

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 семенников, 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 центрами, 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.

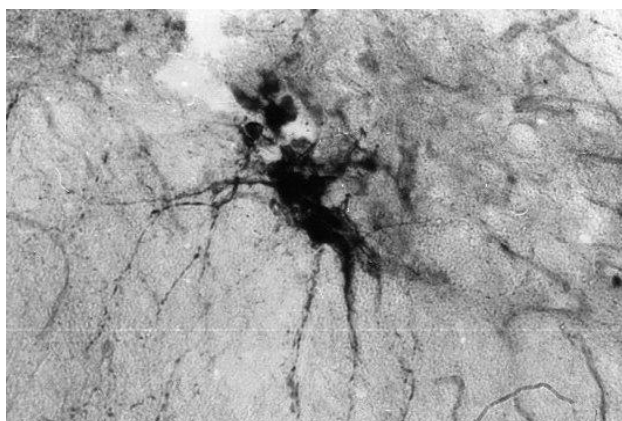
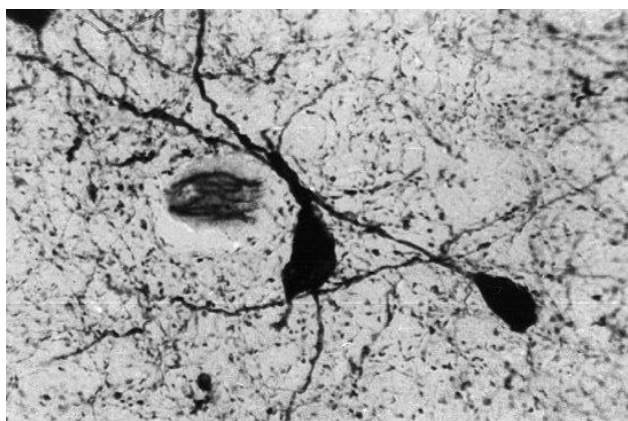
Половой член. Кавернозные тела представлены сосудами синусоидного типа, состоящими из трабекул, сформированных гладкомышечными клетками и соединительнотканью элементами. Наружный отдел кавернозных тел сформирован в виде слоя гладкомышечных клеток, ориентированных циркулярно и перпендикулярно продольной 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 вызвали 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.



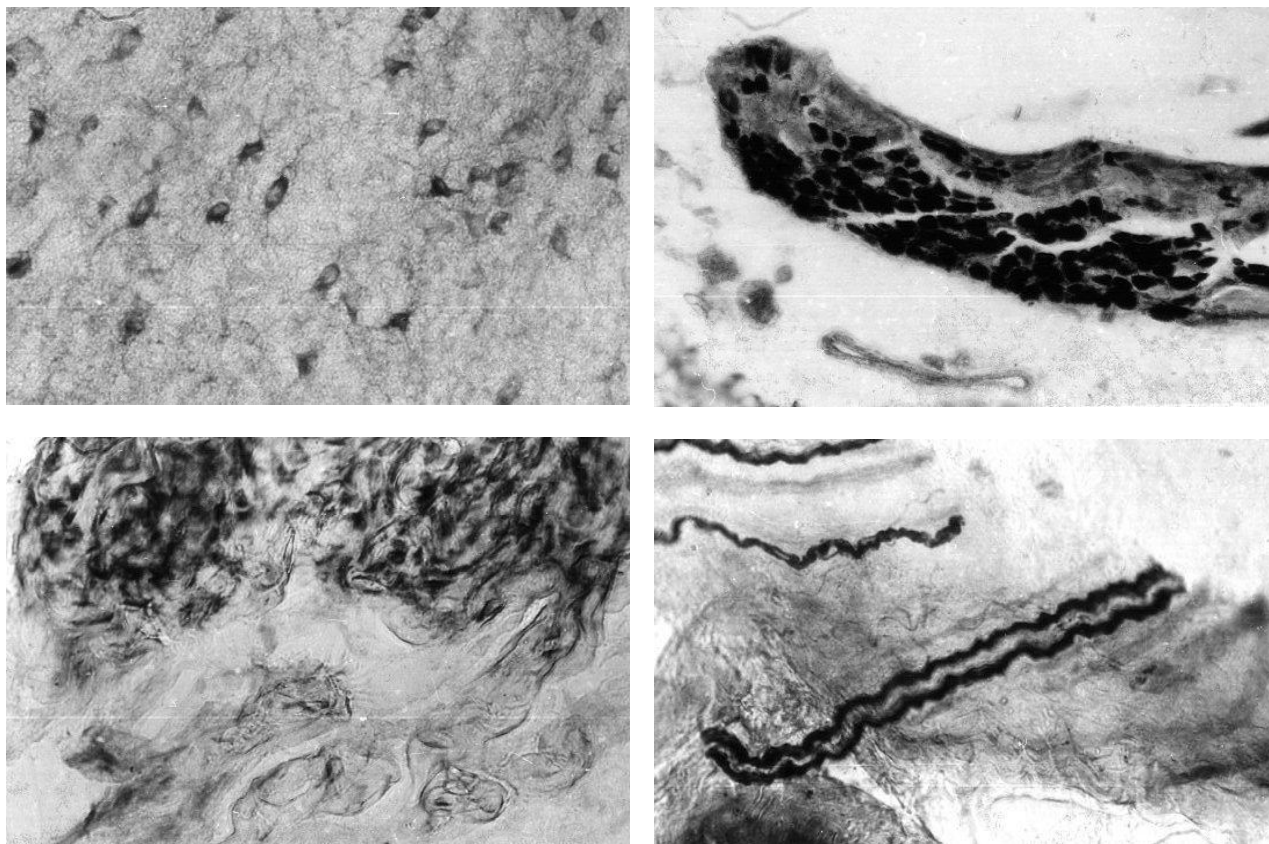


Рис 1. NADPH-диафоразы центральных и периферических отделов репродуктивной системы самцов крыс. Метод Vincent, Норе.

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.