADPH-позитивных нейронов и активности фермента ( $P>0.5$ ). Хроническая алкогольная и марганцевая интоксикация приводила к достоверному увеличению числа NADPH-позитивных нейронов и активности фермента ( $P<0.001$ ). Обсуждая роль и значение установленных в настоящем исследовании закономерностей, можно сделать вывод о широком представительстве NADPH-реактивных структур

во всех звеньях рефлекторной цепи регуляции половых функций самцов крыс. Можно отметить превышение количества NADPH-реактивных нейронов в вегетативных центрах по сравнению с неокортексом и спинальными ядрами передних рогов, а также высокий уровень ферментативной активности в нервных клетках периферических вегетативных ганглиев, нервных волокнах половых органов, гладкомышечных клетках кавернозных тел. Факт тесной взаимосвязи NADPH-d с циклом превращений NO в организме позволяет обсудить возможную роль и значение выявленного увеличения активности фермента под воздействием неблагоприятных факторов. Известно [3, 4, 5, 19], что активность таких ферментов, как ксантиноксидаза и NADPH-d, обуславливает синтез супероксида, в то время как монооксид азота синтезируется различными формами нитроксидсинтазы. В свою очередь, взаимодействие NO и супероксидного аниона может оказывать двойное действие, как цитопротективное, так и проапоптотическое. Конечный результат воздействия высокотоксичного пероксинитрита на ткани будет зависеть от количества восстановленного глутатиона в клетках и его способности предотвращать окислительный стресс.

Очевидно, что половые дисфункции, возникающие под влиянием целого ряда неблагоприятных факторов (стресс, алкогольная и наркотическая интоксикация) имеют тесную связь с метаболизмом NO в организме. Они могут носить функциональный характер и становиться необратимыми патологическими при определенных условиях.





**Рис 1.** NADPH-диафоразы центральных и периферических отделов репродуктивной системы самцов крыс. Метод Vincent, Норе.

А – нейроны с высокой активностью фермента; Б - нейроны с низкой активностью фермента;  
 В – нейроны боковых рогов спинного мозга; Г – нейроны вегетативного микроганглия;  
 Д – нервные волокна НПО; Е – гладкомышечные клетки наружной части кавернозных тел.  
 Увеличение: а, д, е - 400; б, в, г - 200.

**Таблица 1.** Метрические параметры NADPH-реактивных структур

| Исследуемый параметр                                | Исследуемый отдел | контроль | эксперимент |             |                          |             |                        |             |
|---|-------------------|----------|-------------|-------------|--------------------------|-------------|------------------------|-------------|
|   |                   |          | стресс      |             | Алкогольная интоксикация |             | Интоксикация марганцем |             |
|   |                   |          | острый      | хронический | острая                   | хроническая | острая                 | хроническая |
| относительное количество NO-ергических нейронов (%) | Гипоталамус       | 25±2.24  | 27±2.24     | 30±3.45     | 30±3.16                  | 52±3.12     | 31±3.17                | 63±4.50     |
|   | Спинной мозг      | 38±4.01  | 42±3.25     | 46±5.12     | 44±2.57                  | 60±4.20     | 40±3.84                | 71±2.50     |
|   | Ганглии           | 72±6.17  | 78±3.05     | 84±7.87     | 74±2.15                  | 83±1.14     | 76±1.55                | 86±2.12     |
| относительная активность NADP-диафоразы             | Гипоталамус       | 25±2.35  | 37±8.72     | 29±4.23     | 29±3.51                  | 61±2.13     | 33±1.44                | 49±4.41     |
|   | Спинной мозг      | 31±6.10  | 45±7.50     | 33±2.2      | 37±4.91                  | 49±4.47     | 36±2.32                | 44±4.55     |
|   | Ганглии           | 53±5.67  | 72±5.24     | 57±1.6      | 60±2.84                  | 74±4.24     | 59±3.91                | 71±1.53     |

## Литература

1. Дюйзен И.В., Мотавкин П.А., Шорин В.В. // Бюл.эксперим.биол.и мед. – 2001. – Т.132. – №9. – С.354-357.
2. Келли Г. Основы современной сексологии. – СПб: Питер. – 2000. – 896с.
3. Коржевский Д.Э., Отелин В.А. // Морфология. - 1996. - № . – С.37-40.
4. Маеда Х., Анаике Т. // Биохимия. – 1998. – Т.63. – Вып.7. – С.1007-1019.
5. Марков Х.М. // Вестник РАМН. – 1996. - №7. – С.73-78.
6. Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Охотина В.Е., Косицын Н.С. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих. М.:Наука, 1997. – 156с.
7. Шерстюк Б.В., Пиголкин Ю.И. // Судебно-медицинская экспертиза. – 1999. - №2. – С.29-32.
8. Banan A., Fields J.Z., Decker H., Zhang Y., Keshavarzian A. // J Pharmacol.and Exp.Ther. – 2000. – vol.294(3). – P.997-1008.
9. Bush P.A., Aronson W.J., Buga G.M., Rajfer J., Ignarro L.J. // J Urol . – 1992. – vol.147(6). – P.1650-5
10. Carrier S, Nagaraju P, Morgan DM, Baba K, Nunez L, Lue TF // J Urol. - 1997. – vol.157. – P.1088–1092
11. Ferrini M., Magee T. R., Vernet D., Rajfer J., González-Cadavid N. F. // Biol Reprod. - 2001. – vol.64. - P. 974-982
12. Ferrini M, Wang C, Swerdloff RS, Sinha Hikim AP, Rajfer J, Gonzalez-Cadavid NF. // Neuroendocrinology. - 2001. – vol. 74(1). – P.1-11.
13. Hope V.T., Vinsent S.R. // Hisochem.Cytochem. – 1989. – vol.37. – P.653-661.
14. Hung A, Vernet D, Rajavashisth T, Rodriguez JA, Rajfer J, Gonzalez-Cadavid NF // J Androl. - 1995. – vol. 16. – P.469–481.
15. Jason C.Y., Ling-Zhi L. // Mol.Brain Res. – 1999. – vol.68(1-2). – P.22-28.
16. Jun-Li C., Yin-Ming Z., Li-Cai Z., Shi-Ming D. // Acta physiol. – 2000. – vol.52(3). – P.235-238.
17. Magee T., Fuentes A.M., Garban H., Rajavashisth T., Marquez D., Rodriguez J.A., Rajfer J., Gonzalez-Cadavid N.F. // Biochem Biophys Res Commun. - 1996. – vol. 226(1). – P.145-151.
18. Garban H., Vernet D., Freedman A., Rajfer J., Gonzalez-Cadavid N.F. // Am J Physiol. - 1995. – vol. 268. – P.467.
19. Rajfer J., Aronson W.J., Bush P.A., Dorey F.J., Ignarro L.J. // New England J of Medicine. - 1992. – vol.328. – P.90-94.
- Xie Y., Garban H., Ng Ch., Rajfer J., Gonzalez-Cadavid N.F. // J Urol. - 1997. – vol. 157. – P.1121–1126.

### **Histochemistry NADPH- diaphorase reproductive system males rats in norm and at influence of adverse factors**

O.A.Dmitrieva, B.V.Sherstjuk, J.A.Aver'janova

In the central and peripheral departments of nervous system which are carrying out regulation sexual of function males of rats, are widely submitted the nervous cells having activity NADPH-diaphorase . In forward hypothalamus they are submitted neurons two types (with high and low activity), in lateral horns thoracicolumbar a department of a spinal cord - neurons with high activity of enzyme. High activity NADPH- d is revealed also in vegetaly microganglion and nervous fibres of external and internal genitals, and also - smooth-muscular elements cavernous bodies. Activity of enzyme in a various degree besides the above-stated departments possess interstitial cells testicle, epithelium trailer departments and channels prostate, seed vial, excretion ways. Under influence adverse (sharp and chronic stress, a sharp both chronic alcoholic and narcotic intoxication) is marked the increase of number of NADPH-jet structures and activity of enzyme in them.