

PODWZGÓRZOWA REGULACJA OWULACJI U ŻABY TRAWNEJ,
RANA TEMPORARIA L.

Jolanta Sotowska-Brochocka

Zakład Fizjologii Zwierząt Kręgowych
Instytut Zoologiczny, Uniwersytet Warszawski

WSTĘP

U ssaków na podstawie obszernego piśmiennictwa można sobie wytworzyć dobrze zarysowujący się obraz podwzgórzowej kontroli zjawisk związanych z rozrodem. Nasza wiedza natomiast na temat ośrodkowej regulacji rozmnażania kręgowców zmiennocieplnych, w tym płazów, ciągle jeszcze pozostaje bardzo fragmentaryczna. Informacje dotyczące podwzgórzowej regulacji rozrodu u samic-żab dotyczą przede wszystkim występowania i funkcji neurohormonu LHRH i można je streścić następująco:

- 1/ homogenaty podwzgórza żab (*Rana pipiens*) oraz syntetyczny LHRH pobudzają uwalnianie gonadotropin z ich przysadek *in vitro* [42];
- 2/ ekstrakty podwzgórza płazów zawierają peptyd fizykochemicznie i immunologicznie identyczny z LHRH ssaków [8, 26-28];
- 3/ u *Xenopus laevis* zawartość LHRH w podwzgórzu zmienia się sezonowo: zimą jest niska /12,9 ± 0,8 ng/podwzgórze/, maksimum osiąga wiosną, w okresie godowym /18,9 ± 0,9 ng/podwzg./, gdy również ciężar jajników jest największy 27 . U *R. pipiens* obu płci zawartość LHRH określono jako 3,27 ± 0,63 ng/podwzg., a LHRH wykryto przede wszystkim w kompleksie brzuszne podwzgórze - przysadka. Tylko około 16% radioimmunologicznie wykrywalnego LHRH występowało w obszarze: przegroda - telencephalon [2];
- 4/ syntetyczny LHRH w wysokich dawkach /1 µg/podawany *X. laevis*, traktowanym uprzednio PMS i hCG, może wywołać owulację, a u zwierząt we wczesnej fazie pęcherzykowej wydaje się inicjować witellogenezę /dawka: 1 µg 3 razy dziennie w ciągu 4 dni [42];
- 5/ ciągła /2-4-dniowa/ infuzja LHRH /0,25-1,0 µg/, mało skuteczna we wczesnych fazach rozwoju pęcherzyków jajnikowych, u samic preowulacyjnych powoduje wzrost poziomu gonadotropin i wywołuje owulację między 16 a 33 godziną infuzji /*Rana catesbeiana* [31]/

6/ reakcja samic żab *R. catesbeiana* na infuzję LHRH różni się od reakcji ssaków czasem trwania wzrostu uwalniania gonadotropin w odpowiedzi na LHRH /tzw. self-priming effect/. U ssaków efekt ten obserwuje się w ciągu paru godzin, u żab jest on bardzo rozciągnięty w czasie /I szczyt poziomu gonadotropin w 2 godzinie infuzji, II - między 19 a 33 godziną [31]/.

U kilku gatunków żab zlokalizowano już także w mózgu neurony LHRH. I tak, u *R. catesbeiana* obecność perikarionów LHRH-immunoreaktywnych /ir-LHRH/ stwierdzono w nieparzystym jądrze pośrodkowym przegrody /nucleus medianus septi/ oraz w wewnętrznych obrzeżach przysrodkowych i bocznych parzystych jąder przegrody, w jądrze wstęgi ukośnej Broca oraz w jądrze spoidła przedniego hipokampa. Ku tyłowi obszar występowania ir-perikarionów rozciąga się aż po przedni kraniec jądra przedwzrokowego [2]. U *Rana esculenta* ir-perikariony występują w nieparzystym jądrze, położonym ku przodowi od zachyłka przedwzrokowego III komory [19]. U hypofizektomizowanych ropuch /*Bufo vulgaris* [13]/ parzyste skupienia perikarionów LHRH wykryto w okolicach przegrody, wokół tylnej 1/3 części komór bocznych mózgu. Ostatnio zaś, u będących w okresie rozrodczym *Gastrophryne carolinensis* [6] nieliczne perikariony immunoreaktywne LHRH znaleziono w przednim obszarze przedwzrokowym, a u *Bufo japonicus* [20] ich występowanie stwierdzono w pośrodkowym jądrze przegrody oraz w jądrze wstęgi ukośnej Broca. Natomiast u *X. laevis* wykazano, że ciała komórek immunoreaktywnych LHRH występują w 3 skupieniach: w parzystych jądrach w pobliżu komór bocznych, w nieparzystym w pobliżu zachyłka przedwzrokowego /w połowie odcinka między bruzdą mózgu a III komorą/ oraz w wentralnej ścianie lejka /infundibulum [14]/. Jest to jedyne dotychczas doniesienie dotyczące płazów, które wskazuje na możliwość występowania perikarionów LHRH poza obszarem przedchiazmatycznym.

Cytowani autorzy są zgodni, że neurony ir-LHRH wysyłają swoje aksony ku wyniosłości pośrodkowej, mimo iż w przebiegu szlaków wydają się występować pewne różnice. Stąd, jak to jest ogólnie przyjęte u ssaków, poprzez system naczyń wrotnych podwzgórzowo-przysadkowych neurohormon docierałby do odpowiednich komórek wydzielniczych przysadki, pobudzając uwalnianie gonadotropin.

Na podstawie tych informacji należałoby mówić raczej o układzie LHRH niż o jądrach tworzonych przez neurony ir-LHRH. Powstaje również zagadnienie, jakie funkcje pełnią poszczególne części tego układu. Do pierwszoplanowego znaczenia dla oceny udziału podwzgórza w regulacji procesów związanych z rozrodem urasta również problem obecności lub braku ir-perikarionów w obszarze brzuszno-podwzgórzowego. Używając bowiem metod operacyjnych Dierickx [9-11] wykazał, że przednio-grzbietowe deaferentacje brzusznej części guza popielatego /pars ventralis tuberis cinerei=ptc/ u *R. temporaria* nie wpływają upośledzająco ani na gametogenezę, ani na występowanie drugorzędowych cech płciowych - a więc na sterydogenezę. Na tej pod-

stawie wyciągnął on wniosek o pewnej autonomii brzuszno podwzgórza w regulacji funkcji gonadotropowej przysadki u tego gatunku.

Powyższe wyniki, jak również dane dotyczące rozmieszczenia neuronów ir-LHRH, doprowadziły do wysunięcia hipotezy [18, 32] o istnieniu u płazów dwu różnie działających ośrodków zaangażowanych w regulację funkcji gonadotropowej przysadki. Pierwszego w tylnej części brzuszno podwzgórza i drugiego w obszarze przedwzrostowym. Udział w regulacji sezonowego rozwoju gonad u żab przypisano w oparciu o prace Dierickx'a brzuszno podwzrostowemu obszarowi podwzgórza, a dla obszaru przedwzrostowego postulowano kontrolę procesu owulacji [18, 32]. W dotychczasowej jednak literaturze brak jest jakichkolwiek przesłanek eksperymentalnych dla tych hipotez. Badania niniejsze miały zatem na celu określenie regulacyjnej funkcji podwzgórza w procesie dojrzewania jaj i owulacji. Jako obiekt badań wybrano żabę trawną, *Rana temporaria*.

CYKL ROZRODCZY SAMIC *R. TEMPORARIA* I UKŁAD DOŚWIADCZALNY ZASTOSOWANY W BADANIACH

Informacje dotyczące cyklu rozrodczego *R. temporaria* w Polsce pochodzą z długoletnich i bardzo wnikliwych badań Juszczyka i wsp. [21, 22]. Według tego autora hibernacja żab rozpoczyna się pod koniec października. Proces witellogenety u samic jest już wówczas bardzo zaawansowany. Również ich jajowody wykazują oznaki znacznego pobudzenia funkcjonalnego. Hibernacja przebiega najczęściej w wodzie, aż do III dekady marca. Bezpośrednio przed lub w momencie wychodzenia z hibernacji żaby łączą się w pary /amplexus/, a u samic ma miejsce owulacja. Obserwacje własne wykazują, że owulacja u samic może być całkowicie zakończona w ciągu 24 godzin. Uwolnione z pęcherzyków jajnikowych do jamy ciała jaja przedostają się do jajowodów, a przechodząc przez ich część krętą komórki jajowe zostają otoczone higroskopiiną wydzieliną /która w wodzie tworzy galaretowatą otoczkę/ i do momentu składania skrzeku zmagazynowane są w pseudomacicy. Gody i składanie skrzeku odbywa się wkrótce po zakończeniu hibernacji, gdy temperatura wody w zbiorniku, do którego żaby przywędrowały, osiąga przynajmniej 8°C [21]. Po owulacji i złożeniu skrzeku opróżnione z jaj jajniki i pozbawione wydzieliny jajowody osiągają ciężar najniższy w cyklu rocznym. Wkrótce jednak rozpoczyna się wzrost i gromadzenie żółtka w nowej populacji komórek jajowych. W miarę żerowania zwierząt latem pęcherzyki jajnikowe oraz jajowody intensywnie rosną, osiągając w okresie przedhibernacyjnym stan zaawansowanego rozwoju.

W niniejszych badaniach nad podwzrostową regulacją owulacji u *R. temporaria* przyjęto następujący model doświadczeń:

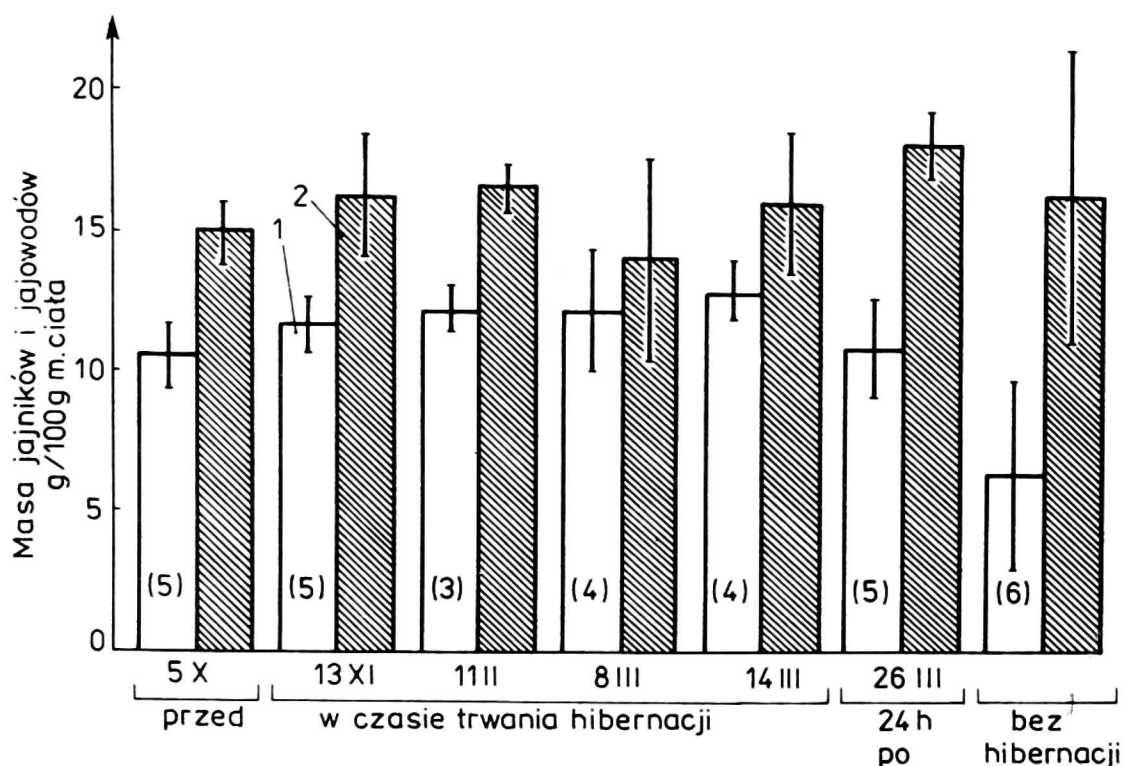
- hibernacja zwierząt w ciemnym pomieszczeniu o temp. 0-4°C w napowietrzanej wodzie;

samce i samice w osobnych pojemnikach;

- ingerencje doświadczalne /operacje, iniekcje/ podczas hibernacji;
- wiosenne zakończenie hibernacji - przeniesienie zwierząt na 24 godz /samice wraz z samcami/ do pomieszczenia o podwyższonej temperaturze /ok. 20°/ o naturalnym oświetleniu.

Ustalając taki model doświadczeń oparto się na następujących przesłankach:

1. Ekspozycja zwierząt na niskie temperatury w czasie hibernacji wydaje się istotna dla przygotowania samic do owulacji. Wzmianki w literaturze dotyczą kilku gatunków, w tym i *R. temporaria* [1, 21, 40, 41]. Na rysunku 1 przedstawiono stan narządów rozrodczych żab hibernujących i nie hibernujących. Z obserwacji własnych wynika, że zwierzęta przetrzymywane w temp. 15-19° nie wchodziły w amplexus i nie wykazywały oznak przygotowania jajników do owulacji, proces ten u nich nie wystąpił.



Rys. 1. Masa jajników i jajowodów żab *R. temporaria* przed, podczas i po hibernacji oraz u samic nie hibernujących /średnie \pm SD/; 1 - jajniki, 2 - jajowody

2. Hibernacja jest u *R. temporaria* okresem dalszego, choć nieznacznego wzrostu jajników i jajowodów [21, 30]. Ilustruje to rysunek 1. Przedstawione dane wydają się wskazywać, że procesy przygotowujące jajniki do owulacji przebiegają przez cały okres hibernacji.

3. U kontrolnych samic hibernujących w opisanych warunkach, tzn. w nieobecności samców, w ciągu kilku sezonów nie zaobserwowano spontanicznej owulacji podczas hibernacji.

4. U niewielkiego odsetka samic owulacja może wystąpić spontanicznie w 24-48 godz po zakończeniu hibernacji w podwyższonej temperaturze otoczenia bez obecności samców /tab. 1/. Gwarancją jednak masowego występowania owulacji u większości samic jest obecność samców.

Tabela 1

Występowanie spontanicznej owulacji u samic *R. temporaria* 24-48 godzin po zakończeniu hibernacji /średnie \pm SD/

Seria /liczba samic/ Faza rozrodu	Masa ciała g	Masa jajników 100 g masy ciała	Masa jajowodów 100 g masy ciała	Masa jaj w jamie ciała /g/
I (5)	48,7 $\pm 6,5$	10,75 \pm 1,73	18,06 \pm 1,28	-
pre I owul	67,5	1,21	27,91	2,69
II (4)	35,8 $\pm 5,0$	12,94 \pm 0,98	16,00 \pm 2,50	-
pre (2) post	32,3	1,15	32,47	

pre - samice preowulacyjne,
owul - samice w trakcie owulacji,
post - samice po owulacji.

U samic postowulacyjnych przytoczono wartość masy jajowodów wraz z jajami.

BADANIA OPERACYJNE I IMMUNOHISTOCHEMICZNE NAD LOKALIZACJĄ PODWZGÓRZOWYCH OŚRODKÓW ZWIĄZANYCH Z REGULACJĄ ROZRODU

W pierwszym etapie badań nad rolą podwzgórza w regulacji dojrzewania jaj i owulacji oraz w celu wstępnej lokalizacji podwzgórzowych ośrodków regulacyjnych dokonano przedniej deafferentacji pvtc. Płytkę z nierdzewnej stali wstawiano samicom tuż za skrzyżowaniem nerwów wzrokowych, przecinając powiązania pvtc z formacjami przedwzrokowymi. Wyniki zestawiono w tabeli 2. Wskazują one, że:

- ciężar jajników i jajowodów u hibernujących preowulacyjnych samic zarówno operowanych, jak i kontrolnych, nie wykazuje różnic;
- po zakończeniu hibernacji 5 spośród 9 operowanych samic owulowało w ciągu 24 godz; samice kontrolne owulowały wszystkie, a 2 z nich złożyły skrzek;
- operowane samice preowulacyjne badane po hibernacji miały normalnie rozwinięte zarówno jajniki, jak i jajowody.

Na podstawie powyższego doświadczenia wydaje się prawdopodobne, że odcięcie brzuszego podwzgórza od regionu przedwzrokowego nie upośledza ani dojrzewania jaj podczas hibernacji,

ani procesu owulacji. Teoretycznie istnieją trzy możliwości wytłumaczenia powyższych obserwacji:

- stosowane deaferentacje niecałkowicie przerwały drogi nerwowe, łączące obszar podwzgórze przedwzrokowego z pvtc;

Tabela 2

Wpływ przedniej deaferentacji obszaru brzuszno podwzgórze na stan narządów rozrodczych samic *R. temporaria* podczas hibernacji oraz na wystąpienie posthibernacyjnej owulacji /średnie \pm SD/

Grupa /liczba samic/	Masa ciała g	Masa jajników g	Masa jajowodów ^{xx} g	Masa jajników	Masa jajowodów
				100 g masy ciała	100 g masy ciała
Hibernacja ^x					
Operowane (4) pre	42,0 \pm 3,4	5,67 \pm 0,58	7,92 \pm 1,61	13,5 \pm 0,8	18,8 \pm 2,6
Hibernacja Kontrolne (3) pre	46,2 \pm 2,0	5,58 \pm 0,48	7,77 \pm 1,29	12,1 \pm 0,8	16,8 \pm 2,1
Po hibernacji ^{xxx}					
Operowane (4) pre	52,3 \pm 13,3	6,22 \pm 1,58	9,68 \pm 3,17	11,9 \pm 1,8	18,4 \pm 1,6
(5) post	47,6 \pm 4,9	0,35 \pm 0,04	15,65 \pm 7,13	0,7 \pm 0,2	32,5 \pm 8,9
Po hibernacji Kontrolne (6) post (2) po złożeniu jaj	70,1 \pm 27,7	0,47 \pm 0,14	20,69 \pm 6,92	0,7 \pm 0,2	29,8 \pm 7,6
	38,8	0,39	1,24	1,1	3,5

Operacje przeprowadzono w narkozie eterowej podczas hibernacji.

^x Zwierzęta badano około połowy okresu hibernacji, 77 dni po operacji.

^{xx} U samic postowulacyjnych - masa jajowodów wraz z jajami.

^{xxx} Zwierzęta badano po wiosennym zakończeniu hibernacji, 50 dni po operacji. Samice wraz z samcami przebywały 24 godz w pomieszczeniu o temp. ok. 20°C.

- bardzo obficie regenerujące naczynia krwionośne, "obrastające" implantowane przegrody /co stwierdzono podczas autopsji/, mogą przenosić neurohormon z obszaru przedwzrokowego do przysadki;

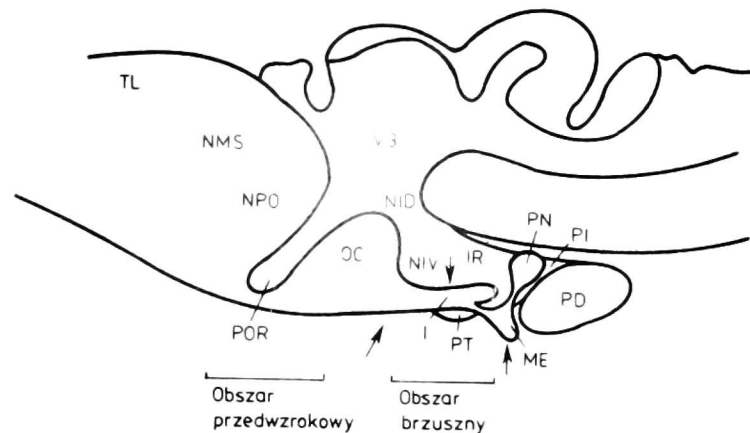
- obszar brzuszny podwzgórza /pvtc/ ma u R. temporaria autonomię w regulacji dojrzewania jaj i owulacji i jest niezależny od ośrodków przedwzrokowych.

W celu sprawdzenia hipotezy zakładającej udział pvtc w regulacji procesów dojrzewania jaj i owulacji oraz w celu zlokalizowania w obrębie brzusznego podwzgórza obszaru odgrywającego istotną rolę w regulacji tych procesów hibernujące samice poddano następującym zabiegom:

- wykonano lezje elektrolityczne obszaru infundibularnego pvtc o różnej rozległości /rys. 2/;
- wykonano pełne /przednio-boczno-tylne/ deaferentacje infundibularnej części pvtc;
- wstawiono stalową przegrodę izolującą przysadkę mózgową od podwzgórza, aby sprawdzić, czy sam układ przysadka-gonady nie wykazuje autonomii.

Wyniki doświadczenia zestawiono w tabeli 3. Sugerują one, że:

- ani lezje obszaru infundibularnego podwzgórza, ani deaferentacje tego obszaru, ani też przerwanie dróg łączących przysadkę z podwzgórzem nie blokują w sposób wyraźny procesu owulacji. Spośród 18 samic operowanych w ten sposób - 11 owulowało;



Rys. 2. Przekrój strzałkowy mózgu żaby /schemat/:

- I- infundibulum, lejek,
- IR- recessus infundibularis, zachyłek /III komory/ lejka,
- ME - eminentia mediana, wyniosłość pośrodkowa,
- NID - nucleus infundibularis dorsalis, grzbietowe jądro lejka,
- NIV - nucleus infundibularis ventralis, brzuszne jądro lejka,
- NMS - nucleus medianus septi, jądro pośrodkowe przegrody,
- NPO - nucleus preopticus, jądro przedwzrokowe,
- OC - chiasma, skrzyżowanie nerwów wzrokowych,
- PD - pars distalis, część dalsza przysadki mózgowej,
- PI - pars intermedia, część pośrednią,
- PN - pars nervosa, część nerwowa,
- POR - recessus preopticus, zachyłek /III komory/ przedwzrokowy,
- PT - pars tuberalis, część guzowa przysadki mózgowej
- TL - telencephalon, przodomózgowie; V3 - III komora mózgu

Strzałki wskazują obszary deaferentacji i uszkodzeń infundibularnej części podwzgórza

Tabela 3

Wpływ różnych uszkodzeń podwzgórza na stan rozrodczy samic *R. temporaria*

Rodzaj uszkodzeń (liczba samic)	Liczba samic, które przeżyły po opera- cji średnio X dni	Liczba samic w fazie		
		preowulacji	owulacji	postowulacji
Lezje obszaru infundibular- nego (54)	X=148 8 (16%)	3	4	1 (złożenie skrzeku podczas hibernacji)
Deaferentacje obszaru infundibularnego (5)	X=122 4 (80%)	1	1	2 (1 złożenie skrzeku podczas hibernacji)
Izolacja przysadki od podwzgórza (10)	X=120 6 (60%)	3	1	2 (1 złożenie skrzeku podczas hibernacji)
Samice kontrolne (11)	11 (100%)	0	7	4

Podczas lezji stosowano prąd anodowy 0,3-0,5 A przez 30-60 s. Elektroda stalowa dł. nie izolowanego końca 0,5 mm. Uszkodzenia dokonywano 1,25 mm ku przodowi od środkowego punktu przysadki oraz 0,5 mm w bok od linii środkowej po obu stronach. Deaferentacji dokonywano nożem Halasa 1,5 mm ku przodowi od środkowego punktu przysadki, na głębokości 2 mm. Kompletność deaferentacji sprawdzano na preparatach histologicznych. Po wiosennym zakończeniu hibernacji samice wraz z samcami przebywały przez 24 godz w temp. ok. 20°C.

- wśród wszystkich kategorii zwierząt operowanych zaobserwowano zjawisko wystąpienia owulacji /między 31 a 110 dniem po operacji/, a nawet złożenia skrzeku podczas hibernacji - w niskiej temperaturze, bez samców, a więc w okresie i w warunkach niefizjologicznych;

- rozwój jajników i jajowodów samic operowanych w niczym nie różni się od kontrolnych.

W tabeli tej również zwraca uwagę znaczna śmiertelność wśród zwierząt poddanych lezjom podwzgórza. Na podstawie obserwacji wysunięto przypuszczenie, które potwierdziły dalsze doświadczenia, iż przyczyną znacznego procentu upadków mogła być poronna owulacja w czasie hibernacji.

Kompletne deaferentacje i izolacja przysadki od podwzgórza nie tylko nie zapobiegały owulacji, jak to się dzieje w takiej sytuacji u ssaków, ale nawet spowodowały przyspieszenie tego

procesu i jego wystąpienie w warunkach, w jakich normalnie nie występuje. Zjawisko to nasu-
nęło przypuszczenie, że u hibernujących żab podwzgórze wywiera działanie hamujące na pro-
ces owulacji [38]. Z drugiej strony brak zahamowania procesu dojrzewania jaj i owulacji u
samic z opisanymi powyżej uszkodzeniami podwzgórza mógł wskazywać na swego rodzaju auto-
nomię osi przysadka-jajniki. Wobec tego powstało pytanie, jaka jest rola neurohormonu LHRH
w regulacji owulacji u *R. temporaria*. Aby odpowiedzieć na to pytanie mózgi zwierząt zarówno
operowanych, jak i nie operowanych poddano badaniom histologicznym i immunohistochemicz-
nym. Z uwagi na to, że badania nie są jeszcze w pełni zakończone, przedstawiono tylko wy-
niki obserwacji układu LHRH u samic kontrolnych preowulacyjnych bezpośrednio po hibernacji.
Układ zaś LHRH u zwierząt operowanych zostanie przedstawiony, dla przejrzystości opisu, na
przykładzie dwu samic owulujących, z których jedna była poddana deaferentacji tylnej części
infundibulum, a druga miała wstawioną przegrodę izolującą przysadkę od podwzgórza.

W mózgu kontrolnych samic preowulacyjnych obserwowano bardzo intensywną reakcję immu-
nohistochemiczną, zarówno w ir-LHRH perikarionach, jak i we włóknach tworzących znacznej
wielkości szlaki. Immunoreaktywne perikariony znaleziono tylko w obszarze przedchiazmatycz-
nym. Tworzą one nieparzyste skupienie ku przodowi od przedwzrokowej części III komory, w
połowie odcinka między nią a bruzdą mózgu - w jądrze pośrodkowym przegrody /rys. 3/. Pe-
rikariony te wysyłają wiązkę aksonów w górę i nieliczne ku przodowi, po obu stronach bruzdy
mózgu. Natomiast dwa potężne szlaki włókien biegną stąd w obszarze przedwzrokowym po obu
stronach III komory. Przebiegają one w kierunku brzuszno-tylnym. Wśród włókien występują tu
luźne skupienia komórek immunoreaktywnych /rys. 5 i 5a/. Przez brzuszny obszar przedwzro-
kowy /rys. 6/ szlaki zmiierają ku zachyłkowi przedwzrokowemu III komory /rys. 4/ i narzą-
dowi zachyłka przedwzrokowego, gdzie przyłączają się do nich włókna neuronów ze skupiska
tam zlokalizowanego /rys. 4/. Po przejściu pod zachyłkiem przedwzrokowym włókna biegną
ponad /pojedyncze poprzez/ skrzyżowaniem nerwów wzrokowych, po czym wchodzi w obszar
guza popielatego i biegną brzusznie poprzez infundibulum ku wyniosłości pośrodkowej. U kon-
trolnych, preowulacyjnych samic wyniosłość pośrodkowa barwi się bardzo intensywnie /rys. 9
i 10/.

U zwierząt operowanych /tab. 4/ stwierdzono całkowite /deaferentacja/ lub prawie całko-
wite /izolacja przysadki/ odcięcie dostępu włóknom immunoreaktywnym LHRH do wyniosłości
pośrodkowej /rys. 7 i 8/. Zwraca uwagę również bardzo intensywne zabarwienie włókien i na-
czyń w obszarze p. tuberalis u zwierzęcia z implantowaną przegrodą odcinającą przysadkę
/rys. 11/.

Przedstawione uszkodzenia blokują zatem drogę przekazywania LHRH poprzez wyniosłość
pośrodkową. Ponieważ jednak u zwierząt operowanych w ten sposób owulacja wystąpiła, na-

suwają się wątpliwości dotyczące regulacyjnej roli LHRH w tym procesie, albo innego sposobu przekazywania go do przysadki niż poprzez wyniosłość pośrodkową.

Tabela 4

Charakterystyka samic *R. temporaria* poddanych deaferentacji obszaru infundibularnego podwzgórza i izolacji przysadki mózgowej od podwzgórza

Wyszczególnienie	Deaferentacja	Przegroda izolująca przysadkę
Data sekcji:	8.03.82	8.03.82
Dni po operacji:	102	88
Masa ciała /g/:	31,0	38,0
Masa jajników g/100 g masy ciała:	0,9	11,2
Masa jajowodów ^x g/100 g masy ciała:	42,0	17,7
Stan rozrodczy:	W trakcie owulacji: w jajnikach kilka nie owulowanych jaj, nieliczne jaja w jamie ciała, przeważająca większość jaj w pseudouterus;	W trakcie nietypowo przebiegającej owulacji nieznaczna część jaj owulowała; liczne jaja w jamie ciała; jaja obecne w części krętej jajowodów i w pseudouterus; częściowo złożony skrzek w warunkach hibernacji;
Uszkodzenia:	Całkowite odcięcie tylnej części obszaru infundibularnego z wyniosłością pośrodkową i przysadką od pozostałego podwzgórza /rys. 7/;	Zniszczona prawie cała /ok. 95%/ wyniosłość pośrodkowa, pozostał tylko mały jej fragment połączony z infundibulum;
Charakterystyka układu LHRH:		
a/ okolice przegrody mózgu:	Immunoreaktywne perikariony - reakcja intensywna;	Immunoreaktywne perikariony - reakcja niezbyt intensywna;
b/ obszar przedwzrokowy:	Potężny szlak włókien, reakcja intensywna; często włókna w pobliżu naczyń;	Szlak wyraźny ale włókna mniej wypełnione ir-materiałem; wiele włókien w pobliżu naczyń, szczególnie w brzusznej krawędzi tego obszaru;
c/ narząd zachyłka przedwzrokowego:	Intensywnie barwiące się włókna w pobliżu naczyń;	Włókna w pobliżu naczyń;
d/ obszar infundibularny:	W obszarze przed uszkodzeniem nieliczne włókna; p. tuberalis nie widoczna;	W obszarze przed uszkodzeniem bardzo intensywnie wybarwiające się włókna nad naczyniami, w sąsiedztwie p. tuberalis; /rys. 11/;
e/ wyniosłość pośrodkowa:	Całkowicie pozbawiona ir-materiału /rys. 8/;	W pozostałym niewielkim fragmencie bardzo nieliczne granule immunoreaktywne;

^x Masa jajowodów wraz z jajami.

Utrwalone /paraformaldehyd-kw. pikrynowy-bufor fosforanowy, pH 7,4/, zatopione w parafinie mózgi barwiono immunohistochemicznie metodą pośrednią: I warstwa - p-ciało α -LHRH w rozc. 1:800, II, p-ciało α -IGg królika 1:40 /Inst. Pasteur, Paris/ sprzężone z peroksydazą chrzanową. Peroksydazę lokalizowano za pomocą 3,3-diaminobenzydyny [38].

W celu zweryfikowania tezy, że u *R. temporaria* istnieje inna, oprócz wyniosłości pośredkowej, droga przekazywania tego neurohormonu, poszukiwano na preparatach kontaktu ir-włókien z III komorą i/lub z układem naczyniowym mózgu. Wykonane obserwacje wykazały, iż w obszarach występowania komórek immunoreaktywnych i ich aksonów w okolicach przegrody /rys. 3 i 3a/, a szczególnie w brzusznej części obszaru przedwzrokowego /rys. 4-6/ występują liczne obrazy bliskiego kontaktu włókien LHRH z naczyniami. Bardzo wyraźne jest również sąsiedztwo włókien immunoreaktywnych i naczyń w narządzie zachyłka przedwzrokowego. Powyższe obserwacje dotyczą zarówno zwierząt kontrolnych, jak i operowanych. U samic operowanych, w obszarze przedwzrokowym, a także w infundibularnym, tuż przed uszkodzeniem /rys. 11/, obserwowana bliskość włókien i naczyń pozwala przypuszczać, że istnieje możliwość przekazywania neurohormonu z zakończeń nerwowych do krążenia ogólnego w brzuszonym podwzgórzu i poza nim. Obserwacje natomiast nie potwierdzają możliwości przekazywania LHRH poprzez płyn mózgowo-rdzeniowy III komory, nie obserwowano bowiem włókien immunoreaktywnych w pobliżu wyściełającej ją ependymy. Podobne obserwacje poczynili Goos et al. [19] u *R. esculenta*, a na zamieszczonym przez nich zdjęciu widoczny jest materiał immunofluorescencyjny w sąsiedztwie naczyń.

Omówione powyżej doświadczenia, aczkolwiek sugerowały istnienie funkcji hamującej podwzgórza u żab i dały obraz rozmieszczenia perikarionów i włókien ir-LHRH, nie pozwoliły jednak zlokalizować w sposób precyzyjny ośrodka z nią związanego. Obszar infundibularny stanowi bowiem końcową wspólną drogę dla informacji z OUN, które są przekazywane do przysadki mózgowej via wyniosłość pośredkowa /tzw. efektorowy układ endokrynomotoryczny [29]. W związku z tym efektów uszkodzenia nie można przypisywać jednoznacznie temu obszarowi. Postanowiono zatem dalej prowadzić poszukiwania ośrodków, których funkcja byłaby związana z regulacją rozrodu, czy ściślej owulacji, u samic *R. temporaria*. W wyborze obszarów mózgu, które postanowiono zbadać, kierowano się wynikami przedstawionych badań immunohistochemicznych nad lokalizacją neuronów LHRH. Starano się więc, stosując lezje, wyeliminować funkcje neuronów LHRH w obszarze przedwzrokowym oraz w obszarze przegrody mózgu. Przy wykonywaniu tych operacji opierano się na danych zawartych w atlasie mózgu *R. esculenta* [23]. Wyniki doświadczeń przedstawiono w tabeli 5. Powyższe dane wskazują, że:

- u 3 spośród 5 samic poddanych dwustronnym lezjom okolicy przedwzrokowej wystąpiła owu-

lacja, w tym u 1 samicy wystąpiła ona przedwcześnie w warunkach hibernacji, w 47 dniu po operacji;

- lezje obszaru przegrody mózgu nie miały wpływu na wystąpienie i przebieg procesu owulacji.

Tabela 5

Wpływ lezji obszaru przedwzrokowego oraz obszaru przegrody mózgu na występowanie owulacji u *R. temporaria*

Uszkodzenia mózgu (liczba samic)	Padły podczas hibernacji		Autopsja po hibernacji	
	liczba samic w fazie			
	preowulacji	owulacji	owulacji	postowulacji
Lezje obszaru przedwzrokowego (5)	2	1	1	1
Dni po operacji	17-40	47	105	105
Operacje pozorne (3)	-	-	-	3
Dni po operacji	-	-	-	105
Lezje przegrody mózgu (7)	-	-	2	5 (w tym 1 po złożeniu skrzelu)
Dni po operacji	-	-	112	112
Operacje pozorne (3)	-	-	-	3 (w tym 1 po złożeniu skrzelu)
Dni po operacji	-	-	-	112

Operacje wykonywano około połowy okresu hibernacji; elektroda stalowa, prąd anodowy 0,3A, 45 s. Lezje przegrody: 1 mm ku przodowi od chiazmy, 1,5 mm w głąb; lezje obszaru przedwzrokowego: tuż przed chiazmą, 0,5 mm po obu stronach od linii środkowej, 1,25 mm w głąb.

Dane powyższe wydają się wskazywać na przedwzrokową lokalizację ośrodka hamującego owulację u żab. Udowodnienie tego wymaga jednak dalszych doświadczeń operacyjnych. Ostatnio podobną sytuację znaleziono u ryb *Carassius auratus* [33, 35, 39]. Lezje bocznych jąder guza oraz zniszczenie szypuły przysadki, a następnie rozległe lezje przedniego jądra przedwzrokowego przykomorowego u preowulacyjnych samic tego gatunku powodowały znaczny wzrost poziomu gonadotropin we krwi oraz owulację w warunkach również nie sprzyjających temu proce-

sowi, tj. w wodzie o temp. 12-14° /normalnie proces zachodzi w temp. 21-22°C/. Cytowani autorzy na podstawie powyższych oraz innych badań [36] wnioskuje, że u ryb istnieje czynnik hamujący uwalnianie gonadotropin /GRIF/, pochodzący prawdopodobnie z obszaru przedwzrokowego. Pozostaje jednak do zbadania natura tego czynnika. Biorąc pod uwagę wyniki badań immunohistochemicznych, poświęconych lokalizacji neuronów β -endorfinowych i met-enkefalinowych u *R. temporaria* [15] i *R. catesbeiana* [44] można sądzić, iż lezje stosowane w niniejszej pracy bądź niszczyły skupiska tych neuronów w obszarze przedwzrokowym, bądź przecinały szlaki ich aksonów, zdążające poprzez obszar infundibularny do wyniosłości środkowej. U ssaków, jak się wydaje, zarówno β -endorfina, jak i met-enkefalina wpływają hamująco na uwalnianie LHRH [37]. Również immunohistochemiczna lokalizacja neuronów zawierających substancję P u *R. esculenta* [17] i u *R. catesbeiana* [44] w jądrze przedwzrokowym oraz w brzuszonym podwzgorzu pozwala przypuszczać, iż stosowane tu lezje mogły zniszczyć skupiska tych perikarionów. Ponieważ zaś istnieją dowody [24, 25] wskazujące na wpływ substancji P hamujący na poziomie przysadki uwalnianie gonadotropin u ssaków, nie można wykluczyć udziału tego peptydu w hamowaniu owulacji u żab.

W każdym razie, na podstawie niniejszych badań można przypuszczać, że u płazów, jak i u ryb, a więc u zmiennocieplnych zwierząt o wyraźnie zaznaczonej sezonowości rozrodu proces owulacji jest pod podwójną - stymulującą i hamującą - kontrolą podwzgorzową, przy czym istotną rolę w hamowaniu należałoby przypisać obszarowi przedwzrokowemu.

BADANIA NAD PODWOJNĄ - HAMUJĄCĄ I POBUDZAJĄCĄ - ROLĄ PODWZGÓRZA W REGULACJI OWULACJI U *R. TEMPORARIA*

Przedstawione doświadczenia doprowadziły do wysunięcia hipotezy o hamującej funkcji podwzgorza w procesie owulacji i postawiły pod znakiem zapytania rolę LHRH w tym procesie. W celu wyjaśnienia powyższych zagadnień wykonano doświadczenie, w którym część samic *R. temporaria* w 4 i 5 tygodniu hibernacji poddano lezjom elektrolitycznym obszaru infundibularnego podwzgorza. Po dalszych 2 tygodniach hibernujące samice podzielono na 4 grupy:

grupa 1 - N+nsk - żaby nie operowane, otrzymujące iniekcje normalnej surowicy królika /nsk/;

grupa 2 - N+a-LHRH - żaby nie operowane, otrzymujące iniekcje surowicy anty-LHRH /a-LHRH/;

grupa 3 - L+nsk - żaby operowane, otrzymujące jw. nsk;

grupa 4 - L+a-LHRH - żaby operowane, otrzymujące surowicę anty-LHRH.

Tuż po ostatniej iniekcji do pojemników z samicami wpuszczono taką samą liczbę samców i zakończono hibernację, przenosząc zwierzęta na 24 godz do pomieszczenia o temp. ok. 23°.

Następnie zwierzęta ważono, usypiano, dokonywano autopsji oraz wycinano jajniki i jajowody, które ważono. Mózgi i przysadki utrwalano do dalszych badań. Wyniki przedstawiono w tabeli 6. Z tabeli tej wynika że:

Tabela 6

Wpływ lezji obszaru infundibularnego podwzgórza oraz surowicy anty-LHRH na proces owulacji *R. temporaria*

Grupa	Liczba samic	Padły podczas hibernacji			Autopsja po hibernacji		
		liczba samic w fazie					
		preowulacji	owulacji	postowulacji	preowulacji	owulacji	postowulacji
N+nsk ^x	a/ 8	-	-	-	5	3 ^{xx}	-
	b/ 6	-	-	-	-	-	6
N+α-LHRH	7	-	-	-	6	1 ^{xxx}	-
L+nsk	9	1	2	4 ^{xxxx}	2	-	-
Dni po operacji:		28	28-90	38; 42; 56; 56	57		
L+α-LHRH	9	1	-	1 ^{xxxx}	1	3 ^{xx}	3
Dni po operacji:		56		21	57	47-57	47-57

Surowice rozcieńczone 1:1 podawano co tydzień do worków limfatycznych przez 6 tygodni w objętości 0,1 ml. Króliczą surowicę α-LHRH /miano 1:8000/ otrzymano od prof. E. Domańskiego z IFŻZ PAN w Jabłonie. Lezje obustronne: 0,3 A, 45 s, 1,25 mm ku przodowi od środkowego punktu przysadki, 1,5 mm w głąb.

^x Doświadczenie prowadzono w dwu seriach "a" i "b"; w serii "a" owulowały 3 spośród 8 samic. Ponieważ masa ciała samic preowulacyjnych wynosiła \bar{x} 24,2 \pm 4,0, a pod względem długości ciała należały one do klasy najmniejszych żab tego gatunku dojrzałych płciowo [21], powstała obawa, że nie osiągnęły one jeszcze dojrzałości lub wchodzą w rozród po raz pierwszy. Doświadczenie powtórzono więc na dużych samicach / \bar{x} 70,3 g/ - seria "b".

^{xx} Proces owulacji bardzo zaawansowany: jajniki opróżnione z komórek jajowych lub z nielicznymi; nieliczne jaja w jamie ciała oraz w krętej części jajowodów; główna ich masa w pseudouterus.

^{xxx} Początek owulacji: jajniki zawierają komórki jajowe; jaja obecne w jamie ciała; jajowody puste.

^{xxxx} Jedna samica złożyła skrzek w warunkach hibernacji.

- wśród zwierząt z uszkodzonym obszarem infundibularnym podwzgórza wystąpiła znaczna śmiertelność. Połowa operowanych w ten sposób samic /9 osob./ padła podczas hibernacji. Samice te w większości należały do grupy L₁nsk i owulowały podczas hibernacji /6 osob./ Zjawiska owulacji podczas hibernacji nie obserwowano nigdy u samic nie operowanych;

- podanie samicom surowicy a-LHRH zahamowało wystąpienie owulacji.

a/ u zwierząt operowanych podczas hibernacji spośród 9 osobników owulowała i złożyła skrzek tylko jedna samica w 21 dniu po zabiegu i 7 dnia po pierwszej iniekcji surowicy a-LHRH;

b/ u zwierząt nie operowanych po hibernacji tylko u jednej samicy spośród 7 obserwowano początek tego procesu.

Tak więc lezje obszaru infundibularnego pvtc spowodowały podobnie, jak w poprzednich doświadczeniach, przyspieszenie procesu owulacji i jego wystąpienie w warunkach nefizjologicznych. Wystąpienie owulacji w wyniku uszkodzeń zarówno okolicy przedwzrokowej, jak i obszaru infundibularnego, wyraźnie wskazuje, że ma tu miejsce wyeliminowanie funkcji hamującej ten proces.

Podawanie natomiast surowicy anty-LHRH wpłynęło hamująco na proces owulacji, wskazując, że peptyd ten jest odpowiedzialny za przyspieszenie wystąpienia owulacji u samic operowanych. Wyniki powyższe pozwalają zatem sądzić, że proces owulacji u *R. temporaria* pozostaje pod podwójną kontrolą podwzgórzową, a wystąpienie owulacji jest wypadkową podwzgórzowej funkcji pobudzającej, realizowanej przez LHRH i funkcji hamującej, której istota pozostaje nie znana.

O ile w literaturze pojawiły się ostatnio doniesienia na temat udziału neurohormonu LHRH w pobudzaniu owulacji u żab *R. catesbeiana* [31], o tyle o podwzgórzowym hamowaniu tego procesu u płazów nie było dotychczas żadnych informacji. W tej sytuacji podjęto próby szczegółowszego scharakteryzowania podwójnej roli podwzgórza, a szczególnie hamowania w regulacji procesu owulacji u *R. temporaria*. W tym celu postanowiono:

1/ potwierdzić tezę wysuniętą na podstawie wyników podawania surowicy a-LHRH, głoszącą, że wystąpienie owulacji w czasie hibernacji u samic operowanych spowodowane było działaniem LHRH;

2/ podjąć próbę zahamowania owulacji u nie operowanych samic tuż po zakończeniu hibernacji poprzez podanie im substancji, które u ssaków wywierają działanie hamujące na uwalnianie LHRH; badania rozpoczęto od podawania bromokryptyny [16];

3/ określić zawartość LHRH w podwzgórzu preowulacyjnych żab, traktowanych bromokryptyną oraz prześledzić jego zawartość przed, podczas i po owulacji u niczym nie traktowanych samic tego gatunku.

W wyniku doświadczenia, w którym hibernującym, preowulacyjnym samicom podawano LHRH^x okazało się, że u 2 samic spośród 3 rozpoczęła się owulacja w 18 i 30 godz po pierwszej iniekcji, czyli po 2 i 4 iniekcjach neurohormonu /tab. 7/. Samice kontrolne nie owulowały.

Tabela 7

Wpływ iniekcji LHRH na owulację u hibernujących żab, *R. temporaria*

Grupa	Liczba samic	Liczba samic owulujących	Masa jaj w jamie ciała (g)
D (+LHRH)	3	2 1. Owulacja po 2 iniekcjach, 18 h po 1 2. Owulacja po 4 iniekcjach, 30 h po 1	1,71435 0,00230
K (+nośnik)	3	0	0

Preowulacyjnym samicom doświadczalnym przebywającym w hibernacji podawano co 6 godzin iniekcje LHRH w jednorazowej dawce 1,168 µg/g masy ciała/godzinę. Samice kontrolne otrzymywały 0,65% NaCl + kw. askorbinowy.

Powyższe dane wskazują, że egzogeny LHRH podawany w bardzo wysokich dawkach może spowodować u zwierząt nie operowanych owulację w warunkach hibernacji. Świadczy to, z jednej strony, o zdolności gonadotropów przysadkowych do reakcji na LHRH w tych warunkach. Z drugiej strony, biorąc pod uwagę bardzo wysokie dawki neurohormonu, jakie należy zastosować, aby uzyskać efekt w postaci owulacji, można przypuszczać, że gonadotropy w okresie hibernacji u zwierząt nie operowanych wykazują niezmiernie małą wrażliwość na egzogeny LHRH. Natomiast leżąc obszaru infundibularnego znoszą najprawdopodobniej hamowanie uwalniania LHRH, stwarzając możliwość oddziaływania endogennego neurohormonu na gonadotropy, czego efektem jest przedwczesna owulacja. Ta interpretacja zgodna jest z wynikami Lichta i wsp. [31, 7], którzy stwierdzili u żab *R. catesbeiana*, że:

- aby osiągnąć efekt owulacji u samic wymagane jest stosowanie wyższych dawek LHRH na jednostkę masy ciała i dłużej trwające infuzje niż u ssaków;

- samice są mało wrażliwe /znacznie mniej niż samce/ na pojedynczą iniekcję lub krótkotrwałą infuzję LHRH w różnych fazach cyklu jajnikowego, o czym świadczy nieznaczny wzrost poziomu gonadotropin przysadkowych we krwi;

^x Zsyntetyzowany przez prof. B. Rzeszotarską, WSP, Opole.

- długotrwała infuzja nie powoduje "odwrażliwienia" przysadki na działanie LHRH, jak to się dzieje u ssaków.

Pierwsze fakty wydają się świadczyć o konieczności hibernacyjnego, długotrwałego w warunkach normalnych, oddziaływania LHRH na gonadotropy oraz rozciągniętego w czasie, przygotowującego jajniki do owulacji, oddziaływania gonadotropin.

Aby przekonać się czy w procesie hamowania uwalniania LHRH u żab, podobnie jak u ssaków [16], uczestniczy dopaminergiczny układ neurotransmisyjny, podawano preowulacyjnym samicom agonistę receptorów D-2, bromokryptynę. Preparat ten podawano bezpośrednio przed zakończeniem hibernacji. Doświadczenie przeprowadzono w dwu seriach. I seria badań miała miejsce w okresie poprzedzającym czas naturalnych wyjść żab z zimowisk /I dekada marca/, II - około miesiąca później /III dekada kwietnia/.

Tabela 8

Wpływ bromokryptyny na występowanie owulacji u posthibernacyjnych żab *R. temporaria*

Seria, grupa (liczba samic)	Średnia masa ciała (g \pm SD)	Liczba samic owu- lujących	Stan rozrodczy samic
I. 13 marzec D (4)	73,0 \pm 4,5	0	pre
I. K (5)	54,6 \pm 1,4	4	1-pre 2-I f 1-II f 1-III f
II. 25 kwiecień D (5)	33,6 \pm 2,8	5	2-II f 1-post 2-po złożeniu skrzeku
II. K (5)	32,4 \pm 0,5	5	1-I f 4-post

Samicom doświadczalnym podawano bromokryptynę /Ciba/ 20 μ g/g masy ciała dwukrotnie - 24 h przed i tuż przed zakończeniem hibernacji; samice kontrolne otrzymywały taką samą objętość /ok. 0,7 ml/nośnika /zakwaszony roztwór 0,65% NaCl+alkohol/.

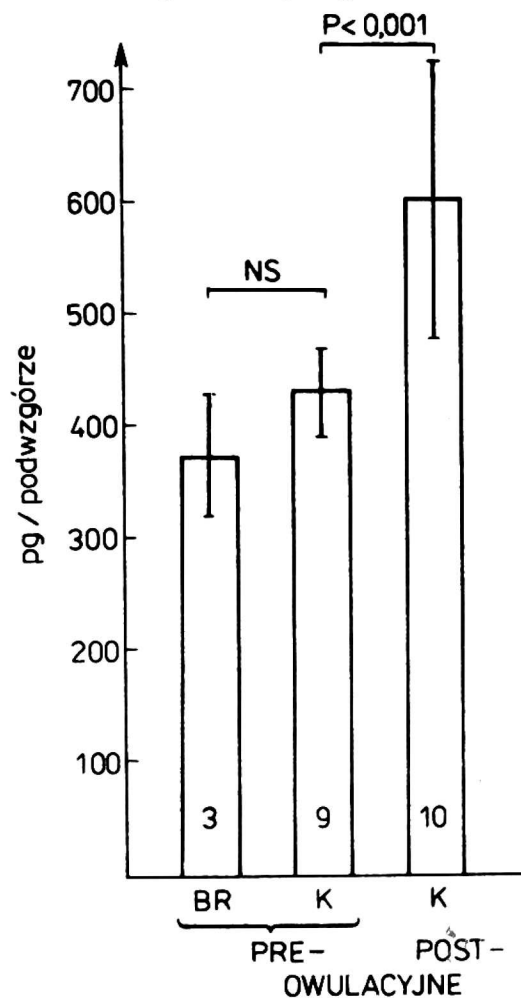
pre - samice preowulacyjne,

post - samice postowulacyjne,

I f, II f, III f - fazy owulacji.

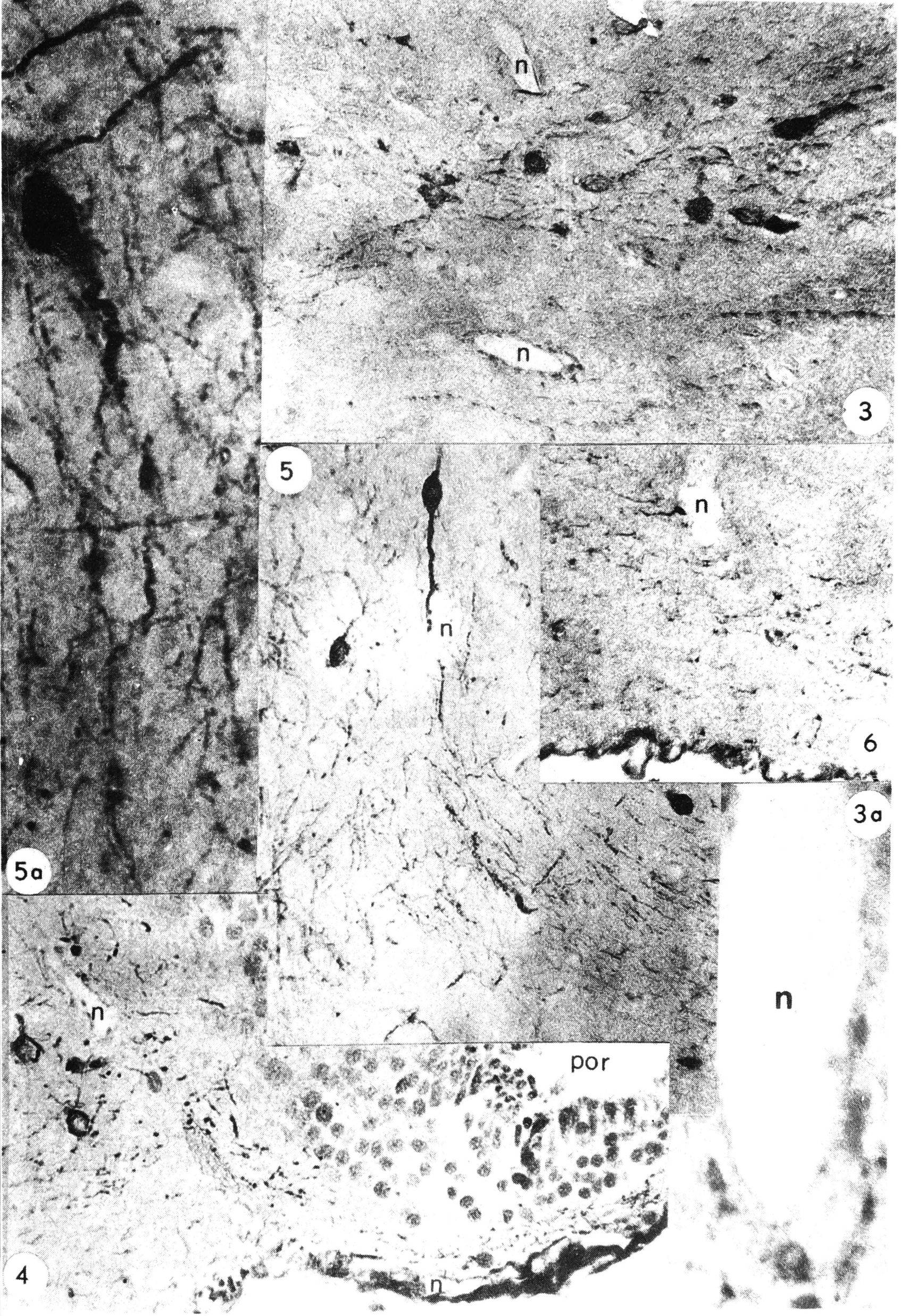
Podanie bromokryptyny samicom I serii całkowicie zahamowało owulację /tab. 8/, podczas gdy 4 spośród 5 żab kontrolnych owulowały. Przy powtórzeniu natomiast identycznego doświadczenia w późniejszym terminie /II seria/ bromokryptyna nie zahamowała owulacji. Owulowały wszystkie samice zarówno doświadczalne, jak i kontrolne. Wyniki powyższe wydają się wskazywać na zmniejszenie się, w miarę przedłużania hibernacji, hamującego działania bromokryptyny na owulację. Przyczyny tego zjawiska należy być może doszukiwać się w zmianie wrażliwości neuronów LHRH i/lub gonadotropów na dopaminę, np. poprzez zmiany w jej układzie receptorowym.

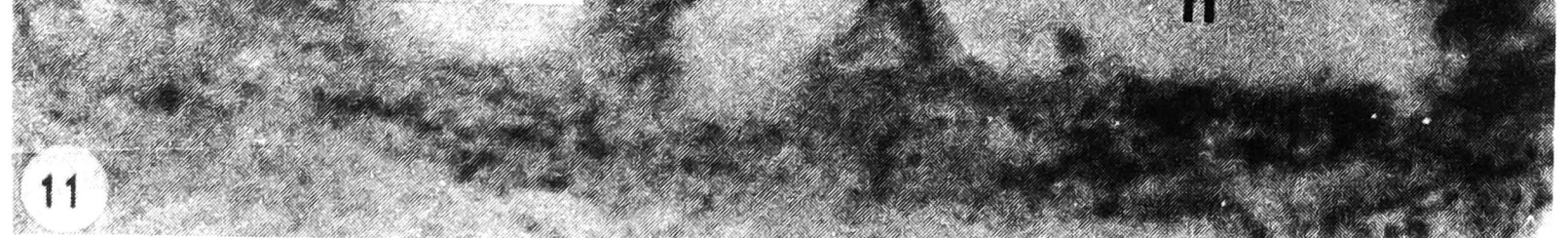
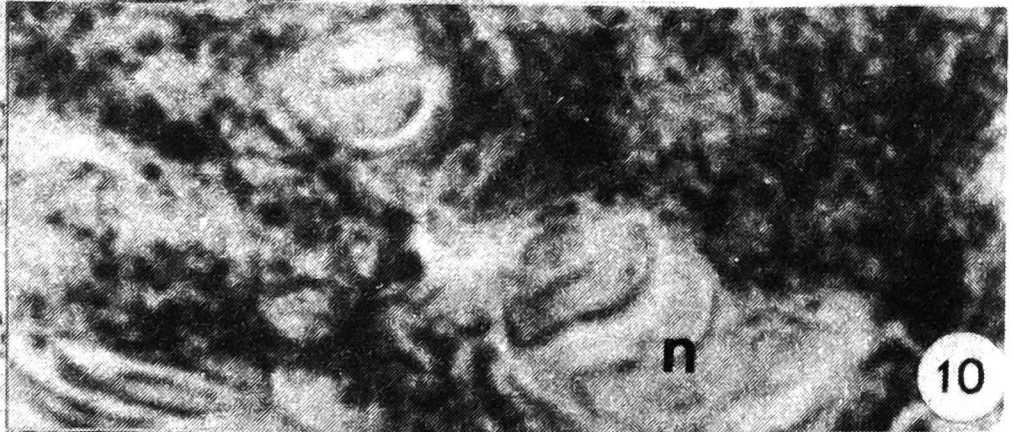
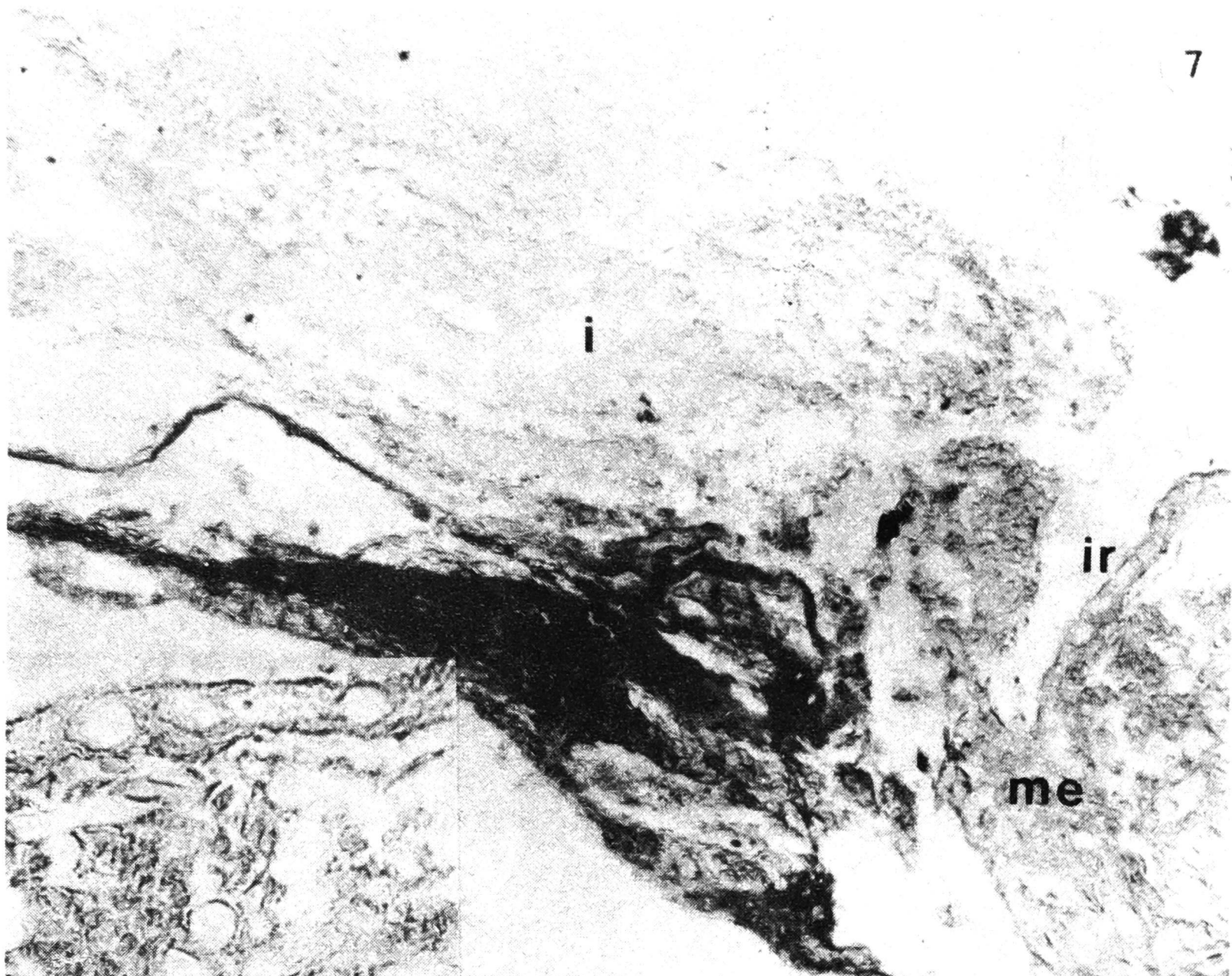
Poszukując poparcia dla którejś z powyższych hipotez oraz dla prześledzenia lasów neurohormonu LHRH podczas owulacji, określono jego zawartość u samic traktowanych bromokryptyną /I seria/, jak również u niczym nie traktowanych kontrolnych, w okresie posthibernacyjnej owulacji. Zawartość neurohormonu oznaczano radioimmunologicznie, łącznie w brzusznej i przedwzrokowym obszarze podwzgórza /rys. 12/.

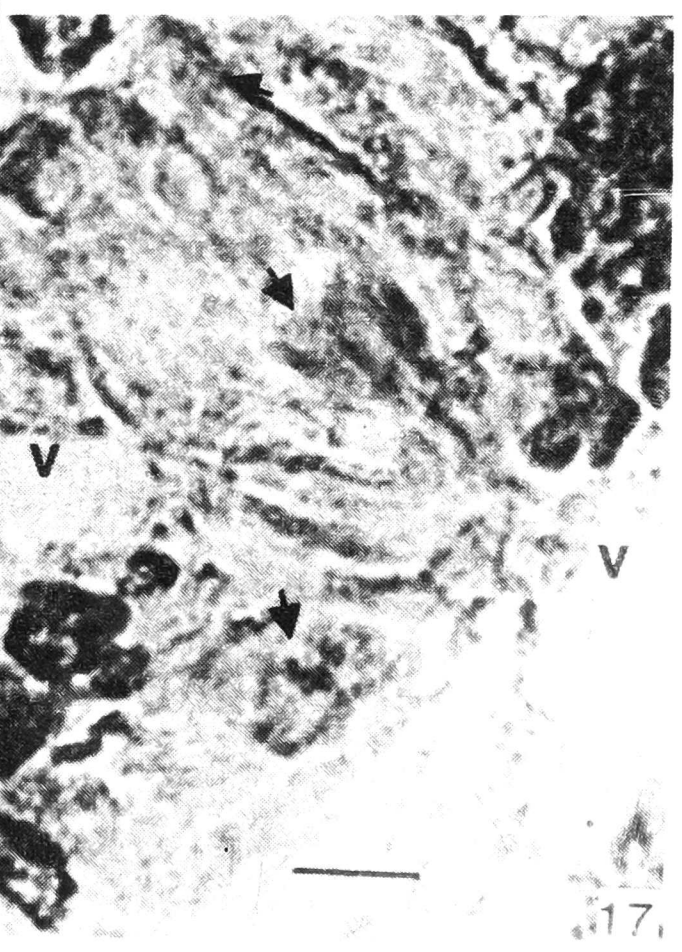
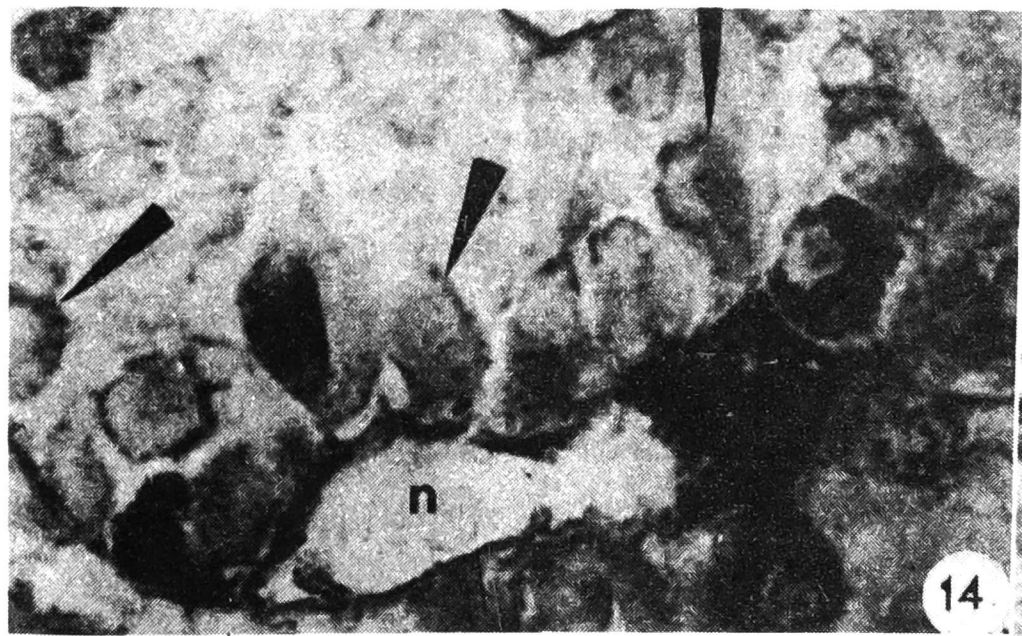
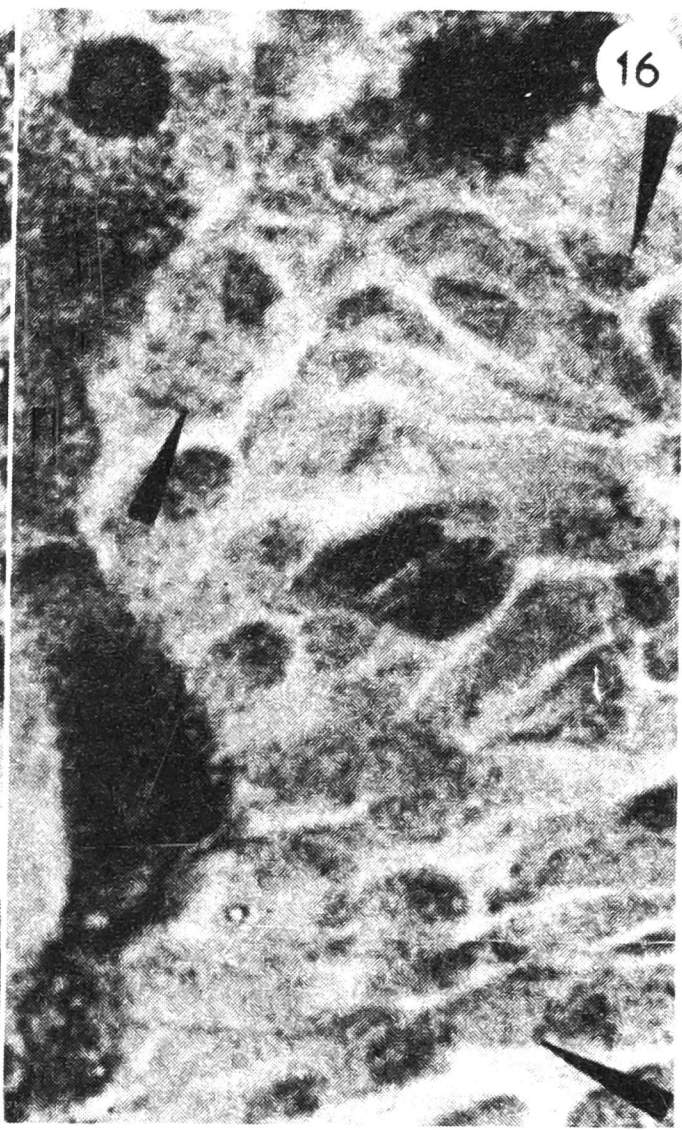
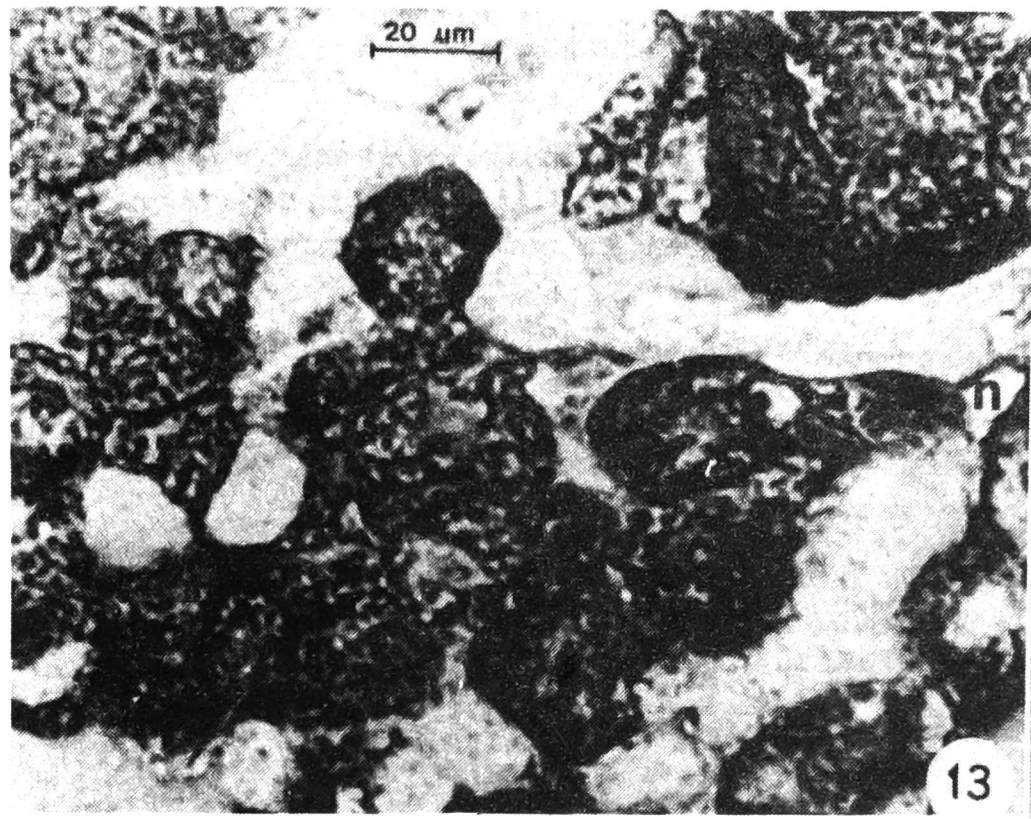


Rys. 12. Zawartość neurohormonu LHRH w podwzgórzu żab *R. temporaria* przed i w trakcie oraz po owulacji: BR - samice traktowane bromokryptyną, K - samice kontrolne

U samic preowulacyjnych i będących w trakcie owulacji poziom LHRH w badanych obszarach podwzgórza jest podobny i wyraźnie niższy / $p < 0,001$ / niż u postowulacyjnych i po złożeniu skrzeku. Być może fakt ten stanowi odbicie procesu intensywnego uwalniania neurohormonu przed i podczas, a zahamowania jego uwalniania po zakończeniu owulacji. Mimo, że podanie bromokryptyny samicom spowodowało zahamowanie owulacji, preparat ten nie wpłynął na zmianę zawartości LHRH w podwzgórzu. Stąd wydaje się, że bromokryptyna nie wpłynęła hamująco na







Rys. 3-6. Obraz neuronów immunoreaktywnych LHRH w mózgu R. temporaria. Barwienie immunohistochemiczne surowicą α -LHRH /rozc. 1:800/. Kontrolne samice preowulacyjne bezpośrednio po zakończeniu hibernacji

Rys. 3. Przekrój horyzontalny. Obszar przegrody mózgu. Bruzda mózgu po stronie lewej, III komora po stronie prawej. Skupisko ir-perikarionów, których wypustki dążą ku przodomózgowiu oraz tworzą szlaki przebiegające przez obszar przedwzrokowy ku tyłowi. Widoczny ir-materiał w pobliżu naczyń /n/

Rys. 3a. Fragment rys. 3. Materiał immunoreaktywny w pobliżu naczynia

Rys. 4. Przekrój strzałkowy. Obszar przedwzrokowy tuż przed zachyłkiem przedwzrokowym /por/ III komory. Widoczne ir-perikariony oraz włókna biegnące pod zachyłkiem ku tyłowi. Materiał immunoreaktywny w pobliżu naczyń /n/

Rys. 5. Przekrój strzałkowy. Fragment szlaku włókien immunoreaktywnych biegnącego z obszaru przegrody przez obszar przedwzrokowy w kierunku brzuszno-tylnym. Wśród włókien widoczne ir-perikariony

Rys. 5a. Kolejny skrawek pochodzący od tego samego zwierzęcia /rys. 5/. Widoczne ir-włókna przebiegające w różnych kierunkach i intensywnie wybarwiony perikarion

Rys. 6. Przekrój strzałkowy mózgu. Szlak włókien immunoreaktywnych LHRH przebiegający brzusznie w obszarze przedwzrokowym. Włókna w sąsiedztwie naczyń /n/

Rys. 7. Przekrój strzałkowy mózgu. Całkowita deafferentacja tylnej części obszaru infundibularnego podwzgórza. Samica w czasie owulacji /tab. 4/. Pośrodku ciemno zabarwiony skrzep. Wyniosłość pośrodkowa /me/ zupełnie pozbawiona materiału immunoreaktywnego: i - infundibulum, ir - recessus infundibularis

Rys. 8. Fragment rys. 7. Wyniosłość pośrodkowa całkowicie pozbawiona materiału immunoreaktywnego

Rys. 9. Przekrój strzałkowy mózgu. Fragment infundibulum i wyniosłości pośrodkowej u preowulacyjnej samicy kontrolnej /obszar analogiczny do przedstawionego na rys. 7/. Widoczne ir-LHRH włókna w infundibulum i bardzo intensywnie wybarwiona wyniosłość pośrodkowa

Rys. 10. Fragment wyniosłości pośrodkowej innej samicy kontrolnej. Widoczny materiał immunoreaktywny w sąsiedztwie naczyń

Rys. 11. Przekrój strzałkowy mózgu. Brzusznym obszar infundibulum przed miejscem uszkodzonym przez wstawienie stalowej przegrody izolującej przysadkę od podwzgórza. Samica w czasie owulacji /tab. 4/ Materiał immunoreaktywny w pobliżu bardzo rozwiniętej sieci naczyń w okolicy p. tuberalis

Rys. 13-17. Obraz komórek gonadotropowych w pars distalis przysadki mózgowej R. temporaria. Przekroje okołostrzałkowe. Tylny obszar p. distalis. Barwienie immunohistochemiczne surowicą anty-oLH /rozc. 1:160/

Rys. 13. Samica preowulacyjna z grupy kontrolnej N+nsk. Widoczne komórki wypełnione ir-granulami wydzielniczymi

Rys. 14. Samica w II fazie owulacji z grupy N+nsk. Niewielka liczba komórek wypełnionych ir-granulami. Liczne komórki zdegranulowane /strzałki/. W naczyniu krwionośnym /n/ wyraźnie widoczny materiał immunoreaktywny

Rys. 15. Samica w III /końcowej/ fazie owulacji. Reakcja immunohistochemiczna w komórkach słaba /strzałki/. Materiał ir-LH obecny w naczyniach /n/

Rys. 16. Samica preowulacyjna, operowana z grupy L+nsk. Niewielka liczba komórek zawiera ir-granule wydzielnicze /strzałki/. Intensywna reakcja w świetle naczyń krwionośnych /n/

Rys. 17. Samica preowulacyjna, nie operowana z grupy N+LHRH. Zwracają uwagę małe rozmiary komórek oraz ich słabe, rozmyte, nierównomierne zabarwienie /strzałki/

uwalnianie tego neurohormonu, a swoje działanie hamujące wywarła na poziomie przysadki. Wyniki popierające taką interpretację uzyskano ostatnio przy badaniu ryb. Bromokryptyna, podawana łącznie z wysoce aktywnym analogiem LHRH, wpływała obniżająco na stymulowany przez poziom gonadotropin we krwi *Carassius auratus* [5]. Również z badań poświęconych regulacji uwalniania gonadotropin i owulacji u ryb [4, 5] wynika, że zdolność obniżania poziomu gonadotropin we krwi przez substancje agonistyczne względem dopaminy /bromokryptyna, apomorfina/ jest większa we wczesnych stadiach rozwoju jajników niż gdy rozwój ten jest już zaawansowany. Niniejsze badania dostarczyły danych wskazujących że może tak być i u płazów.

WPŁYW LEZJI OBSZARU INFUNDIBULARNEGO PODWZGÓRZA ORAZ SUROWICY α -LHRH NA OBRAZ HISTOCHEMICZNY P.DISTALIS PRZYSADKI MÓZGOWEJ

Poszukując potwierdzenia dla tezy o dwójakiej roli podwzgórze w regulacji procesu owulacji podjęto próbę określenia wpływu lezji obszaru infundibularnego oraz surowicy α -LHRH na stan funkcjonalny komórek wydzielniczych przysadki. W tym celu gruczoły samic użytych w poprzednio opisanym doświadczeniu a pochodzących z grup: N \pm nsk, N \pm α -LHRH, L \pm nsk, oraz L \pm α -LHRH, poddano badaniom histochemicznym. Aby zmiany stanu funkcjonalnego komórek wydzielniczych p \cdot distalis określić ilościowo, na zabarwionych metodą PAS strzałkowych przekrojach gruczołu oznaczano stereologicznie [43] względną objętość (volume density) naczyń oraz komórek PAS-ujemnych i PAS-dodatnich, a wśród tych ostatnich wyróżniono dwie ich kategorie: komórki barwiące się intensywnie i komórki zdegranulowane, barwiące się bardzo słabo. Wykonano również preparaty immunohistochemiczne p \cdot distalis, przy użyciu króliczej anty-surowicy przeciwko owczemu hormonowi LH uzyskanej dzięki uprzejmości dr E. Wolińskiej-Witort.

Mimo iż obie zastosowane metody barwienia /zarówno PAS, jak i barwienie immunohistochemiczne przy użyciu surowicy anty-LH/ nie pozwalają na odróżnienie gonadotropów od tyreotropów, jednakże odpowiedni dobór obszaru przysadki do prowadzenia pomiarów wydaje się eliminować możliwy błąd. Tyreotropy bowiem u płazów są bardzo mało liczne i posiadają ściśle określoną lokalizację, ograniczoną do obszaru środkowo-brzusznego p \cdot distalis [12].

W tabeli 9 zawarto dane dotyczące wpływu lezji i surowicy α -LHRH na proces degranulacji komórek PAS-dodatnich. U kontrolnych /N \pm nsk/ samic preowulacyjnych objętość komórek słabo zabarwionych, zdegranulowanych, jest nieznaczna, rośnie natomiast wyraźnie w miarę postępowania procesu owulacji. Wyniki te potwierdza analiza preparatów zabarwionych immunohistochemicznie przy użyciu surowicy α -LH. U samic preowulacyjnych, kontrolnych, komórki silnie wypełnione ir-granulami są liczne /rys. 13/. W trakcie owulacji ich liczba spada i znacznie częściej

obserwuje się obecność materiału immunoreaktywnego w naczyniach krwionośnych /rys. 14 i 15/

Tabela 9

Wpływ lezji obszaru infundibularnego podwzgórza i podawania surowicy anty-LHRH na względną objętość komórek PAS-dodatnich intensywnie i słabo zabarwionych w pars distalis przysadki mózgowej R. temporaria

Grupa	Faza rozrodu	Liczba samic	Objętość komórek PAS +		Stosunek objętości komórek słabo/intensywnie zabarwionych
			PAS+ intensywnie zabarwione	PAS+ słabo zabarwione	
N+nsk	pre	2	26,5	8,3	0,3
	ow II f	2	11,6	30,9	2,7
	ow III f	1	4,7	43,2	9,2
	post	4	11,6 ± 4,1	34,5 ± 3,2	1,7-4,7
L+nsk	pre	2	9,5	28,8	3,0
	post	1	0,9	54,3	60,3
N+α-LHRH	pre	3	25,5 ± 1,9	9,3 ± 6,3	0,2-0,7
	ow II f	1	20,4	19,4	1,0
L+α-LHRH	pre	1	24,5	16,6	0,7
	ow III f	2	7,2	30,9	4,7
	post	1	6,9	30,8	4,5

Na zabarwionych metodą PAS kolejnych przekrojach przysadki oddalonych od siebie o ok. 40 um wybierano losowo dwa pola widzenia: z obszaru przedniego i tylnego i na nich morfometrycznie [43] oznaczano objętość /volume density/ naczyń oraz komórek PAS+ i PAS-; liczone ok. 3500 punktów testowych/gruczoł; przy tej liczbie punktów błąd pomiaru objętości nie przekracza 5%.

Lezje obszaru infundibularnego podwzgórza wyraźnie wpływają na wzrost objętości słabo barwiących się komórek PAS-dodatnich. U operowanych samic preowulacyjnych /L+nsk/ stosunek objętości komórek zdegranulowanych do intensywnie zabarwionych jest dziesięciokrotnie większy niż u nieoperowanych /N+nsk/. Również oznaki uwalniania materiału ir-LH u samic preowulacyjnych są znacznie wyraźniejsze u samic operowanych niż u kontrolnych /rys. 16/.

Podawanie surowicy α-LHRH, mające na celu immunoneutralizację endogennego neurohormonu, zahamowało degranulację komórek PAS-dodatnich, a barwienie surowicą α-LH wykazało, że w obrazie p. distalis występują pewne zmiany degeneracyjne. Komórki ir-LH są małe, obkurczone, ich zabarwienie jest rozmyte i zawierają niewiele ir-materiału /rys. 17/. Obraz ten sugeruje, że LHRH wpływa nie tylko na uwalnianie gonadotropin, lecz również najprawdopodobniej stymu-

luje ich syntezę. Tego rodzaju wpływ neurohormonu LHRH u ssaków postulowano już dawno [3], a ostatnio został on udowodniony /Jutisz, informacja ustna/.

Opisane ingerencje doświadczalne powodują więc zmianę tempa degranulacji komórek PAS-dodatnich, LH-immunoreaktywnych. Lezje przyspieszają ten proces i pojawienie się jego oznak już u samiec preowulacyjnych, a podawanie surowicy α -LHRH wpływa nań hamująco. Przedstawione wyniki badań świadczą więc o dwójakiej roli podwzgórza w kontroli uwalniania gonadotropin, a poprzez nie - w regulacji owulacji u żab.

Reasumując, badania niniejsze doprowadziły do:

- określenia rozmieszczenia neuronów ir-LHRH i ich aksonów w mózgu żaby, Rana temporaria;
- wykazania, że neurohormon LHRH może być prawdopodobnie uwalniany do ogólnego krążenia mózgowego;
- wykrycia hamującej owulację funkcji podwzgórza. Przedstawiono przesłanki, które pozwalają sądzić, że ośrodek hamujący jest zlokalizowany w okolicy przedwzrokowej /ale nie w obszarze przegrody mózgu/. Drogi aksonalne z tego ośrodka prowadziłyby przez obszar infundibularny;
- wysunięcia /i weryfikacji/ hipotezy głoszącej, że proces owulacji jest u R. temporaria pod podwójną kontrolą podwzgórzową, hamującą i pobudzającą;
- wstępnego ustalenia, że za przejściowe hamowanie owulacji może być odpowiedzialny układ dopaminergiczny. Pozostaje do ustalenia czy hamujące działanie tego układu ma miejsce na poziomie podwzgórzowych neuronów LHRH, czy też na poziomie przysadki. Podjęto dalsze badania mające na celu poszukiwanie podwzgórzowego czynnika specyficznego hamującego uwalnianie gonadotropin i w efekcie proces owulacji.

Składam serdeczne podziękowania za życzliwość i pomoc w czasie wykonywania tej pracy Prof. dr E. Domańskiemu, a także dr hab. J. Polkowskiej, doc. dr F. Przekopowi, doc. dr K. Kochmanowi oraz dr E. Wolińskiej-Witort i dr A. Zioteckiemu z I.F.Ż.Z. PAN w Jabłonie koło Warszawy.

LITERATURA

1. Allison R.M.: Failure of enforced hibernation to inhibit breeding in the frog *Rana temporaria*. *Nature* 1956, 18, 342.
2. Alpert L.C., Brawer J.R., Jackson I.M.D., Reichlin S.: Localization of LHRH in neurons in frog brain *Rana pipiens* and *Rana catesbeiana*. *Endocrinology* 1976, 98, 910-921.
3. Arimura A., Shino M., DeLaCruz K.G., Rennels E.G., Schally A.V.: Effect of active and passive immunization with luteinizing hormone-releasing hormone on serum luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone levels and the ultrastructure of the pituitary gonadotrophs in castrated male rats. *Endocrinology* 1976, 99, 291-303.
4. Chang J.P., Peter R.E.: Effects of dopamine on gonadotropin release in female goldfish *Carassius auratus*. *Neuroendocrinology* 1983, 36, 351-357.
5. Chang J.P., Peter R.E., Nahorniak C.S., Sokołowska M.: Effects of catecholaminergic agonists and antagonists on serum gonadotropin concentrations and ovulation in goldfish: Evidence for specificity of dopamine inhibition of gonadotropin secretion. *Gen. Comp. Endocrinol.* 1984, 55, 351-360.
6. Crim J.W.: Immunocytochemistry of luteinizing hormone-releasing hormone in brains of breeding eastern narrow-mouthed toads *Gastrophryne carolinensis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 1984, 79A, 283-287.
7. Daniels E., Licht P.: Effects of gonadotropin-releasing hormone on the levels of plasma gonadotropins *FSH* and *LH* in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 1980, 42, 455-463.
8. Deery D.J.: Determination by radioimmunoassay of the luteinizing hormone-releasing hormone *LHRH* content of the hypothalamus of the rat and some lower vertebrates. *Gen. Comp. Endocrinol.* 1974, 24, 280-285.
9. Dierickx K.: Experimental identification of a hypothalamic gonadotropic centre. *Z. Zellforsch.* 1966, 74, 53-79.
10. Dierickx K.: The function of the hypophysis without preoptic neurosecretory control. *Z. Zellforsch.* 1967, 78, 114-130.
11. Dierickx K.: Identification of adenohipophysiotropic neurohormone producing neurosecretory cells in *Rana temporaria*. W: *Neurosecretion - the final neuroendocrine pathway*. Eds Knowles F., Vollrath L. 1974, 170-181.
12. Doerr-Schott J.: Immunohistochemical detection by light and electron microscopy of pituitary hormones in cold-blooded vertebrates. I. Fish and amphibians. *Gen. Comp. Endocrinol.* 1976, 28, 487-512.

13. Doerr-Schott J., Dubois M.P.: Localisation et identification d'un centre LH-RF dans l'encéphale du crapaud, *Bufo vulgaris* Laur. C.R.Acad.Sci. Paris 1975, 280, ser. D, 1285-1287.
14. Doerr-Schott J., Dubois M.P.: LHRH-like system in the brain *Xenopus laevis* Daud. Immunohistochemical identification. Cell Tiss. Res. 1976, 172, 477-486.
15. Doerr-Schott J., Dubois M.P., Lichte C.: Immunohistochemical localisation of substances reactive to antisera against α - and β -endorphin and met-enkephalin in the brain of *Rana temporaria* L. Cell Tiss. Res. 1981, 217, 79-92.
16. Fuxe K., Fredholm B.B., Ögren S.O., Agnati L.F., Hökfelt T., Gustafsson J.A.: Pharmacological and biochemical evidence for the dopamine agonistic effect of bromocriptine. Acta Endocrinol. 1978, suppl. 88, 27-56.
17. Gaudino G., Fasolo A.: Substance P-related peptides in the hypothalamus of amphibia. Cell Tiss. Res. 1980, 211, 241-250.
18. Goos H.J.T.: Hypophysiotropic centers in the brain of amphibians and fish. Amer. Zool. 1978, 18, 401-410.
19. Goos H.J.T., Ligtenberg P.J.M., van Oordt P.G.W.J.: Immunofluorescence studies on gonadotropin releasing hormone /GRH/ in the fore-brain and the neurohypophysis of the green frog *Rana esculenta*. Cell Tiss. Res. 1976, 168, 325-333.
20. Jokura Y., Urano A.: An immunohistochemical study of seasonal changes in luteinizing hormone-releasing hormone and vasotocin in the forebrain and the neurohypophysis of the toad, *Bufo japonicus*. Gen. Comp. Endocrinol. 1985, 59, 238-245.
21. Juszczak W.: Rozwój narządu rozrodczego samicy żaby trawnej /*Rana temporaria* L./ w cyklu rocznym. Ann. UMCS, Lublin 1959, 14, 169-231.
22. Juszczak W., Kabała B., Krawczyk S.: Changes in the histological structure of the oviducts of the common frog /*Rana temporaria* L./ in the yearly cycle. Acta Biol. Cracov. Zool. 1972, 15, 59-66.
23. Kemali M., Braitenberg V.: Atlas of the frog's brain. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1969, 1-74.
24. Kerdelhué B., Lenoir V., Pasqualini C., El Abed A., Millar R.P.: Rôle modulateur de la substance P, un undecapeptide, dans l'excrétion des gonadotropines hypophysaires induites par le GnRH. W: Multihormonal regulations in neuroendocrine cells. Eds Tixier-Vidal A., Richard Ph., INSERM, Paris, 1983, 221-240.
25. Kerdelhué B., Tartar A., Lenoir V., El Abed A., Hublau P., Millar R.P.: Binding studies of substance P anterior pituitary binding sites: changes in substance P binding sites during the rat estrous cycle. Regulatory Peptides 1985, 10, 133-143.

26. King J.A., Millar R.P.: Heterogeneity of vertebrate luteinizing hormone-releasing hormone. *Science* 1979, 206, 67-69.
27. King J.A., Millar R.P.: Hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone content in relation to the seasonal reproductive cycle of *Xenopus laevis*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 1979, 39, 303-312.
28. King J.A., Millar R.P.: Comparative aspects of luteinizing hormone-releasing hormone structure and function in vertebrate phylogeny. *Endocrinology* 1980, 106, 707-717.
29. Knigge K.M.: The seven windows of the brain. *Karger Gazette* 1975, 32.
30. Krawczyk S.: Changes in the lipid and water content in some organs of the common frog /*Rana temporaria* L./ in the annual cycle. *Acta Biol. Cracov. Zool.* 1971, 14, 211-237.
31. McCreery B.R., Licht P.: Induced ovulation and changes in pituitary responsiveness to continuous infusion of gonadotropin-releasing hormone during the ovarian cycle in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Biol. Reprod.* 1983, 29, 863-871.
32. Peter R.E.: Evolution of neurohormonal regulation of reproduction in lower vertebrates. *Amer. Zool.* 1983, 23, 685-695.
33. Peter R.E.: The brain and neurohormones in teleost reproduction. W: *Fish physiology* 1983, IX, 97-135, Acad. Press Inc.
34. Peter R.E., Crim L.W., Goos H.J.T., Crim J.W.: Lesioning studies on the gravid female goldfish: neuroendocrine regulation of ovulation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 1978, 35, 391-401.
35. Peter R.E., Paulencu C.R.: Involvement of the preoptic region in gonadotropin release-inhibition in goldfish, *Carassius auratus*. *Neuroendocrinology* 1980, 31, 133-141.
36. Peter R.E., Nahorniak C.S., Chang J.P., Crim L.W.: Gonadotropin release from the pars distalis of goldfish, *Carassius auratus*, transplanted beside the brain ventricles: additional evidence for gonadotropin-release inhibitory factor. *Gen. Comp. Endocrinol.* 1984, 55, 33-346.
37. Pfeiffer A., Herz A.: Endocrine actions of opioids. *Horm. Metab.* 1984, 16, 386-397.
38. Sotowska-Brochocka J.: Role of the hypothalamus in the control of ovulation in *Rana temporaria* L. *Acta Physiol. Pol.* 1983, 34, 621-624.
39. Stacey N.E., Peter R.E., Cook A.F., Truscott B., Walsh J.M., Idler D.R.: Changes in plasma concentrations of gonadotropin, 17 β -estradiol, testosterone, and 17 α -hydroxy-20 β -dihydroprogesterone during spontaneous and brain lesion induced ovulation in goldfish. *Can. J. Zool.* 1983, 61, 2646-2652.
40. Su T., Yu Lan W.: L'hibernation, facteur déterminant de la maturation ovulaire chez le crapaud /*Bufo bufo asiaticus*/. *Sci. Sin.* 1953, 12, 1161-1164.

41. Su T., Yu Lan W.: La succession d'ovogenèse et l'impossibilité de maturation ovulaire chez le crapaud femelle élevée dans le milieu à haute température pendant toute une année. *Sci. Sin.* 1963, 12, 1165-1168.
42. Thornton V.E., Geschwind I.I.: Hypothalamic control of gonadotropin release in amphibia: evidence from studies of gonadotropin release in vitro and in vivo. *Gen. Comp. Endocrinol.* 1974, 23, 294-301.
43. Weibel E.R.: Principles and techniques of electron microscopy biological applications. Ed. Hayat M.A., Van Nostrand Reinhold Company, N. York-Cincinnati-Toronto-London-Melbourne, 1973, vol. 3.
44. Yui R.: Immunohistochemical studies on peptide neurons in the hypothalamus of the bullfrog *Rana catesbeiana*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 1983, 49, 195-209.

J. Sotowska-Brochocka

HYPOTHALAMIC CONTROL OF OVULATION IN RANA TEMPORARIA L.

Summary

Investigations carried out on the hypothalamic control of ovulation in *Rana temporaria* L. led to the following results:

1. Showed existence of an inhibitory action of hypothalamus on the onset of ovulation during hibernation; this inhibitory action originates probably in the preoptic region;

2. Put forward the thesis about dual - stimulatory and inhibitory - role of hypothalamus in the control of ovulation; LHRH exerted a stimulatory, while the nature of inhibiting role as yet was not ascertained;

3. The experiments on the induction of ovulation with LHRH during hibernation as well as on the inhibition of ovulation during post hibernation with a dopamine agonist /bromocriptine/ showed that the inhibitory action of ovulation in hibernating animals was being displayed also on the pituitary level;

4. The ovulatory process was associated with low level of hypothalamic LHRH /post ovulatory content of LHRH in hypothalamus was markedly higher/; on the other hand it was associated with the degranulation of the pituitary gonadotrops;

5. Immunohistochemical studies demonstrated the presence ir-LHRH within neuronal perikarya located in the median septal nucleus and in preoptic area rostrally to the preoptic recess and in their axons which project to the median eminence. Protrusions of ir-cells in contact with

blood vessels were observed not only in median eminence but also in the other brain regions containing these cells.

Ё. Сотовска-Брохоцка

РОЛЬ ГИПОТАЛАМУСА В РЕГУЛЯЦИИ ОВУЛЯЦИИ У ЛЯГУШКИ,
RANA TEMPORARIA L.

Р е з ю м е

Исследовали роль гипоталамуса в регуляции овуляции у *R. temporaria*.

Полученные результаты показывают, что:

1. у самок лягушек гипоталамус тормозит процесс овуляции. На основании операционных опытов установлено, что тормозящая функция происходит из передней части гипоталамуса;

2. функция гипоталамуса в регуляции овуляции у лягушек двойная – возбуждающая и тормозящая. Неврогормон LHRH стимулирует овуляцию. Натура тормозящего фактора неизвестна;

3. исследования свидетельствуют о том, что тормозящая функция существует не только на уровне гипоталамуса, но также и на уровне гипофиза;

4. во время овуляции концентрация неврогормона LHRH (определенная радиоиммунологическим методом) в гипоталамусе низкая – растет после овуляции; во время овуляции имеет место также дегрануляция гонотропов гипофиза;

5. результаты иммуногистохимических исследований показывают, что перикарионы LHRH находятся в *nucleus medianus septi* и в районе *nucleus preopticus* их аксоны бегут к медиальному возвышению. Нервные волокна LHRH находятся не только в медиальном возвышении вблизи кровеносных сосудов, но также в других районах гипоталамуса.