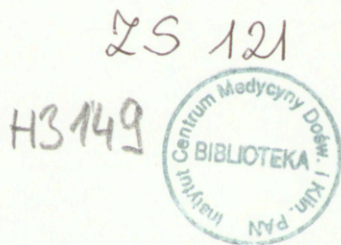


Andrzej Loesch

ZMIANY ULTRASTRUKTURALNE I IMMUNOCYTOCHEMICZNE NEUROSEKRECYJNEGO
UKŁADU PODWZGÓRZOWO-PRZYSADKOWEGO ORAZ SPLOTU AUERBACHA JELITA
KRĘTEGO SZCZURA W DOŚWIADCZALNEJ CUKRZYCY INSULINOZALEŻNEJ



Z Pracowni Ultrastruktury Układu Nerwowego kierowanej przez
Prof. Jerzego W. Borowicza - Instytut Centrum Medycyny
Doświadczalnej i Klinicznej Polskiej Akademii Nauk,
ul. Dworkowa 3, 00-784 Warszawa

Praca wykonana na stopień doktora habilitowanego
nauk przyrodniczych

Warszawa 1986

SPIS TREŚCI

PRZEDMOWA	3
WSTĘP	4
Układ podwzgórzowo-przysadkowy.....	5
Splot Auerbacha.....	12
Streptozotocyna a cukrzyca.....	18
CEL PRACY	23
MATERIAŁ I METODY	24
Badania konwencjonalne.....	25
Badania immunocytochemiczne.....	25
WYNIKI	31
Stan ogólny STZ-diabetycznych szczurów.....	31
Badania konwencjonalne.....	31
- Układ podwzgórzowo-przysadkowy/STZ-niediabetyczne szczury.....	31
- Splot Auerbacha/STZ-niediabetyczne szczury.....	33
- Układ podwzgórzowo-przysadkowy/STZ-diabetyczne szczury.....	33
- Splot Auerbacha/STZ-diabetyczne szczury.....	36
Badania immunocytochemiczne.....	36
- Układ podwzgórzowo-przysadkowy/STZ-niediabetyczne szczury.....	36
- Splot Auerbacha/STZ-niediabetyczne szczury.....	38
- Układ podwzgórzowo-przysadkowy/STZ-diabetyczne szczury.....	38
- Splot Auerbacha/STZ-diabetyczne szczury.....	41
DYSKUSJA	42
Układ podwzgórzowo-przysadkowy.....	42
- Badania konwencjonalne.....	42
- Badania immunocytochemiczne.....	50
Splot Auerbacha.....	57
- Badania konwencjonalne i immunocytochemiczne.....	57
WNIOSEK	62
PIŚMIENNICTWO	64

PRZEDMOWA

Niniejsza rozprawa habilitacyjna powstała dzięki rocznemu stypendium naukowemu przyznanego autorowi w latach 1983/1984 przez Fundację Wellcome Trust do pracy w kierowanym przez Pana Prof. Geoffreya Burnstocka Zakładzie Anatomii i Embriologii i Centrum dla Neuronauki (Department of Anatomy and Embryology and Centre for Neuroscience) Uniwersytetu Londyńskiego i jest wynikiem osobistych badań i przemyśleń.

Korzystając z okazji pragnę wyrazić serdeczne podziękowanie Fundacji Wellcome Trust za sfinansowanie mojego pobytu w Anglii i możliwość pracy na Uniwersytecie Londyńskim. Szczególnie dziękuję Panu Prof. G. Burnstockowi za umożliwienie poznania nowych technik badawczych oraz za niezwykle miłą i obopólnie korzystną współpracę która zaowocowała wspólnymi publikacjami. Panu Prof. G. Burnstockowi dziękuję również za sfinansowanie 6-cio tygodniowego pobytu na Uniwersytecie Londyńskim jesienią 1985r, który między innymi miał na celu podsumowanie wyników badań dotyczących niniejszej rozprawy. Pragnę też podziękować Pani Dr. Jill Lincoln oraz Pani Dr. Abi Belai za bezpośrednią współpracę nad zagadnieniami które dotyczą przedstawianej rozprawy. Panu Dr. Johnowi Parnavelasowi dziękuję za dostarczenie przeciwciała na oksytocynę. Ponadto, dziękuję Panu Prof. Mirosławowi J. Mossakowskiemu za pomoc w uzyskaniu stypendium z Fundacji Wellcome Trust, a Panu Prof. Jerzemu W. Borowiczowi za cenne rady i wskazówki przy redagowaniu manuskryptu oraz za pomoc w przedłożeniu niniejszej rozprawy habilitacyjnej Wysokiej Radzie Naukowej Uniwersytetu Jagiellońskiego.

WSTĘP

Przedmiotem niniejszej rozprawy jest ultrastrukturalna organizacja elementów neuronalnych neurosekrecyjnego układu podwzgórzowo-przysadkowego i splotu Auerbacha szczura z doświadczalnie wywołaną cukrzycą insulinozależną. Neurosekrecyjny układ podwzgórzowo-przysadkowy ssaków stanowi integralną część ośrodkowego układu nerwowego (Scharrer i Scharrer, 1940), natomiast splot Auerbacha jest integralną częścią tzw. jelitowego (wewnętrznego, śródściennego) układu nerwowego przewodu pokarmowego (Bayliss i Starling, 1899) należącego do obwodowego - autonomicznego - układu nerwowego. Zdaniem Gershona (1981), jelitowy układ nerwowy można rozpatrywać nawet w kategoriach samodzielnego układu nerwowego. Za takim poglądem przemawia między innymi możliwość wzbudzenia tzw. "miejscowego mechanizmu nerwowego" *in vitro* celem wywołania odruchu perystaltycznego (Trendelenburg, 1917). Zdolność wywołania tego odruchu *in vitro* tzn. bez udziału informacji pochodzącej z ośrodkowego układu nerwowego wskazuje, że przewód pokarmowy może mieć własne receptory czuciowe, wewnętrzne pierwszorzędowe neurony dośrodkowe, interneurony i neurony motoryczne (Gershon, 1981). Jeśli chodzi o aspekty fizjologiczne, to najogólniej rzecz biorąc neurosekrecyjny układ podwzgórzowo-przysadkowy jest odpowiedzialny między innymi za utrzymywanie homeostazy wodnej organizmu. Natomiast splot Auerbacha ma swój udział w kontroli działania przewodu pokarmowego - kontroli motoryki poszczególnych jego odcinków w procesie trawienia.

Jakiegokolwiek odbiegające od normy zmiany czynnościowe tak układu podwzgórzowo-przysadkowego jak i splotu Auerbacha mogą prowadzić do poważnych następstw fizjologicznych o zasięgu ogólnoustrojowym.

Układ podwzgórzowo-przysadkowy

Neurosekrecyjny układ podwzgórzowo-przysadkowy ssaków jest jednym z najlepiej poznanych systemów neuroendokrynnych ośrodkowego układu nerwowego. W skład tego układu wchodzi zasadniczo trzy obszary mózgu, a mianowicie: jądro nadwzrokowe (nucleus supraopticus, SON) i jądro przykomorowe (nucleus paraventricularis, PVN) przedniej części podwzórza oraz przysadka nerwowa (neurohypophysis, NHP). NHP jest połączona anatomicznie i fizjologicznie z SON i PVN za pośrednictwem bezmielinowych wypustek osiowych (aksonów) odchodzących od neurocytów sekrecyjnych występujących w SON i PVN. Aksony neurocytów SON tworzą szlak nadwzrokowo-przysadkowy (tractus supraoptico-hypophysealis), natomiast aksony neurocytów PVN tworzą szlak przykomorowo-przysadkowy (tractus paraventriculo-hypophysealis). Końcowe odcinki obu wspomnianych szlaków stanowią histologiczny składnik NHP (ok. 42%) obok komórek glejopodobnych - pituicytów i obfitej sieci naczyniowej.

Neurocyty sekrecyjne SON i PVN, które dają początek układowi podwzgórzowo-przysadkowemu, posiadają zdolność syntezy, transportu i wydzielania do krwi wazopresyny (VP) i oksytocyny (OT) - dwóch głównych (klasycznych) hormonów peptydowych NHP (Scharrer i Scharrer, 1940, 1954; Bargmann,

1949, 1954; Bargmann i Scharrer, 1951; Schiebler, 1952; Pardoe i Weatheral, 1955; Bindler i wsp., 1967; La Bella, 1968). Właściwości fizjologiczne VP dotyczą przede wszystkim jej działania antydiuretycznego poprzez pobudzanie reabsorpcji wody w cewce dystalnej nefronu. W dużych dawkach może ona wywoływać również skurcz mięśni gładkich i podnosić ciśnienie tętnicze krwi. Natomiast główna właściwość OT dotyczy jej działania na mięśnie gładkie, szczególnie macicy i gruczołów mlecznych.

Wraz z rozwojem metod immunocytochemicznych wykazano, że VP i OT są syntetyzowane w odrębnych neurocytach SON i PVN skąd oba te hormony (i ich nośnikowe białka - neurofizyny) są transportowane do NHP odrębnymi aksonami sekrecyjnymi (De Mey i wsp., 1974; Swaab i wsp., 1975; Vandesande i Dierickx, 1975, 1976; Vandesande i wsp. 1975; Choy i Watkins, 1977). Zatem, w zjawisku syntezy, transportu i wydzielania do krwi obu wspomnianych hormonów uczestniczą dwie populacje wyżej wymienionych neuronów sekrecyjnych (Ryc. A/1-8/).

Należy tutaj podkreślić fakt, że neurony VP- i OT-ergiczne SON i PVN ssaków (wołu i szczura) były jednymi z pierwszych peptydergicznych komórek nerwowych zidentyfikowanych immunocytochemicznie w ośrodkowym układzie nerwowym (De Mey i wsp., 1974; Swaab i wsp., 1975; Vandesande i Dierickx, 1975; Vandesande i wsp., 1975). Od tego momentu przeciwciała skierowane na VP i OT zastosowano w licznych badaniach układu podwzgórzowo-przysadkowego bazujących głównie na immunocytochemicznej metodzie peroksydaza-

antyperoksydaza (PAP) Sternbergera i wsp. (1970). Zdecydowana większość tych badań dotyczyła organizacji SON i PVN na poziomie mikroskopu świetlnego (Zimmerman i Antunes, 1976; Choy i Watkins, 1977; Vandesande i wsp., 1977, Armstrong i wsp., 1980; Dierickx, 1980; Sofroniew i Glasmann, 1981; Kawata i wsp., 1983; Ibata i wsp., 1984; Luppi i wsp., 1984; Loesch, 1985). Badania o których mowa, a szczególnie te przeprowadzone przez De Mey i wsp. (1974), Vandesande i Dierickx (1975, 1976) oraz Vandesande i wsp. (1977) dostarczyły podstawowe dane odnośnie cytoarchitektury VP- i OT-ergicznych neuronów jak i ich rozproszenia w SON i PVN.

Wiadomo zatem, że neurony VP- i OT-ergiczne są komórkami wielobiegunowymi. Z perykarionu tych komórek odchodzi zazwyczaj jeden akson i kilka dendrytów różnie ukierunkowanych. Wzajemne podobieństwo morfologiczne dendrytów i aksonów niejednokrotnie utrudnia ich identyfikację w mikroskopie świetlnym. Niektóre obserwacje wskazują na to, że aksony mogą również odchodzić z proksymalnej części dendrytu (Sofroniew i Glasmann, 1981; Loesch, 1985).

Badania immuno-ultrastrukturalne neuronów VP- i OT-ergicznych nie są tak liczne jak w przypadku mikroskopii świetlnej. Dotychczasowe dane pochodzą z badań ultrastrukturalnych w których zastosowano metodę PAP. Jeżeli chodzi o PAP-dodatnie VP-ergiczne neurony to badano je u myszy, szczura i świnki morskiej (Le Clerc i Pelletier, 1974; Aspeslagh i wsp., 1976; Castel i Hochman, 1976; Silverman, 1976; Krisch, 1977; Van Leeuwen i Swaab, 1977;

Piekut, 1983; Silverman i wsp., 1983). Badaniami tymi objęto perykariony w SON i PVN oraz aksony w NHP. Natomiast PAP-dodatnie OT-ergiczne neurony - zbadano perykariony w SON i PVN szczura (Theodosias i Poulain, 1984; Loesch, 1985), aksony w NHP szczura (Aspeslagh i wsp., 1976; Van Leeuwen i Swaab, 1977) oraz aksony szlaku podwzgórzowo-przysadkowego świnki morskiej (Silverman, 1976).

Na podstawie powyższych badań stwierdzono, że neurony zawierające VP i OT charakteryzują się dużym jądrem komórkowym z wyraźnie widocznym jąderkiem i posiadają obfitą cytoplazmę. Najbardziej charakterystycznymi organelami cytoplazmatycznymi tych neuronów sekrecyjnych są pęcherzyki sekrecyjne tzw. ziarnistości neurosekrecyjne (NSG) o średnicy 0.1 - 0.3 μm . NSG występują w zmiennej liczbie w perykarionach i aksonach SON i PVN ale dominują w zakończeniach aksonów sekrecyjnych w NHP czyli w miejscu wydzielania VP i OT do układu naczyniowego. Organelle o których mowa transportują i przechowują VP i OT w obrębie układu podwzgórzowo-przysadkowego. Niedawne badania immuno-ultrastrukturalne w których użyto monoklonalne przeciwciało na VP (Silverman i wsp., 1983) i poliklonalne przeciwciało na CT (Loesch, 1985), wskazują na występowanie NSG również w dendrytach. Obecność i rola NSG w dendrytach są niewyjaśnione (Silverman i Pickard, 1983). Przyczyna dla której NSG są obecne w niektórych dendrytach mógłby być fakt, że z tych dendrytów odchodzą aksony (Loesch, 1985). Oznaczałoby to możliwość przepływu NSG z perykarionu poprzez dendryt do aksonu (i w konsekwencji do NHP). Wydaje się jednak, że przyjęcie lub odrzucenie takiej hipotezy można dokonać

dopiero po bardzo wnikliwej analizie immuno-ultrastrukturalnej tych odcinków dendrytów z których odchodzą podobne do aksonów wypustki (Loesch, 1985).

Układ podwzgorzowo-przysadkowy ssaków stanowi pod względem anatomicznym i fizjologicznym skomplikowany system w obrębie którego występuje kilka rodzajów czynnych biologicznie peptydów i co się z tym wiąże - kilka typów neuronów sekrecyjnych. Oprócz VP i OT, w neurocytach i włóknach nerwowych SON a szczególnie PVN zidentyfikowano inne biologicznie czynne peptydy takie jak np.: angiotensyna II, cholecystokinina (CCK), kortykoliberyna (CRF), somatostatyna (SRIF), wazoaktywny polipeptyd jelitowy (VIP), tyroliberyna (TRH/TRP), dynorfina, gastryna, glukagon, leu- i met-enkefalina, neurotensyna, renina, kortykotropina (ACTH/1-39/), beta-endorfina i substancja P (artykuły przeglądowe: Silverman i Pickard, 1983; Silverman i Zimmerman, 1983; Swanson i Sawchenko, 1983; Ibata i wsp., 1984; Sofroniew i wsp., 1984). Analogicznie, oprócz VP i OT czynne biologicznie peptydy zidentyfikowano w NHP. Są to: CRF, SRIF, CCK, hormon uwalniający hormon luteinizujący (LH-RH) oraz leu- i met-enkefalina (Van Leeuwen i wsp., 1979, 1983, Deschapper i wsp., 1983; Martin i wsp., 1983; Lengvári i wsp., 1985). Przedstawiono również dowody świadczące o współwystępowaniu niektórych peptydów w obrębie tego samego neuronu. Zjawisko to dotyczy także VP- i OT-ergicznych neuronów. Stwierdzono np. współwystępowanie beta-lipotropiny i VP (Joseph i Sternberger, 1979), ACTH/1-39/ i VP (Joseph i Sternberger, 1979), CCK i OT (Vanderhaeghen i wsp., 1981), dynorfiny

i VP (Watson i wsp., 1982), reniny i OT (Calza i wsp., 1982), substancji P i VP (Stoeckel i wsp., 1982) oraz leu- i met-enkefalinę wraz z VP lub OT (Martin i wsp., 1983).

Zagadnienie unerwienia - wstępującej do SON i PVN projekcji, obszernie omówiono w kilku niedawnych publikacjach (Morris, 1983; Sawchenko i Swanson, 1983; Silverman i Pickard, 1983; Swanson i Sawchenko, 1983). Liczne jądra pnia mózgu, układu limbicznego oraz podwzgórza biorą główny udział w tej projekcji a więc w sposób dominujący uczestniczą w kontroli synaptycznej układu podwzgórzowo-przysadkowego. Swanson i Sawchenko (1983) wskazują na około 30 biologicznie czynnych substancji o charakterze neurohumorów (mediatorów synaptycznych) mogących kontrolować działanie tego układu. Należy tutaj wymienić przede wszystkim klasyczne mediatory synaptyczne jak np. acetylocholina (ACh), serotonina (5-HT), adrenalina i noradrenalina. Również niektóre peptydy jak np. SRIF, VIP, ACTH/1-39/, angiotensyna II, beta-endorfina i substancja P mogą spełniać rolę mediatorów synaptycznych w SON czy PVN (Fuxe i wsp., 1976; Bloom i wsp., 1978; Changaris i wsp., 1978; Ljungdahl i wsp., 1978; Kilcoyne i wsp., 1980; Sims i wsp., 1980; Finley i wsp., 1981; Sawchenko i wsp., 1982; Johansson i wsp., 1984).

Na podstawie immuno-ultrastrukturalnych badań stwierdzono, że wstępujące do SON i PVN włókna nerwowe tworzą akso-somatyczne, akso-dendrytyczne i akso-aksonalne synapsy z neuronami VP- i OT-ergicznymi (Piekut, 1983; Silverman i wsp., 1983; Loesch, 1985). Synapsy te wykazują zarówno asymetryczną jak i symetryczną charakterystykę.

Według Graya (1959) synapsa asymetryczna (typ I) jest związana z pobudzaniem impulsu nerwowego, natomiast synapsa symetryczna (typ II) - ze zjawiskiem jego hamowania. Ultrastrukturalne badania morfologiczne dotyczące związku pomiędzy specyficznymi typami neuronów sekrecyjnych (VP- i OT-ergicznymi) i specyficznymi pod względem zawartości neurohumorów zakończeniami synaptycznymi utworzonymi na danym typie neuronu nie są zaawansowane. Wynika to z trudności technicznych związanych między innymi z możliwością jednoczesnego wyznakowania oznaczanych elementów neuronalnych. Pewne nadzieje na rozwiązanie tej niewiadomej daje ewentualne zastosowanie do tego typu badań immunocytochemicznej metody znakowania antygenów tkankowych cząsteczkami złota (metoda immuno-gold). Niektóre porównawcze badania immunocytochemiczne wskazują jednak na to, że włókna nerwowe zawierające hydrolazę beta-dopaminową, 5-HT lub ACTH/1-39/ występują głównie w tych obszarach SON i PVN w których dominują neurony zawierające OT (McNeill i Sladek, 1980; Sawchenko i Swanson, 1981; Sawchenko i wsp., 1982).

Podczas ostatnich 20 lat badań nad neurosekrecyjnym układem podwzgórzowo-przysadkowym ssaków wiele uwagi poświęcono między innymi badaniom homozygotycznych szczurów odmiany Brattleboro z zespołem moczówki prostej (diabetes insipidus). Te szczególne zwierzęta są interesujące z klinicznego punktu widzenia bowiem posiadają genetycznie uwarunkowany dziedziczący się defekt podwzgórza który powoduje między innymi wzmożoną diurezę prowadzącą do chronicznego odwodnienia organizmu (Valtin i Schroeder, 1964; Sokol i Valtin, 1965; Valtin

i wsp., 1965; Moses i Miller, 1970; Kalimo i Rinne, 1972; Vandesande i Dierickx, 1976; Tasso i wsp., 1977; Tasso i Rua, 1978; Richter i Schmale, 1984). Z badań o których mowa jednoznacznie wynika, że wzmożona diureza i chroniczne odwodnienie szczurów Brattleboro jest związane z niezdolnością sekrecyjnych neurocytów podwzgórza do syntezy VP (Vandesande i Dierickx, 1975, 1976).

Splot Auerbacha

Jelitowy układ nerwowy (enteric nervous system) można zdefiniować jako wewnętrzne - śródścienne - unerwienie przewodu pokarmowego. Mózgiem tego unerwienia - jak to określił jeden z czołowych badaczy tego zagadnienia Dr. Giorgio Cabella (1982) - są zwoje nerwowe splotu śródmięśniowego Auerbacha (plexus myentericus Auerbachi) i zwoje nerwowe splotu podśluzowego Meissnera (plexus submucosus Meissneri). Splot Auerbacha, którego czynność jest związana z samodzielną motoryką przewodu pokarmowego, znajduje się pomiędzy zewnętrzną warstwą podłużną i wewnętrzną warstwą okrężną mięśni gładkich. Natomiast splot Meissnera, który przede wszystkim reguluje czynności wydzielnicze błony śluzowej (tunica mucosa), umiejscowiony jest pomiędzy wewnętrzną warstwą okrężną mięśni gładkich i podśluzową błoną mięśniową (lamina muscularis mucosae). Wokół splotu Meissnera występuje obfitująca w kolagen podśluzowa tkanka łączna (tela submucosa).

Zwoje splotu Auerbacha i Meissnera są połączone między sobą pęczkami włókien nerwowych tworzących na wzór siatki unerwienie rozciągające się w ścianie przewodu pokarmowego

od przełyku poprzez żołądek aż do końcowego odcinka jelita grubego. Do siatki tego unerwienia dochodzą także z zewnątrz włókna nerwowe (ang. extrinsic nerves) układu współczulnego (włókna pozazwojowe splotu trzewnego hamujące aktywność sekrecyjną, napięcie mięśni i perystaltykę) oraz włókna nerwowe układu przywspółczulnego (włókna przedzwojowe nerwu błędnego pobudzające aktywność sekrecyjną, napięcie mięśni i perystaltykę). Zatem splot Auerbacha i Meissnera jest połączony z ośrodkowym układem nerwowym poprzez nerwy współczulne i przywspółczulne zawierające zarówno czuciowe jak i motoryczne włókna nerwowe. W poszczególnych odcinkach przewodu pokarmowego sploty o których mowa wykazują pewną zmienność morfologiczną i fizjologiczną. Podkreślić jednak należy, że dane dotyczące organizacji śródściennego unerwienia przewodu pokarmowego pochodzą przede wszystkim z badań przeprowadzonych na splotcie Auerbacha.

Zwoje splotu Auerbacha, które są zazwyczaj większe niż zwoje splotu Meissnera, są kompozycją perykarionów komórek nerwowych (ok. 50 neurocytów) otoczonych obfitym neuropilem w którym aksony, dendryty i komórki glejowe ułożone są względem siebie w sposób zwarty (Gabella, 1972; Cook i Burnstock, 1976a,b). Ta specyficzna zwarta organizacja zwoju związana jest z nieobecnością przestrzeni międzykomórkowej jak i z brakiem perineurium i endoneurium. Ponadto, komórki glejowe wspierające zwoje Auerbacha przypominają w większym stopniu komórki astrogleju ośrodkowego układu nerwowego niż komórki Schwanna innych obszarów obwodowego układu nerwowego (Gabella, 1971; Cook i Burnstock, 1976b).

Zwoje Auerbacha są także niezwykle z tego względu, że nie są penetrowane przez naczynia krwionośne i tkankę łączną (całkowity brak kolagenu); te elementy histologiczne występują wyłącznie na obrzeżu zwojów (Gabella, 1972). Omawiane zwoje wykazują zatem ultrastrukturalną organizację odmienną od tej obserwowanej w innych obszarach obwodowego lub ośrodkowego układu nerwowego (Baungarten i wsp., 1970; Gabella, 1972, 1979, 1981, 1982; Gershon, 1981).

Jednym z najbardziej fascynujących i zarazem najistotniejszych zagadnień dotyczących fizjologii splotu Auerbacha a także całego śródściennego unerwienia przewodu pokarmowego jest możliwość rozróżnienia i sklasyfikowania jego neuronów i włókien nerwowych (aksonów). Wiadomo jest, że splot Auerbacha zawiera liczne typy neuronów, które można rozróżnić na podstawie cech morfologicznych (Gunn, 1959, 1968; Schofield, 1968; Fehér i Vajda, 1972), histochemicznych - reakcja na cholinesterazę i oksydazę monoaminową (Sutherland, 1967; Furness i Costa, 1971), podatność na barwienie solami srebra (Schofield, 1968) lub na podstawie właściwości elektrofizjologicznych (Nishi i North, 1973; Hirst i wsp., 1974; Wood, 1975, 1979). Ultrastrukturalnie rozróżniono w splocie Auerbacha 9 typów neuronów stosując takie kryteria jak: wielkość perykarionu, rozproszenie organelli cytoplazmatycznych, umiejscowienie neuronu w splocie oraz związek neuronu z komórkami satelitarnymi (Cook i Burnstock, 1976a). Zakończenia aksonów zakwalifikowano do 8 typów (Cook i Burnstock, 1976a) lub 10 (Furness i Costa, 1980) na podstawie takich cech jak ich rozmiar, kształt oraz obecność określonego

rodzaju pęcherzyków synaptycznych. Informacje dotyczące podstaw klasyfikacji aksonów splotu Auerbacha znaleźć można w pracach: Burnstock (1981) oraz Komuro i wsp. (1982).

Należy w tym momencie wspomnieć, że aksony o których mowa - to tzw. włókna żyłakowate (ang. varicose fibres), które charakteryzują się specyficzną budową. Mianowicie, wzdłuż ich przebiegu występują żyłakowate rozszerzenia (ang. varicosities) obfitujące w różnego rodzaju pęcherzyki synaptyczne. Te żyłakowate odcinki aksonów nie są pokryte wypustkami komórek glejowych i z tego względu są one najprawdopodobniej miejscami uwalniania neurohumorów kontrolujących działanie mięśni gładkich ściany przewodu pokarmowego. Odcinki aksonów między żyłakowatymi rozszerzeniami (ang. intervaricosities, intervaricose segments) na ogół nie posiadają pęcherzyków synaptycznych natomiast wykazują obecność mikrotubul. Końcowe odcinki aksonów o których mowa tworzą w obrębie zwojów Auerbacha liczne połączenia z perykarionami, dendrytami i kolcami dendrytów oraz z komórkami glejowymi i ich wypustkami.

W zwojach Auerbacha obserwowanych w mikroskopie elektronowym, zakończenia aksonów i ich żyłakowate odcinki zawierają małe i duże pęcherzyki granularne oraz małe agranularne. Niektóre profile aksonów, posiadające przede wszystkim duże pęcherzyki granularne przypominają włókna nerwowe zawierające polipeptydy (włókna typu-p) w ośrodkowym układzie nerwowym (Taxi, 1965; Baumgarten i wsp., 1970; Probert i wsp., 1981). Na podstawie specyficznych reakcji immunocytochemicznych wykazano, że miejscem przechowywania

niektórych peptydów w aksonach splotu Auerbacha są duże pęcherzyki granularne (Larsson, 1977; Leander i wsp., 1981; Probert i wsp., 1981, 1983; Hoyes i wsp., 1982).

Wiadomo jest obecnie, że splot Auerbacha jest złożonym układem w skład którego wchodzi kilka typów neuronów (Baumgarten i wsp., 1970; Cook i Burnstock, 1976a; Gabella, 1972, 1979; Gershon, 1981; Komuro i wsp., 1982). Obok neuronów zawierających monoaminy, kwasy aminowe i nukleotydy purynowe (np. ATP) liczne biologicznie czynne peptydy zidentyfikowano tak w obrębie zwojów jak i we włóknach nerwowych pomiędzy zwojami. Występują tutaj takie peptydy jak: VIP, SRIF, CCK, gastryna, enkefaliny, bombezyna, polipeptyd trzustkowy i neuropeptyd Y (Hökfelt i wsp., 1975; Bryant i wsp., 1976; Elde i wsp., 1976; Larsson i wsp., 1976; Larsson, 1977; Polak i wsp., 1977; Jessen i wsp., 1980; Schultzberg i wsp., 1980; Furness i wsp., 1983; Costa i wsp., 1984; Belai i wsp., 1985).

Jeśli chodzi o charakterystykę ultrastrukturalną VIP-ergicznego unerwienia przewodu pokarmowego, która jest również między innymi przedmiotem niniejszej rozprawy, to została ona podana zaledwie w kilku publikacjach (Larsson, 1977; Probert i wsp., 1981, 1983; Fehér i Léránth, 1983; Loesch i Burnstock, 1985). Na podstawie badań okrężnicy wstępującej kota z zastosowaniem metody PAP (Larsson, 1977) oraz badań okrężnicy poprzecznej świnki morskiej metodą immuno-gold (Probert i wsp., 1981, 1983) stwierdzono, że dominującym komponentem VIP-ergicznym włókien nerwowych są duże pęcherzyki granularne. Ponadto wykazano, że VIP-

dotądnie pęcherzyki granularne są znacznie większe od pęcherzyków granularnych zawierających met-enkefalinę lub substancję P (Probert i wsp., 1983). W przeciwieństwie do wspomnianych obserwacji wyniki badań jelita krętego szczura metodą PAP wskazują, że dominującym komponentem VIP-ergicznym włókien nerwowych są małe agranularne pęcherzyki synaptyczne (Loesch i Burnstock, 1985). Odmienne poglądy prezentują Johansson i Lundberg (1981), którzy na podstawie badań immuno-ultrastrukturalnych autonomicznego unerwienia ślinianki przypuszczają, że VIP jest przechowywany zarówno w dużych pęcherzykach granularnych jak i małych agranularnych.

Należy tu wspomnieć, że VIP, który po raz pierwszy został wyizolowany z jelita świni (Said i Mutt, 1970), występuje w wielu obszarach ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego ssaków (Larsson i wsp., 1976; Said i Rosenberg, 1976; Fuxe i wsp., 1977; Larsson, 1977; Fahrenkrug i Schaffalitzky de Muckadel, 1978; Probert i wsp., 1981, 1983; Järhult i wsp., 1982; Crowe i wsp., 1983; Jessen i wsp., 1983; Weihe i wsp., 1984; Belai i wsp., 1985; Loesch i Burnstock, 1985; Papka i wsp., 1985). Jeśli chodzi o VIP-ergiczne unerwienie przewodu pokarmowego to stwierdzono, że włókna nerwowe zawierające VIP występują we wszystkich warstwach ściany przewodu pokarmowego a szczególnie w splocie Auerbacha i Meissnera (Bryant i wsp., 1976; Larsson i wsp., 1976; Fuxe i wsp., 1977). Występują one także w okrężnej warstwie mięśniowej i w mniejszym stopniu w warstwie podłużnej (Schultzberg

i wsp., 1980). Rola VIP w przewodzie pokarmowym jest związana przede wszystkim z pobudzaniem powolnej relaksacji mięśni gładkich - prawdopodobnie oddziaływując na nie bezpośrednio (Schultzberg i wsp., 1980; Polak i Bloom, 1980; Furness i wsp., 1980). Zatem VIP zwalnia motorykę żołądka i rozluźnia ruchy skurczowe dolnego zwieracza przełyku oraz skurcze mięśni gładkich żołądka i jelit a także skurcze pęcherzyka żółciowego (Konturek, 1985). Ponadto, VIP hamuje wydzielanie kwasu żołądkowego, natomiast pobudza wytwarzanie soków sekrecyjnych jelita cienkiego (Polak i Bloom, 1980; Furness i wsp., 1980; Sundler i wsp., 1980; Konturek, 1985). Wreszcie należy wspomnieć o silnym działaniu naczyniorozszerzającym VIP - stąd również nazwa tego peptydu - naczynioruchowy polipeptyd jelitowy lub wazoaktywny polipeptyd jelitowy.

Ogólną charakterystykę unerwienia fragmentu przewodu pokarmowego (jelito kręte) oraz obecność VIP-ergicznego komponentu w splocie Auerbacha przedstawia Ryc. B/1-5/.

Streptozotocyna a cukrzyca

Odkrycie, że streptozotocyna (STZ; Syn. NSC-85998) jest wysoce specyficznym diabetogenem o niskiej ogólnej toksyczności, który selektywnie uszkadza wytwarzające insulinę komórki-B trzustki spowodowało wprowadzenie do badań biologiczno-medycznych bardzo użytecznego zwierzęcego modelu cukrzycy insulinozależnej zwanej również cukrzycą typu I lub cukrzycą młodzieńczą (juvenile-onset diabetes mellitus), która jednocześnie dobrze koreluje z cukrzycą typu I

obserwowaną u ludzi (Rakieten i wsp., 1963; Junod i wsp., 1967, 1969; Mordes i Rossini, 1981). W cukrzycy typu I u ludzi następuje od jej początku uszkodzenie i zniszczenie trzustkowych komórek-B wyspepek Langerhansa z następowym bezwzględny niedoborem insuliny. Jeśli chodzi o STZ to niszczy ona wybiórczo komórki-B wyspepek Langerhansa wywołując cukrzyce nawet u tych gatunków zwierząt, które są zazwyczaj odporne na diabetogenne działanie alioksanu (np. nysz, świnka morska). Należy tu wspomnieć, że STZ jest antybiotykiem (naturalnym nitroimidazolem) wytwarzanym przez gatunek z przedstawicieli promieniowców - *Streptomyces achromogenes*. STZ jest obdarzona działaniem przeciwbakteryjnym i przeciwnitotycznym. Ta druga właściwość nasuwa myśl o zastosowaniu STZ jako leku przeciwnowotworowego, np. w leczeniu wyspiaków wydzielających insulinę (insulinoma); mając orastętki glukozaminę STZ łatwo przenika do komórek trzustki wyspepkowej.

Wiadomym jest, że u ludzi chorych na cukrzyce mogą wystąpić w różnym stopniu rozwinięte neuropatie. Przez pojęcie polineuropatii cukrzycowej (polyneuropathia diabeta) rozumie się występujące w cukrzycy i przyczynowo z nią związane różnego rodzaju uszkodzenia przede wszystkim obwodowego układu nerwowego. Można tu wymienić takie zjawiska jak np. demielinizacja i remielinizacja włókien osiowych, powiększenie i zwyrodnienie komórek Schwanna, obrzęk płytek końcowych sznurek nerwowo-mięśniowych, zmniejszenie liczby komórek zwojowych w rogach tylnych i w mniejszym stopniu w rogach przednich rdzenia kręgowego oraz niekiedy zmniejszenie

liczby bezmielinowych włókien nerwowych zaopatrujących narządy jamy brzusznej (Jędrzejowska, 1981; Czyżyk, 1984). Zmiany w ośrodkowym układzie nerwowym (encefalopatie) towarzyszące cukrzycy stanowią przede wszystkim następstwo uszkodzenia naczyń krwionośnych (Mossakowski i Renkawek, 1981).

Większość badań nad neuropatią szczurów z STZ-wywołaną cukrzycą dotyczyła głównie obwodowego układu nerwowego. Stwierdzono w neuronach obwodowych zmiany w szybkości przewodzenia nerwowego i transportu aksonalnego (Sharma i Thomas, 1974; Sidenius i Jakobsen, 1981). Przedstawiono dowody świadczące o autonomicznej neuropatii zwojów współczulnych (Monckton i Pehovich, 1980) oraz unerwienia autonomicznego przewodu pokarmowego (Lincoln i wsp., 1984; Belai i wsp., 1985), układu naczyniowo-sercowego (Felten i wsp., 1982) i układu moczowo-płciowego (Crowe i wsp., 1983; Felten i wsp., 1983). Niektóre badania wskazują na zmiany morfologiczne i czynnościowe w podwzgórzu i przysadce gruczołowej STZ-diabetycznych szczurów (Duhaute i wsp., 1980; Calve i wsp., 1984; Locatelli i wsp., 1985). Uszkodzenia kory mózgu, podwzgórza i przysadki gruczołowej STZ-diabetycznych szczurów stwierdzono również ultrastrukturalnie (Bestetti i Rossi, 1980; Mukai i wsp., 1980; Rossi i Bestetti, 1981).

Z tego względu, że u ludzi chorych na cukrzycę - szczególnie insulinozależną - występują często zaburzenia gospodarki wodnej jak i zaburzenia ze strony przewodu pokarmowego (np. problem szybkości opróżniania żołądka i obrotu wchłanianego przez jelita pokarmu), leczenie cukrzycy jest niejednokrotnie bardzo utrudnione (Christensen,

1984). Podczas ostatniej dekady, w licznych badaniach dotyczących autonomicznej neuropatii towarzyszącej cukrzycy opisano szereg zmian fizjologicznych, biochemicznych, morfologicznych i histochemicznych w obrębie układu pokarmowego STZ-diabetycznych szczurów (Nakayama i wsp., 1974; Nelson i wsp., 1976; Monckton i Pehovich, 1980; Scott i Ellis, 1980; McNurland i Garlick, 1981; Schmidt i wsp., 1981, 1983; Lincoln i wsp., 1984). Niedawne badania immuno-fluorescencyjne wykonane na szczurach z STZ-cukrzycą insulinozależną (Kishimoto i wsp., 1983; Belai i wsp., 1985) wykazały zwiększoną VIP-immunoreaktywność włókien nerwowych splotu Auerbacha (Ryc. B /4,5/) świadczącą o autonomicznej neuropatii przewodu pokarmowego.

Wobec wszystkich faktów przedstawionych we wstępie do obecnej rozprawy, celowe więc było zbadanie między innymi ultrastrukturalnej organizacji włókien nerwowych zawierających VIP w splocie Auerbacha w doświadczalnym modelu STZ-cukrzycy insulinozależnej. Ubogość informacji w piśmiennictwie na temat ultrastrukturalnej i immunocytochemicznej organizacji neurosekrecyjnego układu podwzgórzowo-przysadkowego, a szczególnie jego neuronów zawierających VP i OT w STZ-cukrzycy insulinozależnej stała się przyczyną podjęcia niniejszych badań również i nad tym zagadnieniem. Badania te umożliwią ewentualne bliższe poznanie zjawisk fizjologicznych towarzyszących cukrzycy.

W chwili obecnej cukrzyca stała się chorobą społeczną, szczególnie w wysoko cywilizowanych krajach, np. w USA (dane z roku 1973 wskazują, że ok. 2% populacji cierpiało na tę

chorobę - cyt. za: Czyżykiem, 1984). Według Czyżyka (1984) liczba około 35 mln chorych na cukrzycę w świecie jest dość prawdopodobna. Natomiast liczbę chorych na cukrzycę w Polsce ocenia się obecnie na ok. 500 tysięcy (Czyżyk, 1984).

CEL PRACY

Celem pracy jest:

1. Analiza zmian ultrastrukturalnych u szczurów z cukrzycą insulinozależną wywołaną przy pomocy streptozocotyny w obrębie:
 - a/ neurosekrecyjnego układu podwzgórzowo-przysadkowego
 - b/ splotu Auerbacha jelita krętego
 - ad.a/ Ocena ultrastrukturalnej organizacji cytoplazmy perykarionów neuronów sekrecyjnych, dendrytów, aksonów i zakończeń synaptycznych jądra nadwzrokowego i przykomorowego podwzgórza oraz aksonów sekrecyjnych przysadki nerwowej
 - ad.b/ Ocena ultrastrukturalnej organizacji cytoplazmy aksonów splotu Auerbacha

2. Wykorzystanie immunocytochemicznej metody peroksydaza-antyperoksydaza do szczegółowej analizy zmian ultrastrukturalnych u szczurów z cukrzycą insulinozależną wywołaną przy pomocy streptozocotyny w obrębie:
 - a/ neurosekrecyjnego układu podwzgórzowo-przysadkowego
 - b/ splotu Auerbacha jelita krętego
 - ad.a/ Ocena immuno-ultrastrukturalnej organizacji perykarionów, dendrytów i aksonów zawierających wazopresynę i oksytocynę w jądrze nadwzrokowym i przykomorowym podwzgórza oraz aksonów sekrecyjnych przysadki nerwowej
 - ad.b/ Ocena immuno-ultrastrukturalnej organizacji cytoplazmy aksonów zawierających wazoaktywny polipeptyd jelitowy w splotcie Auerbacha

MATERIAŁ I METODY

Badania wykonano na szczurach szczepu Wistar, dorosłych samcach o masie ciała 400-450 g pochodzących z normalnych warunków hodowlanych, którym jednorazowo podano dootrzewnowo zbuforowaną STZ (65mg/kg masy ciała) dostarczoną do badań przez Division of Cancer Treatment, National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA (STZ przygotowała do podania i podała Dr. Jill Lincoln, Department of Anatomy and Embryology and Centre for Neuroscience, University College London). Następnie szczury przetrzymywano przez 8 tygodni w normalnych warunkach hodowlanych - zwierzęta zaopatrywano w pokarm i wodę do picia ad libitum. Po upływie 8 tygodni od chwili podania STZ, niektóre szczury wykazywały ogólne objawy kliniczne charakterystyczne dla cukrzycy typu I (juvenile-onset diabetes mellitus, cukrzyca insulinozależna). Szczury te wykazywały ok. 37% spadek masy ciała, wielomocz i cukromocz (glucosuria - wykazana przy użyciu specyficznych tabletek "Clinitest Reagent Tablets", Slough UK). Objawy o których mowa były zatem charakterystyczne dla uprzednio opisanej cukrzycy typu I wywołanej u szczura przy pomocy STZ (Mordes i Rossini, 1981; Lincoln i wsp., 1984). Szczury z powyżej opisanymi objawami cukrzycy oraz szczury u których po podaniu STZ nie zaobserwowano żadnych jej objawów objęto badaniami. Zatem badaniami objęto 2 grupy zwierząt, którym 8 tygodni wcześniej podano STZ, a mianowicie:

a/ STZ-szczury bez objawów cukrzycy (niediabetyczne) - 6 zwierząt; zwierzęta te stanowiły kontrolę w prowadzonych badaniach

b/ STZ-szczury z objawami cukrzycy (diabetyczne) - 6 zwierząt.

W celu oznaczenia poziomu glukozy we krwi (oznaczenie dokonała Dr. J. Lincoln) po okresie 8 tygodni od podania STZ, pobierano w narkozie eterowej do analizy próbki krwi z żyły czochej tylnej od wszystkich zwierząt tzn. z obu grup doświadczalnych. Dla ultrastrukturalnych badań a/ konwencjonalnych i b/ immunocytochemicznych szczury perfundowano następnie nie przerywając narkozy eterowej.

(a) Badania konwencjonalne. Szczury perfundowano poprzez aortę wstępującą 300 ml utrwalacza I zawierającego 4% paraformaldehyd i 6% glutaraldehyd (w 0.1 M buforze fosforanowym o pH 7.4), a następnie 500 ml utrwalacza II zawierającego 1% paraformaldehyd i 1% glutaraldehyd (w 0.1 M buforze fosforanowym o pH 7.4). Po perfuzji, mózg, przysadkę i małe segmenty jelita krętego dotrwalano utrwalaczem II przez 2 godziny w temperaturze 4°C. Wyselekcjonowane obszary mózgu zawierające jądro nadwzrokowe (SON) i jądro przykomorowe (PVN) podwzgórza, przysadkę nerwową (NHP) oraz wycinki jelita krętego utrwalano następnie 1% czterotlenkiem osmu (w 0.05 M buforze fosforanowym o pH 7.4), barwiono en bloc 7% wodnym roztworem octanu uranylu, odwadniano we wzrastającym gradiencie stężeń etanolu i zatapiano w Araldicie 502. Ultracienkie skrawki kontrastowano octanem uranylu i cytrynianem ołowiu i następnie badano i fotografowano w mikroskopie elektronowym Philips-300 i JEM-7A.

(b) Badania immunocytochemiczne. Szczury perfundowano poprzez aortę wstępującą 250 ml utrwalacza A i 500 ml utrwalacza B. Utrwalacz A zawierał 4% paraformaldehyd, 0.1% glutaraldehyd,

1,8% DL-lizynę HCL i 0,2% metanad sodowy (w 0,1 M buforze fosforanowym o pH 7,3). Utrwalacz B zawierał te same składniki z wyjątkiem glutaraldehydu. Po perfuzji zwierzęta umieszczano w lodówce (temp. 4°C) na 2 godziny po czym wyjmowano mózg, przysadkę i małe segmenty jelita krętego i dotrwalało je utrwalaczem B przez 2 godziny w temperaturze 4°C, a następnie pozostawiano przez całą noc w temperaturze 4°C w 0,1 M buforze fosforanowym o pH 7,3. Następnego dnia 50 µm frontalne skrawki z podwzgórza i przysadki uzyskiwano przy użyciu Vibratomu (Oxford instrument) i zbierano je do 0,1 M buforu Tris (Tris) o pH 7,4. Natomiast małe segmenty (ok. 1 cm²) jelita krętego delikatnie szarpało w celu oddzielenia warstwy podłużnej mięśni gładkich i tym samym odsłonięcia spletu Auerbacha. Tak uzyskane fragmenty jelita krętego przepłukiwano następnie w Tris. Zarówno vibratomowe skrawki mózgu i przysadki jak i uzyskane preparaty jelita krętego poddawano procedurze immunocytochemicznej przed zatopieniem (pre-embedding immunocytochemistry) stosując metodę peroksydaza-antyperoksydaza (PAP) Sternbergera (1979). Po 30-minutowym płukaniu skrawków w Tris inkubowano je następnie przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej, w normalnej surowicy koziej (Nordic Immunology) rozcieńczonej 1:50 w Tris zawierającym 0,1% azydku sodowego. Skrawki przepłukiwano następnie w Tris (4 x 10 min) i inkubowano w temperaturze 4°C przez 48 godzin z poliklonalnymi przeciwciałami na wazopresynę (VP), oksytocynę (OT) i wazoaktywny polipeptyd jelitowy (VIP) w sposób następujący:

- a/ skrawki zawierające SON, PVN i NHP podzielono na 2 grupy (1 i 2) i inkubowano: 1/ z przeciwciałem królika na VP (RIA-UK-LTD) rozcieńczonym 1:1500 w Tris zawierającym 0.1% azydku sodowego i 2/ z przeciwciałem królika na OT (dostarczonym do badań przez Dr. Johna G. Farnavelasa) rozcieńczonym 1:1000 w Tris zawierającym 0.1% azydku sodowego.
- b/ skrawki jelita krętego zawierające zwoje splotu Auerbacha inkubowano z przeciwciałem królika na VIP (RIA-UK-LTD) rozcieńczonym 1:1000 w Tris zawierającym 0.1% azydku sodowego.

Po inkubacji wszystkie skrawki poddawano w temperaturze pokojowej dalszym etapom procedury immunocytochemicznej która przebiegała następująco:

- 1/ przepłukiwanie w Tris - 4 x 15 minut
- 2/ inkubowanie w surowicy koziej przeciwko gamma-globulinie (IgG) królika (Cappel Laboratories) rozcieńczonej 1:40 w Tris zawierającym 0.1% azydku sodowego - 90 minut
- 3/ przepłukiwanie w Tris - 4 x 10 minut
- 4/ inkubowanie w króliczym kompleksie peroksydaza-antyperoksydaza (PAP), (RIA-UK-LTD) rozcieńczonym 1:60 w Tris - 3 godziny
- 5/ przepłukiwanie w Tris - 4 x 10 minut
- 6/ preinkubowanie w 3,3'diaminobenzzydynie (DAB, Sigma) rozpuszczonej w Tris (ok. 30 mg DAB/100 ml Tris) - 10 minut
- 7/ inkubowanie w DAB rozpuszczonej w Tris zawierającym 0.01% nadtlenu wodoru

- 8/ przepłukiwanie w Tris - 5 minut
- 9/ przepłukiwanie 0.1 M buforem fosforanowym o pH 7.4 - 5 minut
- 10/ dotrwalanie 1% czterotlenkiem osmu (w 0.05 M buforze fosforanowym o pH 7.4) - 30 minut
- 11/ przepłukiwanie 0.1 M octanem sodu - 2 x 2 minuty
- 12/ barwienie en bloc 1% wodnym roztworem octanu uranylu - 30 minut
- 13/ odwadnianie we wzrastającym gradiencie stężeń etanolu
- 14/ przesycanie skrawków mieszaniną tlenku propylenu i Aralditu 502 w proporcji 1:1 - 12 godzin
- 15/ zatapianie skrawków na płasko w Araldicie 502 do polimeryzacji.

Ze spolimeryzowanych preparatów aralditowych wycinano następnie wyselekcjonowane fragmenty skrawków zawierające SON, PVN, NHP i zwoje Auerbacha i montowano je ponownie na blczkach aralditowych do krojenia na ultramikrotomie. Ultracienkie skrawki kontrastowano octanem uranylu i cytrynianem ołowiu i następnie badano i fotografowano w mikroskopie elektronowym Philips-300 i JEM-7A.

Kontrola. Poliklonalne przeciwciało na OT (325-6) uzyskane przez Dr. J.K. McDonalda, Dr. W.K. Samsona i Dr. M.D. Lumpkina zostało dostarczone do niniejszych badań przez Dr. Johna G. Parnavelasa (Department of Anatomy and Embryology and Centre for Neuroscience, University College London). Pod względem reakcji krzyżowej przeciwciało to sprawdzał metodą RIA Dr. W.K. Samson (Department of Physiology, University of Texas, Health Science Center at Dallas). Przeciwciało na OT

nie reagowało krzyżowo z argininową wazopresyną (AVP) o koncentracji 10 µg/ml. Również nie reagowało ono z następującymi peptydami o koncentracji 1 µg/ml: argininową wazotocyną (AVT), luteoliberyną (LRH), tyreoliberyną (TRH), prolaktyną (PRL), trzustkowym polipeptydem wołu (BPP), żołądkowym peptydem hamującym (GIF), kortykopodobnym peptydem części pośredniej przysadki (ACTH/18-39/, OLIP), ACTH/7-38/, CCK, CRF, GRF, SRIF, VIP, beta-Endorfiną, alfa-Intermedyną (alfa-MSH, melanotropina), met-Enkefaliną, Insuliną, Glukagonem, Motyliną, Sekretyną, Gastryną, Kalcytoniną i Angiotensyną II. W prezentowanej pracy specyficzność reakcji immunocytochemicznej kontrolowano w mikroskopie świetlnym poprzez: a/ pominięcie etapu inkubacji skrawków z przeciwciałem na OT i b/ 24-godzinną preabsorpcję OT-przeciwciała z syntetyczną OT (5 ng-100 µg OT/ml rozcieńczonego OT-przeciwciała) w temperaturze 4°C. Dodanie 50 µg syntetycznej OT (Cambridge Research Biochemicals) do 1 ml rozcieńczonego OT-przeciwciała całkowicie blokowało reakcję immunocytochemiczną. Dodanie 10 ng-10 µg syntetycznej VP (Cambridge Research Biochemicals) lub SRIF (Cambridge Research Biochemicals) nie wpływało na pozytywny wynik reakcji immunocytochemicznej. Rozproszenie neuronów zawierających OT kontrolowano na przykładzie jądra PVN poprzez porównywanie skrawków inkubowanych z przeciwciałem na a/ OT i b/ VP (RIA-UK-LTD); rozproszenie OT- i VP-neuronów dobrze korelowało z odpowiednimi obszarami OT- i VP-ergicznymi jądra PVN.

Poliklonalne przeciwciało na VP użyte w badaniach było pod względem specyficzności sprawdzane przez producenta

(RIA-UK-LTD). Immunoreaktywność tego przeciwciała była blokowana jeżeli absorbowano je z argininową czy lizynową VP. Mała liczba komórek nerwowych i ich wypustek nie wykazywała jednak pozytywnej reakcji immunocytochemicznej kiedy VP-przeciwciało absorbowano z OT. Zatem, w celu wyeliminowania niskiego poziomu reakcji krzyżowej z obecną w skrawkach OT, rozcieńczone VP-przeciwciało preabsorbowano przed użyciem z syntetyczną OT (Cambridge Research Biochemicals) w temperaturze 4°C przez 24 godziny. Dlatego też, wszystkie obserwacje neuronów zawierających VP pochodzą ze skrawków inkubowanych z przeciwciałem na VP uprzednio preabsorbowanym z syntetyczną OT (50 µg OT/1 ml rozcieńczonego VP-przeciwciała).

Poliklonalne przeciwciało na VIP było pod względem specyficzności sprawdzane przez producenta (RIA-UK-LTD). Należy tu wspomnieć, że przeciwciało o którym mowa było już uprzednio stosowane z zadowalającymi wynikami w badaniach fluorescencyjnych i ultrastrukturalnych autonomicznego układu nerwowego szczura (Crowe i wsp., 1983; Lincoln i wsp., 1984; Belai i wsp., 1985; Loesch i Burnstock, 1985). W badaniach własnych specyficzność reakcji immunocytochemicznej kontrolowano poprzez: a/ pominięcie etapu inkubacji skrawków z przeciwciałem na VIP, b/zastąpienie przeciwciała na VIP normalną surowicą króliczą (Nordic Immunology) i c/ preabsorbację VIP-przeciwciała z syntetycznym VIP (Cambridge Research Biochemicals) w temperaturze 4°C przez 24 godziny (10 nmol VIP/1 ml rozcieńczonego VIP-przeciwciała). We wszystkich przypadkach uzyskiwano negatywny wynik reakcji immunocytochemicznej.

WYNIKI

Stan ogólny STZ-diabetycznych szczurów. Jak już wspomniano w rozdziale "Materiał i Metody" wszystkie diabetyczne szczury charakteryzował 37% spadek masy ciała, wielomocz i cukromocz. Zwierzęta te wykazywały wysoką hiperglikemię. Stężenie glukozy we krwi było ok. 4 razy wyższe w porównaniu z STZ-niediabetycznymi szczurami kontrolnymi. Dla przykładu, u niediabetycznych szczurów poziom glukozy wahał się w granicach 119-164 mg/dl ($\bar{x} = 145 \pm 9.7$; $n = 6$) natomiast u szczurów diabetycznych - 641-704 mg/dl ($\bar{x} = 650 \pm 19.3$; $n = 6$). Oznacza to, że poziom glukozy we krwi STZ-diabetycznych szczurów był bardzo znamienne zwiększony ($p < 0.001$, test-t Studenta).

Badania Konwencjonalne

Układ podwzórnowo-przysadkowy/STZ-niediabetyczne szczury

SON i PVN

W obecnej pracy skupiono uwagę na analizie ultrastrukturalnej organizacji cytoplazmy perykarionów neuronów sekretoryjnych oraz organizacji dendrytów, aksonów i zakończeń synaptycznych występujących w otaczającym perykariony neuropilu. Ogólnie rzecz biorąc cechy ultrastrukturalne SON i PVN były podobne.

Perykariony. Badane perykariony posiadały owalne lub z wpukleniami nukleolemy jądro oraz wyraźnie widoczne jąderko (Ryc. 1a). Ziarnista siateczka śródplazmatyczna (ER) występowała na ogół w postaci wydłużonych, wąskich cystern, często rozproszonych w obwodowych obszarach cytoplazmy (Ryc. 1b).

Umiarkowanie rozbudowany kompleks Golgiego tworzyły głównie spłaszczone cysterny i towarzyszące pęcherzyki zmiennej wielkości i gęstości elektronowej. Ziarnistości neurosekrecyjne (NSG), ciała wielopęcherzykowe i elektronowo-gęste lizosomy występowały w obszarze kompleksu Golgiego jak również w przyjądrowej i obwodowej cytoplazmie gdzie obserwowano również liczne owalne lub wydłużone profile mitochondriów.

Neuropil. Niektóre aksony i sporadycznie profile dendrytów zawierały NSG (Ryc. 1c,d). Liczne zakończenia aksonów tworzyły synapsy na perykarionach i dendrytach (Ryc. 1a,c,f). Profile aksonów i dendrytów które posiadały NSG również wykazywały obecność zakończeń synaptycznych na swej powierzchni (Ryc. 1c,d). Synapsy akso-aksonalne obserwowano częściej w SOM niż PVN. Presynaptyczne zakończenia aksonów na ogół zawierały małe agranularne pęcherzyki synaptyczne, ale niekiedy pęcherzyki z elektronowo-gęstym rdzeniem (granularne) były również widoczne. Akso-somatyczne, akso-dendrytyczne i akso-aksonalne synapsy wykazywały często cechy charakterystyczne dla synaps asymetrycznych (Graya typ I).

NHP

W obecnej pracy skupiono uwagę na analizie ultrastrukturalnej organizacji aksonów. Badaniami objęto 596 przypadkowo dobranych profili aksonów pochodzących z różnych obszarów NHP. Zdecydowana większość profili (84.6%) zawierała przede wszystkim elektronowo-gęste NSG (Ryc. 2a). Profile te zawierały również agranularne mikropęcherzyki które były równomiernie rozproszone pomiędzy NSG lub

w postaci gron widoczne w zakończeniach aksonów opierających się o ścianę naczyń krwionośnych (Ryc. 2b). Inne profile zawierały przede wszystkim mikrotubule (2.3%), mikropęcherzyki (1.8%), gładką siateczkę aksoplazmatyczną (1%) i lizosomy (0.3%).

Spłot Auerbacha/STZ-niediabetyczne szczury

W obecnej pracy skupiono uwagę na ultrastrukturalnej organizacji profili aksonów - a szczególnie ich żyłakowatych odcinków - tzw. varicosities. Profile o których mowa zawierały albo a/ liczne małe pęcherzyki agranularne i granularne, b/ przede wszystkim małe agranularne pęcherzyki, lub c/ duże pęcherzyki granularne i kilka małych pęcherzyków agranularnych. Obserwowane profile występowały zarówno w centralnych jak i obwodowych obszarach zwoju Auerbacha (Ryc. 3a-d). Niektóre profile, będące odcinkami aksonów pomiędzy ich żyłakowatymi rozszerzeniami, tzw. intervaricosities, były ubogie w pęcherzyki synaptyczne natomiast obfitowały w mikrotubule.

Układ podwzgórzowo-przysadkowy/STZ-diabetyczne szczury

SON i PVN

Obraz zmian ultrastrukturalnych w SON i PVN był w ogólnym zarysie podobny. Dlatego też zmiany opisane poniżej dotyczą obu badanych obszarów podwzgórza.

Perykariony. Porównując z kontrolą, perykariony neuronów sekrecyjnych SON i PVN były hipertroficzne. Wykazywały one duże owalne lub okrągłe w przekroju jądro komórkowe i odpowiednio rozległą cytoplazmę obfitującą w organelle (Ryc. 4a-d).

Materiał chromatynowy był zazwyczaj równomiernie rozproszony w obrębie nukleoplazmy w której obserwowano również jedno lub nawet dwa duże jąderka usytuowane peryferyjnie (Ryc. 4a). Ziarnistą ER stanowiły wąskie lub poszerzone cysterny najczęściej rozproszone w cytoplazmie. W niektórych perykarionach SON zaobserwowano znaczne nagromadzenie małych sferycznych cystern ER (Ryc. 4c). Natomiast pozostałe organelle wykazywały anormalne rozproszenie tzn. były umiejscowione przede wszystkim w obrębie wąskiego pasa cytoplazmy otaczającego skupisko sferycznych cystern. Równocześnie, w niektórych perykarionach PVN małe sferyczne cysterny były obficie pokryte rybosomami a ich wnętrze było elektronowo-gęste (Ryc. 4d). Kompleks Golgiego obserwowany w neuronach SON i PVN był podobny do opisanego u zwierząt kontrolnych. Ilość NSG była zmienna w poszczególnych perykarionach. W okolicznych obszarach cytoplazmy obserwowano najczęściej NSG (Ryc. 4c,d). Liczne ciała lizosomalne w postaci ciał gęstych, ciał wielopęcherzykowych i figur mielinowych występowały w cytoplazmie. W niektórych perykarionach PVN były także obecne wakuole - podobne do autofagowych, które niekiedy zawierały kilka NSG lub ziarnisty materiał (Ryc. 4d). Zarówno w neuronach SON i PVN mitochondria na ogół były lekko spęczniałe.

Neuronii. W obu badanych jądrach podwzgórza anormalności strukturalne wykazywały także aksony sekrecyjne. Niektóre profile aksonów pomimo że zawierały liczne NSG wyróżniały się obecnością kilku wakuol lub intensywnym zabarwieniem (Ryc. 5a,b). Inne aksony były zasadniczo ubogie w NSG natomiast podobnie jak niektóre perykariony obfitowały

w elektronowo-przeziernie wakuole (Ryc. 5c,d). Niekiedy, i tylko w SON, obserwowano aksony nie wykazujące obecności NSG i innych organelli cytoplazmatycznych natomiast ukazujące elektronowo-przezierną substancję podstawową aksoplazmy (Ryc. 5e). Wreszcie, w obu badanych jądrach podwzgórza występowały profile aksonów wykazujące na obwodzie luźno utkane blaszkowate pierścienie które swym wyglądem niejednokrotnie przypominały rozwarstwioną osłonkę mielinową. W aksoplazmie profili o których mowa niekiedy obserwowano NSG lub częściej - bezpostaciowy materiał (Ryc. 5a,f,g). Charakterystyczną cechą wielu dendrytów SON i PVN była obecność w nich licznych elektronowo-przeziernych wakuol (Ryc. 4a). Zakończenia aksonów tworzące synapsy z perykarionami, dendrytami lub aksonami nie wykazywały zmian (Ryc. 4c, 5c). Zawierały one liczne pęcherzyki synaptyczne. Zakończenia synaptyczne nie różniły się więc istotnie od obserwowanych w SON i PVN zwierząt kontrolnych.

NHP

Badaniami objęto 639 przypadkowo dobranych profili aksonów pochodzących z różnych obszarów NHP STZ-diabetycznych szczurów. Wiele spośród obserwowanych profili wykazywało cechy ultrastrukturalne, których nie było u zwierząt kontrolnych lub występowały sporadycznie (Ryc. 6a-c). Choć, około 33,6% spośród badanych profili jednak wciąż zawierało liczne NSG i rozproszone lub w gronach występujące mikropecherzyki. Inne profile posiadały przede wszystkim mikropecherzyki (30,4%), mikrotubule (28%), gładką siateczkę aksoplazmatyczną (3,8%), lub wakuole autofagowe

z zawartością NSG i ziarnistego materiału (2.8%). Około 1.4% obserwowanych aksonów posiadało gęsto lub luźno utkane blaszkowate pierścienie. Blaszkowate pierścienie o których mowa zazwyczaj występowały wewnątrz aksonów otaczając pozabawiony NSG i mikropęcherzyków obszar aksoplazmy (Ryc. 6c).

Splot Auerbacha/STZ-diabetyczne szczury

Analogicznie jak w NHP, w zwojach Auerbacha STZ-diabetycznych szczurów, większość profili aksonów (352 profile objęte badaniami) wykazywała cechy ultrastrukturalne których nie posiadały zwierzęta kontrolne lub które występowały u nich sporadycznie. Około 65% badanych profili było ubogich w pęcherzyki synaptyczne lub nie wykazywało ich w ogóle (Ryc. 7a). W niektórych profilach obserwowano aglomeraty małych pęcherzyków synaptycznych agranularnych (Ryc. 7b). Inne profile posiadały figury mielinowe (Ryc. 7c) lub wakuole autofagowe z zawartością pęcherzyków granularnych (Ryc. 7d). W obwodowych obszarach zwoju tzn. na jego krańcach sporadycznie obserwowano profile aksonów szczególnie obficie zaopatrzone w duże pęcherzyki granularne (Ryc. 7e). Niektóre aksony splotu Auerbacha STZ-diabetycznych szczurów nie były zmienione i przypominały te obserwowane u zwierząt kontrolnych.

Badania Immunocytochemiczne

Układ podwzgórzowo-przysadkowy/STZ-niediabetyczne szczury

SON i PVN

Zarówno SON jak i PVN posiadały wyznakowane na OT i VP perykariony i liczne wypustki neuronalne.

Perykariony. Intensywność zabarwienia perykarionów cząsteczkami immunoprecypitatu nie była jednolita ale komórki wyraźnie wybarwione dominowały w skrawkach (Ryc. 8a-d). Immunoprecypitat był zasadniczo związany z powierzchnią organelli cytoplazmatycznych a w szczególności z ER. Niekiedy, perykariony zawierające VP uwidaczniały rozproszone w cytoplazmie wybarwione NSG (Ryc. 8e). Cytoplazma OT- jak i VP-ergicznych perykarionów wykazywała organizację ultrastrukturalną podobną do tej jaką opisano w badaniach konwencjonalnych,

Neuropil. Immunoprecypitat w wyznakowanych dendrytach pozostawał w związku z ER i mikrotubulami (Ryc. 9a,b). Identyfikacja wyznakowanych aksonów okazała się trudnym zamierzeniem ze względu na gęsto rozsiane cząsteczki immunoprecypitatu. Pomimo tego, niektóre wyznakowane profile, które obfitowały w NSG lub mikropecherzyki utożsamiano z aksonami (Ryc. 9c,d). W SON identyfikacja aksonów zawierających CT była niekiedy jednoznaczna a to dlatego, że wyznakowane aksony tworzyły charakterystyczne kolbki synaptyczne - w tym przypadku na immuno-ujemnych profilach dendrytów (Ryc. 9e). W neuropilu obu badanych jąder stwierdzono liczne akso-somatyczne i akso-dendrytyczne synapsy utworzone na OT- i VP-immunoreaktywnych profilach neuronalnych (Ryc. 8c, 9a, b,f,g). W synapsach o których mowa uczestniczyły immunonegatywne presynaptyczne zakończenia aksonalne zawierające okrągłe, spłaszczone lub pleomorficzne pecherzyki synaptyczne agranularne a niekiedy również kilka pecherzyków z elektronowo-gęstym rdzeniem. Immunoreaktywne perykariony i dendryty posiadały przede wszystkim synapsy asymetryczne (typ I).

NHP

W skrawkach kontrolnych wyznakowane na OT i VP profile aksonów były rozproszone w NHP i zasadniczo obfitowały w NSG (Ryc. 10a,b). Immunoprecypitat był zlokalizowany przede wszystkim w łączności z błoną otaczającą NSG, które w czasie procedury immunocytochemicznej utraciły częściowo lub całkowicie ziarnisty rdzeń. Zachowany w niektórych NSG ziarnisty materiał wykazywał dodatnią reakcję na VP lub OT.

Spłot Auerbacha/STZ-niediabetyczne szczury

W skrawkach kontrolnych przygotowanych do badań immunocytochemicznych profile aksonów wykazujące dodatnią reakcję na VIP były rozproszone w zwojach Auerbacha. VIP-dodatnie profile obserwowano zatem zarówno w centralnych jak i peryferyjnych obszarach zwojów (Ryc. 11a,b). W obrębie wyznakowanych profili, immunoprecypitat związany był z obficie występującymi małymi pęcherzykami agranularnymi. Niektóre profile dodatkowo zawierały kilka wyznakowanych pęcherzyków granularnych (Ryc. 11b).

Układ podwzórnowo-przysadkowy/STZ-diabetyczne szczury

SON i PVN

Podobnie jak u zwierząt kontrolnych, SON i PVN zawierały immuno-dodatnie perykariony i liczne wypustki neuronalne. W przeciwieństwie do kontroli, zarówno VP- i OT-immunoreaktywne profile wykazywały zróżnicowany obraz ultrastrukturalny.

Perykariony. Wyznakowane perykariony neuronów sekrecyjnych

SON i PVN były hipertroficzne (Ryc. 12a-d, 13a) ukazując cechy ultrastrukturalne podobne do stwierdzonych w badaniach metodą konwencjonalną. Zjawisko hipertrofii dotyczyło perykarionów zawierających tak VP jak i OT (Ryc. 12a-c). Intensywność zabarwienia (immunoreaktywność) poszczególnych obszarów cytoplazmy nie była jednolita, szczególnie w neuronach zawierających VP (Ryc. 12d, 13a). W obu badanych jądrach podwzgórza, VP-dodatnie perykariony obfitowały w organelle które zazwyczaj były rozproszone w cytoplazmie (Ryc. 12a). Niekiedy jednak liczne immuno-dodatnie pęcherzyki, lizosomy i wakuole obserwowano przede wszystkim w obwodowych częściach perykarionów (Ryc. 12d, 13a). Centralne obszary tych perykarionów pozostawały jednocześnie immuno-ujemne i wykazywały obfitość sferycznych cystern ER. Jeśli chodzi o wyznakowane na OT perykariony - obfitowały one w organelle np. ER, kompleks Golgiego i mitochondria (Ryc. 12b,c). Czasem, w peryferyjnej cytoplazmie obserwowano duże wakuole (zazwyczaj nie pokryte rybosomami) wykazujące obecność immuno-dodatniego materiału resztkowego (Ryc. 13b).

Neuropil. W SON i PVN zmiany zaobserwowano także w dendrytach i aksonach OT- i VP-dodatnich neuronów. Niektóre wyznakowane profile były jednak podobne do obserwowanych u zwierząt kontrolnych, tzn. zawierały liczne NSG (profile aksonów) lub obfitowały w ER (profile dendrytów). Zmienione aksony wykazywały zróżnicowany obraz ultrastrukturalny. Dotyczyło to zarówno OT- jak VP-dodatnich profili. Dla przykładu, niektóre immuno-dodatnie aksony posiadały liczne wyznakowane i niewyznakowane NSG, wakuole autofagowe

i mitochondria (Ryc. 13c-e). Inne profile były ubogie w organelle i zawierały tylko kilka pleomorficznych pęcherzyków w których czasami obecny był immunoprecypitat (Ryc. 13f). Obserwowano również aksony posiadające przede wszystkim wyznakowane wakuole autofagowe (Ryc. 13g). Wreszcie, niektóre immuno-dodatnie profile były otoczone luźno utkanymi blaszkowatymi pierścieniami. W aksoplazmie tych profili występował immuno-dodatni materiał pozostając w związku ze strukturami trudnymi do identyfikacji (Ryc. 14a). Zasadnicze zmiany obserwowane w wyznakowanych na VP i OT dendrytach dotyczyły obecności w tych elementach neuronalnych licznych wakuol które najprawdopodobniej reprezentowały znacznie poszerzone cysterny ER. Taki obraz ultrastrukturalny odnosił się szczególnie do OT-dodatnich profili dendrytów (Ryc. 14b,c). Podobnie jak u zwierząt kontrolnych, immuno-ujemne zakończenia aksonalne kontaktowały się z perykarionami, dendrytami i aksonami OT- i VP-ergicznych neuronów (Ryc. 13c, 14c,d). Zakończenia aksonów o których mowa nie były zmienione i zawierały liczne pęcherzyki synaptyczne. W obecnej pracy nie stwierdzono zatem istotnych zmian ultrastrukturalnych w zakończeniach synaptycznych dochodzących do OT- i VP-ergicznych neuronów.

NHP

U STZ-diabetycznych szczurów, aksony zawierające VP i OT były skąpo rozproszone w NHP. Zasadniczo, tylko te profile aksonów które zawierały NSG, mikropęcherzyki lub niekiedy wakuole autofagowe były immunoreaktywne (Ryc. 14e-g). Niektóre wyznakowane profile, obserwowane sporadycznie,

wykazywały immuno-dodatnie struktury trudne do identyfikacji (Ryc. 14h,i). Pozostałe profile aksonów w NHP nie wykazywały immunoreakcji.

Spłoc Auerbacha/STZ-diabetyczne szczury

W skrawkach przygotowanych do immunocytochemii, VIP-dodatnie profile aksonów były obecne w obrębie zwojów Auerbacha. Niektóre wyznakowane profile wykazywały cechy ultrastrukturalne podobne do tych u zwierząt kontrolnych, tzn. zawierały one liczne immuno-dodatnie małe pęcherzyki agranularne (Ryc. 15a). Inne profile wykazywały zróżnicowany obraz ultrastrukturalny. Dla przykładu, wiele spośród wyznakowanych profili obfitowało w immunoprecypitat chociaż były one ubogie w pęcherzyki lub nie było ich wcale (Ryc. 15b). Niektóre profile uwidaczniały przede wszystkim immuno-dodatnie duże pęcherzyki granularne lub wakuole autofagowe zawierające pęcherzyki granularne lub ziarnisty materiał (Ryc. 15c-e). Wreszcie, obserwowano intensywnie wyznakowane profile w których immunoprecypitat często pozostawał w związku ze strukturami trudnymi do identyfikacji (Ryc. 15f).

DYSKUSJA

Układ Podwzgórzowo-Przysadkowy

Badania konwencjonalne i immunocytochemiczne wykazały zmiany ultrastrukturalne w obrębie neuronalnych profili neurosekrecyjnego układu podwzgórzowo-przysadkowego szczura z objawami cukrzycy insulinozależnej wywołanej streptozotocyną (STZ). Zmiany stwierdzono w perykarionach, dendrytach i aksonach jądra nadwzrokowego (SON) i jądra przykomorowego (PVN) podwzgórza oraz w aksonach neurosekrecyjnych przysadki nerwowej (NHP)

Badania konwencjonalne

Perykariony w SON i PVN STZ-diabetycznych szczurów posiadały duże jądro komórkowe, dominujące jąderko/ka/ usytuowane peryferyjnie i odpowiednio obfitą cytoplazmą. Cechy o których mowa odpowiadały zatem ogólnie przyjętej charakterystyce przypisywanej hipertroficznym neuronom sekrecyjnym (Kalimo i Rinne, 1972; Sloper, 1972). Wiele spośród zmian zaobserwowanych w perykarionach STZ-diabetycznych szczurów mógł wywołać naturalny cykl sekrecyjny neuronów. Na podstawie badań ultrastrukturalnych perykarionów PVN szczura, Yukitake i wsp. (1977) wyróżnili 4 fazy cyklu sekrecyjnego pojedynczego neuronu, a mianowicie: fazę syntezy, fazę wytwarzania ziarnistości neurosekrecyjnych (NSG), fazę magazynowania NSG i fazę transportu NSG do NHP. Według autorów, obecność rozbudowanej siateczki śródplazmatycznej ziarnistej (ER) odznaczającej się znacznie powiększonymi cysternami odzwierciedla fazę wzmożonej syntezy

hormonu peptydowego w neuronie.

W badaniach własnych, pewna grupa perykarionów obfitowała w ER. Niekiedy cysterny ER w postaci pęcherzyków sferycznego kształtu tworzyły nawet coś w rodzaju aglomeratu zajmującego znaczną część cytoplazmy. Obserwowano również cysterny z mniej lub bardziej gęstą elektronowo zawartością. Już 20 lat temu Zambrano i De Robertis (1966) jako jedni z pierwszych wskazali na istotny związek pomiędzy zwiększeniem liczby i poszerzeniem światła cystern ER a stanem wzmożonej syntezy materiału neurosekrecyjnego w pobudzonych neuronach sekrecyjnych podwzgórza.

Pojawienie się w podwzgórzu STZ-diabetycznych szczurów zmienionych profili aksonów, a szczególnie tych zawierających liczne wakuole, można także wiązać ze zjawiskiem wzmożonej czynności neuronu. W swoim artykule przeglądowym na temat degeneracji i regeneracji układu neurosekrecyjnego, Dellmann (1973) wyraża pogląd, że pojawienie się wakuol, tubularnych formacji gładkiej siateczki aksoplazmatycznej, lizosomów lub zwiększenie ilości mitochondriów odzwierciedla reaktywne fazy aksonów, które na skutek nadmiernej czynności uległy miejscowemu uszkodzeniu. Należy tutaj wspomnieć o ciekawej obserwacji jaką dokonał Kalimo (1975) w badaniach PVN szczura podczas laktacji, tzn. w okresie wzmożonej syntezy oksytocyny (OT). Stwierdził on mianowicie znaczne nagromadzenie w profilach neuronalnych dużych wakuol, najprawdopodobniej reprezentujących zdegranulowane cysterny ER. Według tego autora, pojawienie się tego rodzaju wakuolizacji również po okresie laktacji, tzn.

kiedy aktywność OT jest znacznie obniżona, może wynikać z naruszenia "równowagi" pomiędzy stanem syntezy i transportem aksonalnym materiału neurosekrecyjnego.

Wiele zmian ultrastrukturalnych zaobserwowanych w badaniach własnych wskazuje na wzmożoną syntezę neurohormonu/ów/ w obrębie neurosekrecyjnego układu podwzgórzowo-przysadkowego STZ-diabetycznych szczurów. Niektóre zmiany mogą do pewnego stopnia odzwierciedlać również procesy degeneracyjne. W perykarionach STZ-diabetycznych szczurów obserwowano mianowicie częściej niż w kontroli różnego typu lizosomy. Na podstawie ilościowych badań nad perykarionami sekrecyjnymi podwzgórza szczura, podczas i po doświadczalnie wywołanej hipersekrecji Morris i Dyball (1974) wnioskuje, że zwiększanie się liczby ciał lizosomalnych ma związek z zakończeniem wzmożonej czynności biosyntetycznej neuronu. W badaniach własnych obserwowano w perykarionach PVN również duże wakuole (podobne do autofagowych), które niekiedy zawierały NSG. Zatem, nie można wykluczyć możliwości, że tego typu zmiany odzwierciedlają pewien mechanizm eliminacji nadmiernej ilości (lub niezużytego) materiału neurosekrecyjnego. Na tym etapie badań trudno jest jednak zinterpretować zjawisko jakie obserwowano w niektórych perykarionach, a mianowicie obraz nadmiernie nagromadzonych cystem ER otoczonych przez wąski pas cytoplazmy obwodowej obfitującej w pozostałe organelle.

W przeciwieństwie do wyżej omówionych elementów neuronalnych, synapsy akso-somatyczne, akso-dendrytyczne i akso-aksonalne nie wykazywały istotnych zmian ultrastrukturalnych

u STZ-diabetycznych szczurów i były analogiczne do obserwowanych u zwierząt kontrolnych. Można więc przypuszczać, że kontrola synaptyczna neuronów w SON i PVN podwzgórza nie była zakłócona u szczurów z 8-tygodniową STZ-cukrzycą insulinozależną.

W badaniach własnych stwierdzono istotne zmiany również w aksonach NHP STZ-diabetycznych szczurów. Różnorodność obserwowanych zmian wydaje się odzwierciedlać różne stany czynnościowe aksonów w procesie cyklu sekrecyjnego. Przede wszystkim stwierdzono mniej niż w kontroli profili aksonów wypełnionych NSG. Równocześnie częściej niż u zwierząt kontrolnych aksony STZ-diabetycznych szczurów zawierały ciała lizosomalne, mikropęcherzyki lub tubularne formacje gładkiej siateczki aksoplazmatycznej. Stąd cechy o których mowa są podobne do tych jakie przypisuje się reaktywnym fazom aksonów kompleksu podwzgórze-przysadka nerwowa (Dellmann, 1973).

W SON, PVN i NHP STZ-diabetycznych szczurów obserwowano ponadto liczne blaszkowate pierścienie pozostające w związku strukturalnym z niektórymi profilami aksonów. Niekiedy, te profile zawierały dodatkowo wewnątrz-aksonalny materiał amorficzny. Podobne złogi materiału amorficznego obserwowano również w aksonach obwodowego układu nerwowego zwierząt u których cukrzycę wywołano alloksanem (Powell i wsp., 1977). Powyższe cechy aksonów przypisano dystrofii związanej z diabetyczną neuropatią.

Na podstawie badań ultrastrukturalnych szczura z 12-miesięczną STZ-cukrzycą Bestetti i Rossi (1980)

stwierdzili istotne zmiany degeneracyjne w komórkach nerwowych i glejowych jądra łukowego i wyniosłości przysiódkowej. W badaniach własnych, oznaki degeneracji nie były tak wyraźne a ich pojawienie się można równie dobrze wiązać ze zjawiskiem wzmożonej czynności neurosekrecyjnej STZ-diabetycznych szczurów. Na obecnym etapie badań trudno jest jednak wnioskować czy omawiane zmiany odzwierciedlają różny stopień wrażliwości poszczególnych obszarów i komórek podwzgórza czy też zmiany degeneracyjne są bardziej nasilone i widoczne w późnym okresie STZ-cukrzycy.

Procesy poprzez które cukrzyca doprowadza do zmian ultrastrukturalnych w obrębie tkanki nerwowej - a w tym przypadku neurosekrecyjnego układu podwzgórzowo-przysadkowego nie są znane. Cukrzycy wywołanej przy pomocy STZ towarzyszy cały szereg zmian metabolicznych i każda z nich może być przyczyną zmian ultrastrukturalnych. Wszystkie diabetyczne szczury badane w niniejszej pracy wykazywały wielomocz. Zatem w 8-tygodniowej cukrzycy, nieleczonej insuliną, najprawdopodobniej zwierzęta te były w stanie przewlekłego odwodnienia za czym przemawia również znaczna utrata ciężaru ciała (37%). Z tego też względu, jest godnym odnotowania fakt, że wiele spośród zmian zaobserwowanych w badaniach własnych było podobnych do tych jakie stwierdzono u szczurów pozbawionych wody do picia (Loesch, 1979, 1981a, b, 1983a) czy u szczurów odmiany Brattleboro z zespołem moczówki prostej (Tasso i Rua, 1978). Podobieństwo o którym mowa dotyczy szczególnie NHP, np. jej aksonów, w których pojawianie się proliferującej siateczki aksoplazmatycznej jest łączone ze zjawiskiem wzmożonej czynności neurocytów

podwzgórza od których te aksony odchodzą (Tasso i Rua, 1978). Podobieństwo dotyczy także zachowania się pituicytów, które zarówno w NHP szczurów z moczówką prostą (Tasso i Rua, 1978), szczurów pozbawionych wody do picia (Loesch i wsp., 1978; Loesch, 1979, 1981b) jak i STZ-diabetycznych szczurów (obserwacje własne niepublikowane) gromadzą liposomy. Zjawisko nagromadzenia znacznie poszerzonych cystern ER w perykarionach SON szczurów pozbawionych wody do picia przez 10 dni (Krisch, 1976) ma również istotne znaczenie w tych rozważaniach. Uwzględniając powyższe obserwacje wydaje się zatem bardzo prawdopodobne, że towarzyszące cukrzycy przewlekłe odwodnienie organizmu jest odpowiedzialne za wywołanie wielu zmian ultrastrukturalnych omawianych w niniejszej pracy. Należy tutaj wspomnieć, że np. w chronicznie pobudzanych perykarionach SON i FVN szczurów odmiany Brattleboro, które odwadniają się ze względu na moczówkę prostą, nie zauważono jednak tak znacznie powiększonej ER (Kalimo i Rinne, 1972). Wiadomo jest również, że podwzgórzowe perykariony tych szczurów są genetycznie niezdolne do syntezy VP i z tego względu na chroniczne odwadnianie organizmu nie są w stanie odpowiedzieć syntezą stosownego neurohormonu (Vandesande i Dierickx, 1975, 1976).

W obu badanych jądrach podwzgórza i w NHP STZ-diabetycznych szczurów, niektóre zmiany aksonalne są podobne do obserwowanych w obrębie ośrodkowego układu nerwowego ssaków poddanych działaniu czynników wywołujących niedokrwienie i niedotlenienie tkanki nerwowej. Chodzi tu szczególnie o pojawianie się wewnątrz-aksonalnych złogów amorficznych

jak też blaszkowatych pierścieni zwanych również ciałami blaszkowatymi, niejednokrotnie przypominających osłonki mielinowe. Dla przykładu, blaszkowate pierścienie w łączności ze zmielinizowanymi i bezmielinowymi aksonami można obserwować w przypadku niedotlenienia kory mózgu szczura (Yu i wsp., 1972a,b). Obecność blaszkowatych pierścieni i wewnątrz-aksonalnych złogów amorficznych stwierdzono także w obrębie neurosekrecyjnego układu podwzgórzowo-przysadkowego chomika mongolskiego (myszoskoczek mongolski) poddanego 10-minutowemu niedokrwieniu mózgu (Loesch, 1983b,c). Jednak zmiany o których mowa trudno uznać za charakterystyczne jedynie dla ewidentnego niedokrwienia czy niedotlenienia tkanki nerwowej. Bowiem są one obserwowane w różnych obszarach ośrodkowego układu nerwowego ssaków (w tym także układu podwzgórzowo-przysadkowego szczura), w rozmaitych warunkach patologicznych czy doświadczalnych (Smith, 1961; Lampert i wsp., 1964; Raine i Field, 1967; Hirano i wsp., 1968; Loesch, 1979, 1984, 1986). Na podstawie badań jądra żukowatego szczura po gonadektomi, Naftolin i wsp. (1985) stwierdzili, że zjawisko pojawiania się w neuronach ciał blaszkowatych niejako markuje w danym obszarze mózgu pewną subpopulację neurocytów szczególnie wrażliwych na określone warunki sekrecyjne.

W rozważaniach na temat cukrzycy a niedokrwienie i niedotlenienie tkanki nerwowej kluczowym argumentem może być dobrze znany fakt zmian naczyniowych towarzyszących cukrzycy. Dlatego też, wskazuje się na mikroangiopatię jako ważny czynnik uczestniczący w rozwoju cukrzycowej neuropatii (Powell, 1983). Zaburzenia czynności naczyń mózgowych stwierdzono u pacjentów chorych na cukrzycę (Dandona i wsp., 1978).

Uszkodzenia naczyń stwierdzono także u zwierząt, np. w mózgu diabetycznego chomika chińskiego (Luce i wsp., 1970) i STZ-diabetycznego szczura u którego po długim okresie cukrzycy dochodziło również do agregacji płytek krwi z następową zakrzepicą (Mukai i wsp., 1980). Wiadomo jest, że w badanym modelu cukrzycy insulinozależnej, tzn. 8-tygodniowej cukrzycy wywołanej u szczura przy pomocy STZ, dochodzi do zmian w unerwieniu włóścińców i naczyń krwionośnych mózgu (Lagnado i wsp., 1986) oraz do zmniejszenia liczby receptorów beta-adrenergicznych (Magnoni i wsp., 1984). W odniesieniu do neurosekrecyjnego układu podwzgórzowo-przysadkowego ssaków godnym odnotowania jest ogólnie znany fakt istnienia bariery krew-mózg na poziomie podwzgórza, natomiast braku tej bariery w przysadce nerwowej, tzn. w miejscu wydzielania VP i OT do układu naczyniowego. U STZ-diabetycznych szczurów dochodzi do wystąpienia obrzęku wokół większych naczyń krwionośnych SON i PVN (obserwacje własne niepublikowane). Można więc przypuszczać, że towarzyszące cukrzycy niedotlenienie ośrodkowego układu nerwowego powstałe na skutek zmian naczyniowych i okołonaczyniowych, może obok innych czynników prowadzić w konsekwencji do zmian ultrastrukturalnych w obrębie neurosekrecyjnego układu podwzgórzowo-przysadkowego STZ-diabetycznych szczurów.

Dotychczasowe badania jakie przeprowadzono nad organizacją innych niż SON i PVN obszarów podwzgórza a także przysadki gruczołowej STZ-diabetycznych szczurów polegały przede wszystkim na poszukiwaniu związku pomiędzy rolą tych ośrodków a ograniczeniem czynności reprodukcyjnej towarzyszącej cukrzycy (Paz i wsp., 1978; Rossi i Bestetti, 1981; Calvo

i wsp., 1984; Spindler-Vomachka i Johnson, 1985). Wyniki własnych badań konwencjonalnych w mikroskopie elektronowym wskazują, że neurosekrecyjny układ podwzgórzowo-przysadkowy ssaków modyfikuje się w warunkach doświadczalnej STZ-cukrzycy insulinozależnej. Można oczekiwać, że pewnym modyfikacjom ulegają przede wszystkim te neurony układu podwzgórzowo-przysadka nerwowa, które wydzielają do krwi wazopresynę i oksytocynę - dwa główne hormony przysadki nerwowej.

Badania immunocytochemiczne

Zidentyfikowanie immunocytochemiczne neuronów zawierających OT i VP uzupełniło badania konwencjonalne umożliwiając tym samym bardziej szczegółowe przesledzenie i utożsamienie zmian ultrastrukturalnych w obrębie neurosekrecyjnego układu podwzgórzowo-przysadkowego STZ-diabetycznych szczurów. Charakterystykę immuno-ultrastrukturalną OT- i VP-dodatnich profili neuronalnych układu podwzgórzowo-przysadkowego szczura przedstawiono już w kilkunastu publikacjach (Le Clerc i Pelletier, 1974; Aspeslagh i wsp., 1976; Krisch, 1977, 1980; Van Leeuwen i Swaab, 1977; Piekut, 1983; Silverman i wsp., 1983; Theodosis i Poulain, 1984; Loesch, 1985). Wyniki badań własnych wskazują, że SON, PVN i NHP szczurów kontrolnych wykazały cechy immuno-ultrastrukturalne podobne do cech opisanych przez wyżej wymienionych autorów, którzy w swych badaniach również zastosowali metodę PAP. Natomiast uzyskane w obecnej pracy wyniki dotyczące STZ-diabetycznych szczurów ujawniają liczne zmiany immuno-ultrastrukturalne, przy czym niektóre spośród nich znacznie odbiegają od normy. Bezsporne jest, że oba typy badanych neuronów, tzn. neurony VP- i OT-ergiczne, były dotknięte zmianami przy czym zmiany te

wydawały się bardziej rozpowszechnione w neuronach zawierających VP.

Jedną z cech ultrastrukturalnych charakteryzujących perykariony obu badanych jąder podwzgórza STZ-diabetycznych szczurów, ale nie STZ-niediabetycznych, było niezwykle rozproszenie organelli cytoplazmatycznych. Znaczny obszar cytoplazmy perykarionów o których mowa zajęty był przez nagromadzone sferycznego kształtu cysterny ER. Cysterny te nie wykazywały dodatniej reakcji na VP i OT. Natomiast przemieszczone pozostałe organelle do otaczającego konglomerat cystern wąskiego pasa cytoplazmy były immuno-reaktywne. Gainer i wsp. (1977) przypuszczają, że niekiedy do wykrycia hormonu (antygeny) zawartego w danym perykarionie niezbędne jest użycie przeciwciał o wyższej koncentracji niż w przypadku zidentyfikowania tego hormonu w obrębie aksonów. W badaniach własnych wydaje się mało prawdopodobne, aby brak immunoprecypitatu w centralnych partiach perykarionów (tzn. gdzie występują konglomeraty cystern ER) STZ-diabetycznych szczurów wynikał bądź z nieodpowiedniej koncentracji użytych przeciwciał czy też wiązał się z niezdolnością penetracji tych przeciwciał poprzez centralne obszary perykarionów. Należy tutaj wspomnieć, że w ten sposób zróżnicowanych pod względem immuno-ultrastrukturalnym obrazów perykarionów nie obserwowano u STZ-niediabetycznych szczurów kontrolnych poddanych identycznej procedurze immunocytochemicznej. Wreszcie należy podkreślić fakt, że centralne i peryferyjne obszary cytoplazmy innych perykarionów w SON i PVN STZ-diabetycznych szczurów wykazywały dodatnią reakcję

i prawidłowe rozmieszczenie organeli cytoplazmatycznych. Można zatem przypuszczać, że w STZ-cukrzycy następują pewne zmiany w rozmieszczeniu badanych antygenów i co się z tym wiąże pewne zmiany w wytwarzaniu hormonów przysadkowych a szczególnie VP.

Wiele spośród zmian ultrastrukturalnych zaobserwowanych w oparciu o badania konwencjonalne jądra SON i PVN STZ-diabetycznych szczurów utożsamiano w niniejszej pracy ze wzmożoną czynnością układu podwzgórzowo-przysadkowego. Również ubytek NSG w profilach aksonów NHP mógł także wskazywać na wzmożoną czynność tego układu i zwiększone wydzielanie neurohormonów przysadkowych do krwi. W badaniach immunocytochemicznych NHP STZ-diabetycznych szczurów stwierdzono zmniejszenie się w porównaniu z kontrolą ilości zarówno VP- jak i OT-dodatnich profili aksonów. Na ogół, tylko te profile które zawierały NSG były immuno-dodatnie. Na podstawie badań ultrastrukturalnych i fizjologicznych stwierdzono na przykład, że zmniejszenie liczby NSG w aksonach NHP (Palay, 1955; Boudier i wsp., 1970) i ubytek VP i OT z NHP (Young i Van Dyke, 1968; Jones i Pickering, 1969) występują podczas stymulacji układu podwzgórzowo-przysadkowego wywołanej odwodnieniem organizmu.

W nawiązaniu do zjawiska ubytku NSG i zmniejszenia ilości immuno-reaktywnych aksonów w NHP znaczenie może mieć fakt występowania VP i OT także w formie niezwiązanej z NSG, tzn. w postaci nieobłonionej bezpośrednio w aksoplazmie. Tego typu zjawisko stwierdzono immunocytochemicznie np. w obrębie niepobudzonego neurosekrecyjnego układu

podwzgórzowo-przysadkowego świnki morskiej (Silverman, 1976). Niektórzy autorzy przypuszczają, że synteza i transport neurohormonów układu podwzgórzowo-przysadkowego szczura może zachodzić z pominięciem fazy pęcherzyków (fazy NSG) również w warunkach doświadczalnych (Norström, 1973, 1974; Krisch, 1980). Natomiast Kalimo i Rinne (1972) wskazują na istnienie tego zjawiska w neuronach sekrecyjnych układu podwzgórze-przysadka nerwowa szczurów odmiany Brattleboro z moczówką prostą. Jednocześnie, pogląd dotyczący możliwości uwalniania neurohormonów peptydowych bezpośrednio z fazy aksoplazmatycznej (z pominięciem fazy NSG) do krwi jest krytykowany (Dreifuss, 1975). W badaniach własnych, obecność immunoprecypitatu w profilach aksonów, które nie wykazywały w sposób jednoznaczny obecności komponentu pęcherzykowego może wskazywać zatem na pozapęcherzykową, aksoplazmatyczną obecność neurohormonów u STZ-diabetycznych szczurów. Jednak łączenie tego zjawiska z całkiem realną możliwością znacznego uszkodzenia NSG podczas procedury immunocytochemicznej nie jest przekonujące bowiem gdyby tak było zjawisko to dotyczyłoby również aksonów STZ-niediabetycznych szczurów. Nie można też pominąć hipotezy, że u STZ-diabetycznych szczurów błona otaczająca NSG mogła być bardziej labilna. Jest również możliwe, że pojawienie się w aksoplazmie immunoprecypitatu odzwierciedla wynik pewnego procesu eliminowania wyprodukowanego w nadmiarze lub niezużytego materiału neurosekrecyjnego. Obecność w niektórych aksonach NHP STZ-diabetycznych szczurów immuno-dodatnich wakuol autofagowych zawierających NSG lub ziarnisty materiał może potwierdzać do pewnego stopnia takie przypuszczenie.

Pozbawione swej podstawowej struktury immuno-dodatnie NSG (materiał reszkowy) obserwowano także w badaniach immuno-ultrastrukturalnych podwzgórzowych aksonów zawierających LH-RH u szczurów z 12-miesięczną STZ-cukrzycą insulino-zależną (Rossi i Bestetti, 1981). W świetle powyższych rozważań, wyniki badań własnych nie wskazują w sposób jednoznaczny na zwiększone wydzielanie neurohormonów z NHP STZ-diabetycznych szczurów. Pomimo tego, całokształt zmian ultrastrukturalnych i immunocytochemicznych - łącznie z ubytkiem NSG i ubytkiem zawierających VP czy OT profili aksonów w NHP - przemawia za hiperaktywnością neurosekrecyjnego układu podwzgórzowo-przysadkowego STZ-diabetycznych szczurów. Jeśli tak jest to najprawdopodobniej wynika ona ze wzmożonej syntezy neurohormonów i zwiększonego ich wydzielania w NHP do układu naczyniowego. Powsnym mankamentem niniejszych badań jest jednak brak danych o poziomach VP i OT we krwi STZ-diabetycznych szczurów. Brak jest tych danych również w piśmiennictwie.

Jak wspomniano już we wstępie do niniejszej pracy, główna rola VP jest związana z czynnością antydiuretyczną i tym samym z zabezpieczeniem homeostazy wodno-elektrolitowej organizmu. Ważnym objawem chorobowym pacjentów cierpiących na cukrzycę z kwasicą ketonową jest odwodnienie organizmu. Zastanawiano się zatem czy odwodnienie towarzyszące cukrzycy jest wynikiem zmniejszonego wydzielania wazopresyny. Kliniczne badania pacjentów z cukrzycową kwasicą ketonową (Walsh i wsp., 1979), niekontrolowaną cukrzycą (Zerbe i wsp., 1979) lub cukrzycą insulinozależną po odstawieniu insuliny

(Milles i wsp., 1981) wykazały we wszystkich tych przypadkach znaczne podniesienie, a nie obniżenie, poziomu wazopresyny we krwi. Wnioskuje się zatem, że w cukrzycy insulinozależnej mechanizmy zabezpieczające przy udziale VP utrzymanie właściwego poziomu wody w organizmie nie mają wpływu na proces diurezy osmotycznej mającej związek z cukromoczem cukrzycowym (Zerbe i wsp., 1979; Milles i wsp., 1981). Wyniki badań immunocytochemicznych niniejszej pracy wydają się potwierdzać pośrednio przytoczone powyżej obserwacje kliniczne.

Mechanizmy poprzez które w cukrzycy dochodzić może do pobudzenia sekrecji VP są niejasne. Rozważano w tym udział takich czynników jak np. zwiększona diureza osmotyczna, hipowolemia, zwiększona osmolalność osocza i wymioty (Walsh i wsp., 1979; Milles i wsp., 1981). Nie można wykluczyć możliwości, że zwiększone wydzielanie VP w cukrzycy (szczególnie insulinozależnej) ma bezpośredni związek z niedostatkem lub brakiem insuliny. Jaki wpływ na przebieg cukrzycy może mieć zwiększone wydzielanie VP czy OT wymaga jeszcze badań. Oba neurohormony mają potencjalnie obszerny zakres działania. Zarówno VP jak i OT mogą podnosić we krwi poziom glukozy (Hems i wsp., 1975; Altszuler i Hampshire, 1981), wywołując w ten sposób lub nasilając hiperglikemię. Niedawno stwierdzono, że wtórne powikłania w obrębie układu podwzgórze-przysadka gruczołowa mogą pogarszać stan cukrzycy insulinozależnej (Weekley, 1984). Wyniki badań własnych wskazują jednoznacznie na zmiany ultrastrukturalne i immunocytochemiczne w obrębie układu podwzgórze-przysadka nerwowa

szczurów z STZ-cukrzycą insulinozależną. Zmiany te mogą odzwierciedlać zarówno zjawisko zwiększonego wydzielania neurohormonów NHP jak i zaburzenia tego wydzielania. W obu przypadkach istnieje możliwość wystąpienia powikłań w obrębie układu podwzgórze-przysadka nerwowa co może prowadzić do niebezpiecznych dla organizmu następstw fizjologicznych a nawet pogarszać stan cukrzycy insulinozależnej.

Pomimo wyżej wymienionych zmian obserwuje się prawidłową organizację ultrastrukturalną połączeń synaptycznych z neuronami wytwarzającymi VP i OT. Zatem na tym etapie badań, tzn. w zespole 8-tygodniowej STZ-cukrzycy insulinozależnej spodziewać się można, że działanie neurosekrecyjnego układu podwzgórzowo-przysadkowego znajduje się pod stałą kontrolą ośrodkową. W konsekwencji, zaobserwowane anormalności immuno-ultrastrukturalne mogą w większym stopniu odzwierciedlać zmiany metaboliczno-fizjologiczne wynikłe z wybiórczego uszkodzenia perykarionów, dendrytów czy aksonów pod wpływem wzmożenia procesów syntezy, transportu i wydzielania VP i OT niż zmiany związane np. z rozkojarzeniem kontroli synaptycznej układu produkującego oba te hormony. Zagadnienie odwodnienia organizmu w cukrzycy uwypuklone jest w niniejszych rozważaniach. W związku z tym wart jest odnotowania fakt, że w przypadku odwodnienia organizmu np. poprzez pozbawienie zwierząt (szczurów) wody do picia, po kilku dniach dochodzi w obrębie układu podwzgórzowo-przysadkowego szczura do zaburzeń organizacji połączeń synaptycznych a nawet ich zwyrodnienia (Loesch, 1979, 1984).

Splot AuerbachaBadania konwencjonalne i immunocytochemiczne

Wyniki badań własnych wskazują na zmiany ultrastrukturalne i immunocytochemiczne w obrębie aksonów zwoju Auerbacha jelita krętego STZ-diabetycznych szczurów. Profile aksonów wykazujące agregację agranularnych pęcherzyków, pleomorficzne pęcherzyki, wakuole autofagowe, figury mielinowe lub profile pozbawione pęcherzyków obserwowano w badaniach konwencjonalnych STZ-diabetycznych szczurów.

Jest prawdopodobne, że pojawienie się wakuol autofagowych lub figur mielinowych odzwierciedla stan wzmożonej czynności aksonów lub wiąże się z usunięciem poprzez naturalny proces nieużytych lub w nadmiarze wytworzonych pęcherzyków synaptycznych. Z drugiej jednak strony, podobne zmiany obserwowano we włóknach autonomicznego układu nerwowego podczas ostrej degeneracji wywołanej doświadczalnie (Hámori i wsp., 1968). Struktury w postaci figur mielinowych obserwowano również wewnątrz lub wokół bezmielinowych aksonów obwodowego układu nerwowego pacjentów z cukrzycą insulinozależną (Babel i wsp., 1970). Podobne zmiany ultrastrukturalne stwierdzone w jelitach szczura z przewlekłą STZ-cukrzycą wskazują na współistnienie autonomicznej neuropatii przewodu pokarmowego w cukrzycy wywołanej doświadczalnie (Schmidt i wsp., 1983). Zmiany zwyrodnieniowe elementów neuronalnych stwierdzono także w obrębie splotu Meissnera pacjentów cierpiących na cukrzycę z objawami zaburzeń motoryki przewodu pokarmowego (Schmidt i wsp., 1984).

U pacjentów chorych na cukrzycę stwierdzono też zmiany

patologiczne naczyń endo- i perineurialnych oraz towarzyszący temu zanik aksonów w obrębie obwodowego układu nerwowego (Powell i wsp., 1985). Zmiany te przypisuje się przewlekłej ischemii obwodowego układu nerwowego. Zagadnienie możliwej ischemii obwodowego układu nerwowego związanej z zaburzeniem organizacji naczyń krwionośnych w cukrzycy, jest w przypadku jelita krętego warte odnotowania. Mianowicie, jelito kręte - w przeciwieństwie do pozostałych odcinków jelita cienkiego - jest zaopatrywane w krew jedynie tylko przez 1 tętnicę (krezkową górną). Dlatego też, można się spodziewać, że w warunkach ischemii jelito kręte i jego unerwienie jest szczególnie narażone na zmiany pochodzenia ischemicznego. Należy również podkreślić, że w badanym modelu doświadczalnym splot Auerbacha np. jelita grubego (okrężnicy wstępującej czy okrężnicy zstępującej) nie wykazuje tak wyraźnych zmian ultrastrukturalnych (Loesch, Belai, Lincoln i Burnstock - obserwacje niepublikowane).

Badania immunofluorescencyjne nie były w stanie ustalić czy zwiększona VIP-immunoreaktywność splotu Auerbacha jelita krętego szczurów z 8-tygodniową STZ-cukrzycą jest skutkiem zwiększonej syntezy VIP w neuronach czy też odzwierciedleniem procesów degeneracyjnych (Belai i wsp., 1985). Zmiany ultrastrukturalne VIP-immunoreaktywnych profili obserwowane w badaniach własnych wskazują, że niektóre aksony splotu Auerbacha mogą być dotknięte procesami degeneracji. Gromadzenie VIP we włóknach nerwowych obserwowano np. w obrębie uszkodzonych nerwów obwodowych (K. Dhital, Department of Anatomy and Embryology, University College London - informacja ustna). Odwrotną sytuację, mianowicie znaczną redukcję

VIP-immunoreaktywności nerwów obwodowych stwierdzono np. w obrębie ciał jamistych prącia pacjentów chorych na cukrzycę insulinozależną z objawami impotencji jak i u szczurów z 8-tygodniową STZ-cukrzycą (Crowe i wsp., 1983). Autorzy również utożsamili te zjawiska z uszkodzeniem VIP-ergicznego unerwienia prącia oraz uznali je za ważny czynnik uczestniczący w rozwoju impotencji w cukrzycy. W tym miejscu należy wspomnieć, że nie stwierdzono różnic w badaniach porównawczych VIP-ergicznego komponentu spłotu Auerbacha jelita krętego STZ-niediabetycznych szczurów i zdrowych tzn. którym nie podano STZ (Belai i wsp., 1985). Wyniki wspomnianych badań wskazują zatem, że obserwowane zmiany w VIP-ergicznym unerwieniu spłotu Auerbacha STZ-diabetycznych szczurów wykluczają jako przyczynę tych zmian możliwość toksycznego efektu STZ.

W badaniach własnych profile aksonów wykazujące VIP-immunoreaktywność bez wyraźnej obecności komponentu pęcherzykowego można utożsamiać z niektórymi aksonami badanymi metodą konwencjonalną, w których nie obserwowano pęcherzyków synaptycznych. Jak już wspomniano przy omawianiu układu podwzgórzowo-przysadkowego, istnieje możliwość występowania związków peptydowych zarówno w fazie pęcherzykowej i poza-pęcherzykowej w aksoplazmie. Na tym etapie badań nie można wnioskować czy pojawienie się VIP-immunoprecypitatu w nieobecności pęcherzyków odzwierciedla normalny stan zwiększonej aktywności niektórych aksonów czy też ujawnia zwyrodnienie patologiczne związane z cukrzycą.

VIP-dodatnie profile aksonów zwoju Auerbacha jelita krętego zdrowego szczura zawierają około 93% wyznakowanych małych pęcherzyków agranularnych i 7% wyznakowanych dużych

granularnych (Loesch i Burnstock, 1985). Wyniki obecnych badań własnych wskazują, że obok VIP-dodatnich agranularnych i granularnych pęcherzyków występują dodatkowo np. immunododatnie wakuole autofagowe w aksonach splotu Auerbacha STZ-diabetycznych szczurów. Obserwacje te, mogą przeto wskazywać na istnienie związku pomiędzy zmienionymi aksonami, np. tymi zawierającymi wakuole autofagowe jak obserwowano w badaniach konwencjonalnych i tymi zidentyfikowanymi w badaniach immunocytochemicznych. W ten sam sposób można utożsamić profile obfitujące w duże pęcherzyki granularne, które w badaniach immunocytochemicznych wykazały dodatnią reakcję na VIP.

W obecnej pracy ograniczono się do badań jedynie VIP-ergicznego unerwienia splotu Auerbacha jelita krętego. Nie można zatem wykluczyć możliwości pewnych zmian zwrotnościowych innego niż zawierające VIP typu/ów/ włókien nerwowych splotu Auerbacha jelita krętego STZ-diabetycznych szczurów. W rzeczywistości, niektóre zmienione profile aksonów obserwowane w badaniach własnych były VIP-ujemne. Wiadomo jest, że w modelu 8-tygodniowej STZ-cukrzycy insulinozależnej ujawniają się zmiany neurochemiczne i histochemiczne świadczące o degeneracji adrenergicznego unerwienia splotu Auerbacha jelita krętego szczura (Lincoln i wsp., 1984). Należy w tym miejscu wspomnieć, że obok omówionych zmian jelito kręte szczurów z 8-tygodniową STZ-cukrzycą jest znacznie powiększone w stosunku do STZ-niediabetycznych szczurów. Zwiększony jest istotnie całkowity ciężar jelita krętego w tym i ciężar okrężnej i podłużnej warstwy mięśni gładkich wraz ze splotem Auerbacha (Lincoln i wsp., 1984).

Objawy zaburzenia czynności układu pokarmowego w cukrzycowej neuropatii autonomicznej dotyczą zaburzenia motoryki jelita cienkiego i grubego, tłumienia odruchu opróżniania oraz wystąpienia biegunki lub obstrukcji (Hosking i wsp., 1978; Clarke i wsp., 1979). Nudności, wymioty i znaczne powiększenie żołądka niekiedy również występują u ludzi chorych na cukrzycę. Objawy te dotyczą szczególnie pacjentów z przewlekłą, niewłaściwie leczoną cukrzycą insulinozależną u których występują dodatkowo epizody kwasicy ketonowej (Christensen, 1984). Jaki wpływ na czynność układu pokarmowego mają opisane w obecnej pracy zmiany w organizacji aksonów w tym i VIP-ergicznego komponentu spłotu Auerbacha jest na tym etapie badań trudny do sprecyzowania. Zmiany - również o charakterze degeneracyjnym - jakim ulegają niektóre aksony zawierające VIP w splocie Auerbacha mogą odgrywać istotną rolę w rozwoju towarzyszących cukrzycy zaburzeń czynności motorycznej przewodu pokarmowego. W dalszych badaniach nad tym zagadnieniem celowa byłaby próba ultrastrukturalnej identyfikacji VIP-ergicznych zakończeń aksonalnych na mięśniach gładkich ściany przewodu pokarmowego i prześledzenia ich zmian u STZ-diabetycznych szczurów.

Jak wynika z przedstawionych powyżej badań zarówno czynność spłotu Auerbacha jak i neurosekrecyjnego układu podwzgórzowo-przysadkowego może rzutować na przebieg cukrzycy insulinozależnej i jej objawy.

WNIOSKI

W cukrzycy insulinozależnej wywołanej u szczura po podaniu streptozotocyny występują zmiany ultrastrukturalne i immunocytochemiczne w obrębie:

a/ profili neuronalnych neurosekrecyjnego układu podwzgórzowo-przysadkowego

b/ aksonów splotu Auerbacha jelita krętego

ad.a/ - Wyniki konwencjonalnych badań ultrastrukturalnych wskazują na wzmożoną syntezę oraz zwiększone wydzielanie hormonów przysadki nerwowej

- Stwierdza się zmiany, które mogą odzwierciedlać pozorną (przejściową, cykliczną) degenerację wynikającą ze wzmożonej czynności sekrecyjnej układu, bądź też powikłania fizjologiczne prowadzące do nieodwracalnych zmian zwyrodnieniowych

- Niedobór insuliny oraz przewlekłe odwodnienie organizmu i niedotlenienie ośrodkowego układu nerwowego wydają się być przyczynami prowadzącymi do wystąpienia nieprawidłowości ultrastrukturalnych

- Wyniki immunocytochemicznych badań ultrastrukturalnych wskazują na czynne uczestnictwo neuronów wazopresyno- i oksytocyno-ergicznych w reorganizacji ultrastrukturalnej i czynnościowej neurosekrecyjnego układu podwzgórzowo-przysadkowego diabetycznych szczurów

- Zmiany immuno-reaktywności profili neuronalnych podwzgórza jak i ubytek wazopresyno- i oksytocyno-dodatnich aksonów w przysadce nerwowej świadczą o modyfikacji procesów syntezy oraz transportu wazopresyny i oksytocyny a także o zwiększonym wydzielaniu tych neurohormonów
- Badania immunocytochemiczne diabetycznych szczurów wskazują ponadto, że kontrola synaptyczna neuronów wazopresyno- i oksytocyno-ergiczych nie jest zaburzona

- ad.b/ - Wyniki konwencjonalnych i immunocytochemicznych badań ultrastrukturalnych splotu Auerbacha diabetycznych szczurów wskazują na degenerację niektórych aksonów w tym i aksonów zawierających wazoaktywny polipeptyd jelitowy
- Oznaki degeneracji aksonów zawierających wazoaktywny polipeptyd jelitowy w splocie Auerbacha świadczą o możliwości uczestnictwa tych włókien nerwowych w rozwoju zaburzeń czynności motorycznej przewodu pokarmowego u diabetycznych szczurów.

1. Altszuler, N., Hampshire, J. (1981) Oxytocin infusion increases plasma insulin and glucagon levels and glucose production and uptake in the normal dog. *Diabetes*, 30, 112-114.
2. Armstrong, W.E., Warach, S., Hatton, G.I., McNeill, T.H. (1980) subnuclei in the rat hypothalamic paraventricular nucleus: a cytoarchitectural, horseradish peroxidase and immunocytochemical analysis. *Neuroscience*, 5, 1931-1958.
3. Aspeslagh, M.R., Vandesande, F., Dierickx, K. (1976) Electron microscopic immunocytochemical demonstration of separate neurophysin-vasopressinergic and neurophysin-oxytocinergic nerve fibres in the neural lobe of the rat hypophysis. *Cell Tissue Res.*, 171, 31-37.
4. Babel, J., Bischoff, A., Spöndlin, H. (1970) Ultrastructure of the Peripheral Nervous System and Sense Organs. *Atlas of Normal and Pathological Anatomy*, (wyd.: Bischoff, A.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
5. Bargmann, W. (1949) Über die neurosekretorische Verknüpfung von Hypothalamus und Neurohypophyse. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, 34, 611-643.
6. Bargmann, W. (1954) *Das Zwischenhirn-Hypophysensystem*. Springer, Berlin.
7. Bargmann, W., Scharrer, E. (1951) The site of origin of the hormones of the posterior pituitary. *Am. J. Sci.*, 39, 255-259.
8. Baumgarten, H.G., Holstein, A.F., Owman, C. (1970) Auerbach's plexus of mammals and man: electron microscopic identification of three different types of neuronal processes in myenteric ganglia of the large intestine from Rhesus monkeys, guinea-pigs and man. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, 106, 376-397.
9. Baylis, W.M., Starling, E.H. (1899) The movements and innervation of the small intestine. *J. Physiol. (London)*, 24, 99-143.

10. Belai, A., Lincoln, J., Milner, P., Crowe, R., Loesch, A., Burnstock, G. (1985) Enteric nerves in diabetic rats. Increase in vasoactive intestinal polypeptide but not substance P. *Gastroenterology*, 89, 967-976.
11. Bestetti, G., Rossi, G.L. (1980) Hypothalamic lesions in rats with long-term Streptozotocin-induced diabetes mellitus. A semiquantitative light- and electron-microscopic study. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 52, 119-127.
12. Bindler, E. LaBella, F.S., Sanval, M. (1967) Isolated nerve endings (neurosecretosomes) from the posterior pituitary. Partial separation of vasopressin and oxytocin and the isolation of microvesicles. *J. Cell Biol.* 34, 185-205.
13. Bloom, F.E., Rossier, J., Battenberg, E.L.F., Bayon, A., French, E., Henriksen, S.J., Siggins, G.R., Segal, D., Browne, R., Ling, N., Guillemin, R. (1978) B-Endorphin: cellular localization, electrophysiological and behavioural effects. *Biochem. Psychopharmacol.*, 18, 89-105.
14. Boudier, J.L., Boudier, J.A., Picard, D. (1970) Ultrastructure du lobe postérieur de l'hypophyse du rat et ses modifications au cours de l'exécution de vasopressine. *Z. Zellforsch.*, 108, 357-379.
15. Bryant, M.G., Polak, J.M., Modlin, I., Bloom, S.R., Albuquerque, R.H., Pearse, A.G.E. (1976) Possible dual role of vasoactive intestinal peptide as gastrointestinal hormone and transmitter substance. *Lancet*, 1, 991-993.
16. Burnstock, G. (1981) Ultrastructural identification of neurotransmitters. *Scand. J. Gastroenterology*, 16 Suppl., 70, 1-9.
17. Calvo, J.C., Barañao, J.L.S., Tesone, M., Charreau, E.H. (1984) Hypothalamic-hypophyseal-gonadal axis in the streptozotocin-induced diabetic male rat. *J. Steroid. Biochem.*, 20, 769-772.
18. Calza, L., Fuxe, K., Agnati, L.F., Zini, I., Ganten, D., Lang, R.E., Poulsen, K., Hökfelt, T. (1982) Presence of renin-like immunoreactivity in oxytocin immunoreactive nerve cells of the paraventricular and supraoptic nuclei in the rat hypothalamus. *Acta Physiol. Scand.*, 116, 313-316.

19. Castel, M., Hochman, J. (1976) Ultrastructural and immunocytochemical localization of vasopressin in the hypothalamic-neurohypophysial system of three murids. *Cell Tissue Res.*, 174, 69-81.
20. Changaris, D.G., Severs, W.B., Keil, L.C. (1978) Localization of angiotensin in rat brain. *J. Histochem. Cytochem.*, 26, 593-607.
21. Choy, V.J., Watkins, W.B. (1977) Immunocytochemical study of the hypothalamo-neurohypophysial system. II. Distribution of neurophysin, vasopressin and oxytocin in the normal and osmotically stimulated rat. *Cell Tissue Res.*, 180, 167-490.
22. Christensen, J. (1984) Motility. W: Pathophysiology. Altered Regulatory Mechanisms in Disease, (wyd.: Frohlich, E.D.), Trzecie wydanie, J. B. Lippincott Company, Philadelphia, 475-496.
23. Clarke, B.F., Ewing, D.J., Campbell, I.W. (1979) Diabetic autonomic neuropathy. *Diabetologia*, 17, 195-212.
24. Cook, R.D., Burnstock, G. (1976a) The ultrastructure of Auerbach's plexus in the guinea-pig. I. Neuronal elements. *J. Neurocytol.*, 5, 171-194.
25. Cook, R.D., Burnstock, G. (1976b) The ultrastructure of Auerbach's plexus in the guinea-pig. II. Non-neuronal elements. *J. Neurocytol.*, 5, 195-206.
26. Costa, M., Furness, J.B., Yanaihara, M., Moody, T.W. (1984) Distribution of projections of neurons with immunoreactivity for both gastrin-releasing peptide and bombesin in the guinea-pig small intestine. *Cell Tissue Res.*, 235, 285-293.
27. Crowe, R., Lincoln, J., Blacklay, P.F., Pryor, J.P., Lumley, J.S.P., Burnstock, G. (1983) Vasoactive intestinal polypeptide-like immunoreactive nerves in diabetic penis. A comparison between streptozotocin-treated rats and man. *Diabetes*, 32, 1075-1077.
28. Czyżyk, A. (1984) Cukrzyca. W: Endokrynologia Kliniczna, (wyd.: Hartwig, W.), Trzecie wydanie, Tom II, PZWL, Warszawa, 661-794.

29. Dandona, P., James, I.M., Newbury, P.A., Wollard, M.L., Beckett, A.G. (1978) Cerebral blood flow in diabetes mellitus: evidence of abnormal cerebrovascular reactivity. *Br. Med. J.*, 2, 325-326.
30. De Mey, J., Vandesande, F., Dierickx, K. (1974) Identification of neurophysin producing cells. II. Identification of the neurophysin I and neurophysin II producing neurons in the bovine hypothalamus. *Cell Tissue Res.*, 153, 531-543.
31. Bellmann, H.-D. (1973) Degeneration and regeneration of neurosecretory system. *Int. Rev. Cytol.*, 36, 215-315.
32. Deschepper, C., Lotstra, F., Vandesande, F., Vanderhaeghen, J.-J. (1983) Cholecystikinin varies in the posterior pituitary and external median eminence of the rat according to factors affecting vasopressin and oxytocin. *Life Sci.*, 32, 2571-2577.
33. Dierickx, K. (1980) Immunocytochemical localization of the vertebral cyclic nonapeptide neurohypophyseal hormones and neurophysins. *Int. Rev. Cytol.*, 62, 119-185.
34. Dreifuss, J.J. (1975) A review on neurosecretory granules: their contents and mechanisms of release. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 248, 184-201.
35. Duhault, J., Roman, F., Suzanna, O. (1980) The effect of severe diabetes on monoamine metabolism in rat hypothalamus. *Diabetologia*, 19, 271 (Abstr.).
36. Elde, R.P., Hokfelt, T., Johansson, O., Terenius, L. (1976) Immunocytochemical studies using antibodies to leucine-enkephalin initial observations on the nervous system of the rat. *Neuroscience*, 1, 349-351.
37. Fahrenkrug, J., Schaffalitzky de Muckadell, O. (1978) Distribution of vasoactive intestinal polypeptide in the porcine central nervous system. *J. Neurochem.*, 31, 1445-1459.
38. Fehér, E., Léránth, C. (1983) Light and electron microscopical localization of vasoactive intestinal polypeptide-like activity in the rat small intestine. *Neuroscience*, 10, 97-106.
39. Fehér, E., Vajda, J. (1972) Effects of monoamine inhibitor on the nerve elements of the isolated cat's ileum. *Verh. Anat. Ges.*, 69, 477-482.

40. Felten, D.L., Felten, S.Y., Melman, A. (1983) Noradrenergic innervation of the penis in central and streptozotocin-diabetic rats: evidence of autonomic neuropathy. *Anat. Rec.*, 206, 49-59.
41. Finley, J.C.W., Lindstrom, P., Petrusz, P. (1981) Immunocytochemical localization of B-endorphin-containing neurons in the rat brain. *Neuroendocrinology*, 33, 28-42.
42. Furness, J.B., Costa, M. (1971) Monoamine oxidase histochemistry of enteric neurons in the guinea-pig. *Histochemie*, 25, 324-336.
43. Furness, J.B., Costa, M. (1980) Types of nerves in the enteric nervous system. *Neuroscience*, 5, 1-20.
44. Furness, J.B., Costa, M., Franco, R., Llewellyn, S.I.J. (1980) Neuronal peptides in the intestine: distribution and possible functions. W: *Neuronal Peptides and Neuronal Communications*, (wyd.: Costa, E., Traburchi, M.), Raven, New York, 607-617.
45. Furness, J.B., Costa, M., Emson, P.C., Hakason, R., Moghizadeh, E., Sundler, F., Taylor, I.L., Chances, R.E. (1983) Distribution, pathways and reactions of drug treatment of nerves with neuropeptide Y- and pancreatic polypeptide-like immunoreactivity in the guinea-pig digestive tract. *Cell Tissue Res.*, 234, 71-92.
46. Fuxe, K., Ganten, D., Hökfelt, T., Bolme, P. (1976) Immunocytochemical evidence for the existence of angiotensin II containing terminals in the brain and spinal cord in the rat. *Neurosci. Lett.*, 2, 229-234.
47. Fuxe, K., Hökfelt, T., Said, S.I., Mutt, V. (1977) Vasoactive intestinal polypeptide and the nervous system: immunocytochemical evidence for localization in central and peripheral neurons, particularly intracortical neurons of the cerebral cortex. *Neurosci. Lett.*, 5, 241-246.
48. Gabella, G. (1971) Glial cells in the myenteric plexus. *Z. Naturforsch.*, 26B, 244-245.
49. Gabella, G. (1972) Fine structure of the myenteric plexus in the guinea-pig ileum. *J. Anat. (London)*, 111, 69-97.

50. Gabella, G. (1979) Innervation of the gastrointestinal tract. *Int. Rev. Cytol.*, 59, 129-193.
51. Gabella, G. (1981) Structure of muscles and nerves in the gastrointestinal tract. W: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, (wyd.: Johnson, L.R., Christensen, J., Grossman, M.I., Jacobson, E.D., Schultz, S.G.), Raven, New York, Tom 1, 197-241.
52. Gabella, G. (1982) On the ultrastructure of the enteric nerve ganglia. W: *Basic Science in Gastroenterology. Structure of the Gut*, (wyd.: Polak, J.M., Bloom, S.R., Wright, N.A., Daly, M. J.), Glaxo Group Res. LTD., Norwich, 193-203.
53. Gainer, H., Loh, P., Sarne, Y. (1977) Biosynthesis of neuronal peptides. W: *Peptides in Neurobiology*, (wyd.: Gainer, H.), Plenum Press, New York-London, 183-213.
54. Gershon, M. D. (1981) The enteric nervous system. *Ann. Rev. Neurosci.*, 4, 227-272.
55. Gray, E.G. (1959) Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: an electron microscope study. *J. Anat. (London)*, 93, 420-433.
56. Gunn, M. (1959) Cell types in the myenteric plexus of the cat. *J. Comp. Neurol.*, 111, 83-93.
57. Gunn, M. (1968) Histological and histochemical observations on the myenteric and submucosal plexuses of mammals. *J. Anat. (London)*, 102, 223-239.
58. Hámori, J., Láng, E., Simon, L. (1968) Experimental degeneration of preganglionic fibres in the superior cervical ganglion of the cat. An electron microscopic study. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, 90, 37-52.
59. Hems, D.A., Whitton, P.D., Ma, G.Y. (1975) Metabolic action of vasopressin, glucagon and adrenalin in the intact rat. *Biochim. Biophys. Acta*, 411, 155-164.
60. Hirano, A., Rubin, R., Sutton, C.H., Zimmerman, H.M. (1968) Honeycomb-like tubular structure in axoplasm. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 10, 17-25.

61. Hirst, G.D.S., Holman, M.E., Spence, I. (1974) Two types of neurons in the myenteric plexus of duodenum in the guinea-pig. *J. Physiol. (London)*, 236, 303-326.
62. Hosking, D.J., Bennett, T., Hampton, J.R. (1978) Diabetic autonomic neuropathy. *Diabetes*, 27, 1043-1055.
63. Hoyes, A.D., Sikri, K.L., Barber, P. (1982) Localization of substance P-like immunoreactivity in the intramural nerve plexuses of the guinea-pig stomach using immunofluorescence and immunoperoxidase techniques. *J. Anat. (London)*, 135, 319-332.
64. Håkfelt, T., Efendić, S., Helleström, C., Johansson, O., Luft, R., Arimura, A. (1975) Cellular localization of somatostatin in endocrine-like cells and neurons of the rat with special references to the A₁-cells in the pancreatic islets and to the hypothalamus. *Acta Endocrinol.*, 200 Suppl., 80, 4-41.
65. Iwata, Y., Koyama, E., Kawakami, F., Okamura, H. (1984) Distributional patterns of peptide neurons in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Acta Histochem. Cytochem. (Japan)*, 17, 171-177.
66. Jürhult, J., Fahrenkrug, J., Hellstrand, P., Uddman, R. (1982) VIP (Vasoactive Intestinal Polypeptide)-immunoreactive innervation of the portal vein. *Cell Tissue Res.*, 221, 617-624.
67. Jessen, K.R., Saffrey, M.J., Baluk, P., Hanani, M., Burnstock, G. (1983) The enteric nervous system in tissue culture. III. Studies on neuronal survival and retention of biochemical and morphological differentiation. *Brain. Res.*, 262, 49-62.
68. Jessen, K.R., Saffrey, M.J., Van Noorden, S., Bloom, S.R., Polak, J.M., Burnstock, G. (1980) Immunocytochemical studies of the enteric nervous system in tissue culture and in situ: localization of vasoactive intestinal polypeptide (VIP), substance-P and enkephalin immunoreactive nerves in the guinea-pig gut. *Neuroscience*, 5, 1717-1735.

69. Jędrzejowska, H. (1981) Choroby obwodowego układu nerwowego. W: Podstawy Neuropatologii, (wyd.: Mossakowski, M.J., Dymecki, J., Wender, M.), Rozdz. XX, PZWL, Warszawa, 531-563.
70. Johansson, O., Lundberg, J.M. (1981) Ultrastructural identification of VIP-like immunoreactivity in large dense-core vesicles of "cholinergic type" nerve terminals in cat exocrine glands. *Neuroscience*, 6, 847-862.
71. Johansson, O., Hökfelt, T., Elde, R.P. (1984) Immunocytochemical distribution of somatostatin-like immunoreactivity in the central nervous system of the adult rat. *Neuroscience*, 13, 265-339.
72. Jones, C.W., Pickering, B.T. (1969) Comparison of the effects of water deprivation and sodium chloride imbibition on the hormone content of the neurohypophysis of the rat. *J. Physiol. (London)*, 203, 449-458.
73. Joseph, S.A., Sternberger, L.A. (1979) The unlabelled antibody method. Contrasting color staining of B-lipotropin and ACTH-associated hypothalamic peptides without antibody removal. *J. Histochem. Cytochem.*, 27, 1430-1437.
74. Junod, A., Lambert, A.E., Stauffacher, W., Renold, A.E. (1969) Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J. Clin. Invest.*, 43, 2129-2139.
75. Junod, A., Lambert, A.E., Orci, L., Pictet, R., Conet, A.E., Renold, A.E. (1967) Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 126, 201-205.
76. Kalimo, H. (1975) Ultrastructural studies on the hypothalamic neurosecretory neurons of the rat. III. Paraventricular and supraoptic neurons during lactation and dehydration. *Cell Tissue Res.*, 163, 151-168.
77. Kalimo, H., Rinne, U.K. (1972) Ultrastructural studies on the hypothalamic neurosecretory neurons of the rat. II. The hypothalamo-neurohypophysial system in rats with hereditary hypothalamic diabetes insipidus. *Z. Zellforsch.*, 134, 205-225.

78. Kawata, M., Hashimoto, K., Takahara, J., Sano, Y. (1983) Immunocytochemical identification of neurons containing corticotropin-releasing factor in the rat hypothalamus. *Cell Tissue Res.*, 230, 239-246.
79. Kilcoyne, M.M., Hoffman, D.L., Zimmerman, E.A. (1980) Immunocytochemical localization of angiotensin II and vasopressin in rat hypothalamus: evidence for production in the same neuron. *Clin. Sci.*, 59, 57-60.
80. Kishimoto, S., Kunita, S., Kambare, A., Okamoto, K., Shimizu, S., Yamamoto, M., Koh, H., Sano, K., Kajima, G., Miyoshi, A., Yanahara, N. (1983) VIP-ergic innervation in the gastrointestinal tract of diabetic rats. *Hiroshima J. Med. Sci.*, 32, 469-478.
81. Komuro, T., Baluk, P., Burnstock, G. (1982) An ultrastructural study of nerve profiles in the myenteric plexus of the rabbit colon. *Neuroscience*, 7, 295-305.
82. Konturek, S. (1985) *Fizjologia Układu Trawiennego. Fizjologiczne Podstawy Gastroenterologii*, Wydanie II, PZWL, Warszawa.
83. Krisch, B. (1976) Immunocytochemical and electron microscopic study of the rat hypothalamic nuclei and cell clusters under various experimental conditions. *Cell Tissue Res.*, 174, 109-127.
84. Krisch, B. (1977) Electronmicroscopic immunocytochemical study of the vasopressin-containing neurons of the thirsting rat. *Cell Tissue Res.*, 184, 237-247.
85. Krisch, B. (1980) Nongranular vasopressin synthesis and transport in early stages of rehydration. *Cell Tissue Res.*, 207, 89-107.
86. La Bella, F.S. (1968) Storage and secretion of neurohypophyseal hormones. *Canad. J. Physiol. Pharmacol.*, 46, 335-345.
87. Lagnado, M.L.J., Crowe, R., Lincoln, J., Burnstock, G. (1986) A reduction of nerves containing vasoactive intestinal polypeptide and serotonin, but not neuropeptide Y and noradrenaline, in cerebral blood vessel of the 8 week streptozotocin-induced diabetic rat. (Manuskrypt wysłany do druku-informacja ustna). <http://rcin.org.pl>

88. Lampert, P., Blumberg, J.M., Pentschew, A. (1964) An electron microscopic study of dystrophic axons in the gracile and cuneate nuclei of vitamin E-deficient rats. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 23, 60-76.
89. Larsson, L.-I. (1977) Ultrastructural localization of a new neuronal peptide (VIP). *Histochemistry*, 54, 173-176.
90. Larsson, L.-I., Fahrenkrug, J., Schaffalitzky de Muckadell, O., Sundler, F., Håkanson, R., Rehfeld, I.F. (1976) Localization of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) to central and peripheral neurons. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 73, 3197-3200.
91. Le Clerc, R., Pelletier, G. (1974) Electron microscopic immunocytochemical localization of vasopressin in the hypothalamus and neurohypophysis of the normal and Brattleboro rat. *Am. J. Anat.*, 140, 583-588.
92. Leander, S., Håkanson, R., Sundler, F. (1981) Nerves containing substance P, vasoactive intestinal polypeptide, enkephalin or somatostatin in the guinea-pig taenia coli. *Cell Tissue Res.*, 215, 21-39.
93. Lengvári, I., Liposits, Z., Vigh, S., Schally, A.V., Flerkó, B. (1985) The origin and ultrastructural characteristics of corticotropin-releasing factor (CRF)-immunoreactive nerve fibres in the posterior pituitary of the rat. *Cell Tissue Res.*, 240, 467-471.
94. Lincoln, J., Bokor, J.T., Crowe, R., Griffith, S.G., Haven, A.J., Burnstock, G. (1984) Myenteric plexus in streptozotocin-treated rats. Neurochemical and histochemical evidence for diabetic neuropathy in the gut. *Gastroenterology*, 86, 654-661.
95. Ljungdahl, A., Hökfelt, T., Nilsson, G. (1978) Distribution of substance P-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat. I. Cell bodies and nerve terminals. *Neuroscience*, 3, 861-943.
96. Locatelli, V., Miyoshi, A., Bestetti, G., Rossi, G.L., Müller, E.E. (1985) Effect of growth hormone-releasing stimuli in streptozotocin diabetic rats. *Brain Res.*, 341, 35-40.

97. Loesch, A. (1979) Badania mikroskopowo-elektronowe neurosekrecyjnego układu podwzgórzowo-przysadkowego szczura w stanie odwodnienia. Rozprawa doktorska, Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Warszawa.
98. Loesch, A. (1981a) The pituicytes in the normal and dehydrated rats: an electron-microscope study including ZIO-impregnation. *Neuropat. Pol.*, 19, 1-19.
99. Loesch, A. (1981b) Badania mikroskopowo-elektronowe neuronów jądra nadwzrokowego i przykomorowego szczura pozbawionego wody do picia. *Neuropat. Pol.*, 19, 487-510.
100. Loesch, A. (1983a) The neurohypophysial axons in normal and dehydrated rats: an electron microscopic study including ZIO-staining method. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 61, 321-338.
101. Loesch, A. (1983b) The effect of cerebral ischemia on the ultrastructure of the hypothalamo-neurohypophysial system of the mongolian gerbil. The supraoptic and paraventricular nuclei. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 61, 545-556.
102. Loesch, A. (1983c) The effect of cerebral ischemia on the ultrastructure of the hypothalamo-neurohypophysial system of the mongolian gerbil. The neurohypophysial axons and pituicytes. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 61, 557-568.
103. Loesch, A. (1984) ZIO-impregnowane kolbki synaptyczne w neuropilu jądra nadwzrokowego i przykomorowego szczura pozbawionego wody do picia. *Neuropat. Pol.*, 22, 39-62.
104. Loesch, A. (1985) A light and electron microscopic study of oxytocin-containing neurons in the paraventricular nucleus of the rat. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 63, 691-702.
105. Loesch, A. (1986) Effect of high ambient temperature on the neurohypophysis of the rabbit. A further evidence for ultrastructural alterations in neurohypophysial axons and pituicytes. *Neuropat. Pol.*, 24, 273-283.

106. Loesch, A., Burnstock, G. (1985) Ultrastructural identification of VIP-containing nerve fibres in the myenteric plexus of the rat ileum. *J. Neurocytol.*, 14, 327-335.
107. Loesch, A., Danielewicz, A., Borowicz, J.W. (1978) Obraz mikroskopowo-elektronowy układu neurosekrecyjnego w zaburzeniach osmotycznych u szczura. *Neuropat. Pol.*, 16, 473-486.
108. Luce, S.A., Gerritsen, G.C., Dulin, W.E. (1970) Cerebral abnormalities in diabetes mellitus: an ultrastructural study of the brain in early onset diabetes mellitus in Chinese hamster. *Diabetologia*, 6, 192-198.
109. Luppi, P.-H., Kitahama, K., Sakai, K., Sakamoto, T., Jouvet, M. (1984) Mise en évidence d'une localisation différente des périkarya immunoréactifs à l'ocytocine et à la vasopressine dans l'hypothalamus du chat. *Comptes Rendus, D*, 299, 703-706.
110. Magnoni, M.S., Kobayashi, H., Trezzi, E., Catapano, A., Spano, P.F., Trabucchi, M. (1984) B-Adrenergic receptors in brain microvessels of diabetic rats. *Life Sci.*, 34, 1095-1100.
111. Martin, R., Geis, R., Holl, R., Schäfer, M., Voigt, K.H. (1983) Co-existence of unrelated peptides in oxytocin and vasopressin terminals of rat neurohypophyses: immunoreactive methionine⁵-enkephalin-, leucine⁵-enkephalin- and cholecystokinin-like substances. *Neuroscience*, 8, 213-227.
112. McNeill, T.H., Sladek, J.R., Jr. (1980) Simultaneous monoamine histofluorescence and neuropeptide immunocytochemistry. II. Correlative distribution of catecholamine varicosities and magnocellular neurosecretory neurons in the rat supraoptic and paraventricular nuclei. *J. Comp. Neurol.*, 193, 1023-1033.
113. McNurland, M.A., Garlick, P.J. (1981) Protein synthesis in liver and small intestine in protein deprivation and diabetes. *Am. J. Physiol.*, 241, 238-245.

114. Milles, J.J., Baylis, F.H., Wright, A.D. (1981) Plasma vasopressin during insulin withdrawal in insulin-dependent diabetes. *Diabetologia*, 20, 607-611.
115. Monckton, G., Pehowich, E. (1980) Anatomic neuropathy in the streptozotocin-diabetic rat. *Can. J. Neurol. Sci.*, 7, 135-142.
116. Mordes, J.P., Rossini, R.A. (1981) Animal models of diabetes. *Am. J. Med.*, 70, 353-360.
117. Morris, J.F. (1983) Organization of neural inputs to the supraoptic and paraventricular nuclei: anatomical aspects. *Progr. Brain Res.*, 60, 3-18.
118. Morris, J.F., Dyball, R.E.J. (1974) A quantitative study of the ultrastructural changes in the hypothalamo-neurohypophysial system during and after experimentally induced hypersecretion. *Cell Tissue Res.*, 149, 525-535.
119. Moses, A.M., Miller, M. (1970) Accumulation and release of pituitary vasopressin in rats heterozygous for hypothalamic Diabetes insipidus. *Endocrinology*, 86, 34-42.
120. Mossakowski, M.J., Renkawek, K. (1981) Encefalopatie endogenna. W: *Podstawy Neuropatologii*, (wyd.: Mossakowski, M.J., Dymiecki, J., Wender, M.), Rozdz. XIV, PZWL, Warszawa, 355-387.
121. Mukai, M., Hori, S., Pomeroy, M. (1980) Cerebral lesions in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 51, 79-84.
122. Naftolin, F., Bruhlmann-Papazyan, M., Baeten, S., Garcia-Segura, L.M. (1985) Neurons with whorl bodies have increased number of synapses. *Brain Res.*, 329, 289-293.
123. Nakayama, H., Ito, M., Nakagawa, S. (1974) Influence of diet on intestinal DNA synthesis in the diabetic rat. *Diabetes*, 23, 793-795.
124. Nelson, J.S., Lacy, P.E., Hirshberg, G.E. (1976) Megacolon and autonomic neuropathy in diabetic rats. *J. Neuropathol. Exp. Neurol. (Abstr.)*, 35, 335.

125. Nishi, S., North, R.A. (1973) Intracellular recording from the myenteric plexus of the guinea-pig ileum. *J. Physiol. (London)*, 231, 471-491.
126. Norström, A. (1973) Subcellular distribution of neurophysin in rats subjected to haemorrhage, salt-loading and lactation and in rats with hereditary diabetes insipidus (Brattleboro strain). *Z. Zellforsch.*, 140, 413-424.
127. Norström, A. (1974) The heterogeneity of the neurohypophysial pool of neurophysin. W: Proceedings of the Fourth International Symposium on Neurosecretion, (wyd.: Knowles, F., Vollrath, L.), Springer, New York, 86-93.
128. Palay, S.L. (1955) An electron microscope study of the neurohypophysis in the normal, hydrated and dehydrated rat. *Anat. Rec.*, 121, 348-353.
129. Papka, R.E., Cotton, J.P., Trauring, M.H. (1985) Comparative distribution of neuropeptide tyrosine-, vasoactive intestinal polypeptide-, substance P-immunoreactive, acetylcholinesterase-positive and noradrenergic nerves in the reproductive tract of the female rat. *Cell Tissue Res.*, 242, 475-490.
130. Pardoe, A.V., Weatherall, M. (1955) The intracellular localization of oxytocin and vasopressin substances in the pituitary glands of rats. *J. Physiol. (London)*, 127, 201-112.
131. Paz(Frankel), G., Homonnai, Z.T., Drasnin, N., Sofer, A., Kaplan, R., Kraicer, P.F. (1978) Fertility of the streptozotocin-diabetic male rat. *Andrologia*, 10, 127-136.
132. Piekut, D.T. (1983) Ultrastructural characteristics of vasopressin-containing neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Cell Tissue Res.*, 234, 125-134.
133. Polak, J.M., Bloom, S.R. (1980) The distribution and significance of the VIP-ergic system in man and other mammals. *Endocrinol. Japan*, 1, 11-21.
134. Polak, J.M., Bloom, S.R., Sullivan, S.N., Facer, P., Pearse, A.G.E. (1977) Enkephalin-like immunoreactivity in the human gastrointestinal tract. *Lancet*, 1, 972-974.

135. Powell, H.C. (1983) Pathology of diabetic neuropathy: new observations, new hypotheses. *Lab. Invest.*, 49, 515-518.
136. Powell, H.C., Rosoff, J., Myers, R.R. (1985) Microangiopathy in human diabetic neuropathy. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 68, 295-305.
137. Powell, H., Knox, D., Lee, S., Charters, A.C., Orloff, M., Garrett, M.S., Lampert, P. (1977) Alloxan diabetic neuropathy - electron microscopic evidence. *Neurology (Minneap.)*, 27, 60-66.
138. Probert, L., De Mey, J., Polak, J.M. (1981) Distinct subpopulation of enteric p-type neurones contain substance P and vasoactive intestinal polypeptide. *Nature*, 294, 470-471.
139. Probert, L., De Mey, J., Polak, J.M. (1983) Ultrastructural localization of four different neuropeptides within separate population of p-type nerves in the guinea-pig colon. *Gastroenterology*, 85, 1094-1104.
140. Raine, C.S., Field, E.J. (1967) Orientated tubules in axoplasm of cerebellar myelinated fibres in rat. A study of normal and scarpie animals. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 9, 298-304.
141. Rakieten, N., Rakieten, M.L., Nadkarni, M.P. (1963) Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). *Cancer Chemother. Rep.*, 29, 91-98.
142. Richter, D., Schmale, H. (1984) Vasopressin - expression in normal and diabetes insipidus (Brattleboro) rats. *Trends Neurosciences*, 7, 317-319.
143. Rossi, G.L., Bestetti, G. (1981) Morphological changes in the hypothalamic-hypophyseal-gonadal axis of male rats after twelve months of streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, 21, 476-481.
144. Said, S.I., Mutt, V. (1970) Polypeptide with broad biological activity: isolation from small intestine. *Science*, 169, 1217-1218.

145. Said, S.I., Rosenberg, R.N. (1976) Vasoactive intestinal polypeptide: abundant immunoreactivity in neural lines and normal nervous tissue. *Science*, 192, 907-908.
146. Sawchenko, P.E., Swanson, L.W. (1981) The distribution and cells of origin of some afferent projections to the paraventricular and supraoptic nuclei in the rat. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 7, 325.
147. Sawchenko, P.E., Swanson, L.W. (1983) The organization and biochemical specificity of afferent projections to the paraventricular and supraoptic nuclei. *Progr. Brain Res.*, 60, 19-29.
148. Sawchenko, P.E., Swanson, L.W., Joseph, S.A. (1982) The distribution of cells of origin of ACTH(1-39)-stained varicosities in the paraventricular and supraoptic nuclei. *Brain Res.*, 232, 365-374.
149. Scharrer, E., Scharrer, B. (1940) Secretory cells within the hypothalamus. *Res. Publ. Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis.*, 20, 170-194.
150. Scharrer, E., Scharrer, B. (1954) Hormones produced by neurosecretory cells. *Recent Progr. Horm. Res.*, 10, 183-232.
151. Schiebler, T.H. (1952) Cytochemische und elektronen mikroskopische Untersuchungen an granuläre Fraktionen der Neurohypophyse des Rindes. *Z. Zellforsch.*, 36, 563-576.
152. Schmidt, R.E., Nelson, J.S., Johnson, E.M. (1981) Experimental diabetic autonomic neuropathy. *Am. J. Pathol.*, 103, 210-225.
153. Schmidt, R.E., Plurad, S.B., Modert, C.W. (1983) Experimental diabetic autonomic neuropathy characterization in streptozotocin-diabetic Sprague-Dawley rats. *Lab. Invest.*, 49, 538-552.
154. Schmidt, H., Riemann, J.F., Schmid, A., Sailer, D. (1984) Ultrastruktur der diabetischen autonomen Neuropathie des Gastrointestinaltraktes. *Klin. Wochenschr.*, 62, 399-405.

155. Schofield, G.C. (1968) Anatomy of muscular and neural tissues in the alimentary canal. W: Handbook of Physiology, Sect. 6, Alimentary Canal, Vol. 4, Motility, (wyd.: Code, C.F.), Washington D.C., Am. Physiol. Soc., 1579-1627.
156. Schultzberg, M., Hökfelt, T., Nilsson, G., Terenius, L., Rehfeld, J.F., Brown, M., Elde, R.P., Goldstein, M., Said, S. (1980) Distribution of peptide- and catecholamine-containing neurons in the gastrointestinal tract of rat and guinea-pig: immunohistochemical studies with antisera to substance P, vasoactive intestinal polypeptide, enkephalins, somatostatin, gastrin/cholecystokinin, neurotensin, and dopamine-beta-hydroxylase. *Neuroscience*, 5, 689-744.
157. Scott, L.D., Ellis, T.M. (1980) Small intestinal transit and myoelectrical activity in diabetic rat. *Can. J. Neurol. Sci.*, 7, 135-142.
158. Sharma, A.K., Thomas, P.K. (1974) Peripheral nerve structure and function in experimental diabetes. *J. Neurol. Sci.*, 23, 1-15.
159. Sidenius, P., Jakobsen, J. (1981) Retrograde axonal transport: a possible role in the development of neuropathology. *Diabetologia*, 20, 110-112.
160. Silverman, A.J. (1976) Ultrastructural studies on the localization of neurohypophysial hormones and their carrier proteins. *J. Histochem. Cytochem.*, 24, 816-827.
161. Silverman, A.J., Pickard, G.E. (1983) The hypothalamus. W: *Chemical Neuroanatomy*, (wyd.: Emson, P.C.), Raven Press, New York, 295-336.
162. Silverman, A.J., Zimmerman, E.A. (1983) Magnocellular neurosecretory system. *Ann. Rev. Neurosci.*, 6, 357-380.
163. Silverman, A.J., Hou-Yu, A., Zimmerman, E.A. (1983) Ultrastructural studies of vasopressin neuron of the paraventricular nucleus of the hypothalamus using a monoclonal antibody to vasopressin: analysis of synaptic input. *Neuroscience*, 9, 141-155.

164. Sims, K., Hoffman, D.L., Said, S.I., Zimmerman, E.A. (1980) Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in mouse and rat brain: an immunocytochemical study. *Brain Res.*, 186, 165-183.
165. Sloper, J.C. (1972) The validity of current concepts of hypothalamo-neurohypophyseal neurosecretion. *Progr. Brain Res.*, 33, 123-143.
166. Smith, K.R. (1961) Experimental cretinism in rats. *Neurology (Minneapolis)*, 11, 470-473.
167. Sofroniew, M.V., Glasmann, W. (1981) Golgi like immunoperoxidase staining of hypothalamic magnocellular neurons that contain vasopressin, oxytocin or neurophysin in the rat. *Neuroscience*, 6, 619-643.
168. Sofroniew, M.V., Eckenstein, F., Schrell, U., Cuello, A.C. (1984) Evidence for colocalization of neuroactive substances in hypothalamic neurons. *W: Coexistence of Neuroactive Substances in Neurons*, (wyd.: Chan-Palay, V., Palay, S.L.), John Wiley and Sons, New York-Chichester-Brisbane-Toronto-Singapore, 73-90.
169. Schel, H., Valtin, H. (1965) Morphology of the neurosecretory system of rats homozygous and heterozygous for hypothalamic diabetes insipidus (Brattleboro strain). *Endocrinology*, 6, 90-97.
170. Spindler-Vomachka, M., Johnson, D.G., (1985) Altered hypothalamic-pituitary function in the adult female rat with streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, 28, 33-44.
171. Sternberger, L.A. (1973) *Immunocytochemistry*, Drugie wydanie, John Wiley and Sons, New York.
172. Sternberger, L.A., Hardy, P.H.Jr., Cuculis, J.J., Meyer, H.G. (1970) The unlabelled antibody enzyme method of immunocytochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochets. *J. Histochem. Cytochem.*, 18, 315-333.

173. Stoeckel, M.E., Porte, A., Klein, M.J., Cuello, A.C. (1982) Immunocytochemical localization of substance P in the neurohypophysis and hypothalamus of the mouse compared with the distribution of other neuropeptides. *Cell Tissue Res.*, 223, 533-544.
174. Sundler, F., Håkanson, R., Leander, S. (1980) Peptidergic nervous systems in the gut. *Clin. Gastroenterology*, 9, 517-520.
175. Sutherland, S.D. (1967) The neurons of the gall bladder and gut. *J. Anat. (London)*, 10, 701-709.
176. Swaab, D.F., Nijveldt, F., Pool, C.W. (1975) Distribution of oxytocin and vasopressin in the rat supraoptic and paraventricular nuclei. *J. Endocrinol.*, 67, 461-462.
177. Swanson, L.W., Sawchenko, P.E. (1983) Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Ann. Rev. Neurosci.*, 6, 269-324.
178. Tasso, F., Rua, S. (1978) Ultrastructural observations of the hypothalamo-posthypophysial complex of the Brattleboro rat. *Cell Tissue Res.*, 191, 267-289.
179. Tasso, F., Rua, S., Picard, D. (1977) Cytochemical duality of neurosecretory material in the hypothalamo-posthypophysial system of the rat as related to hormonal content. *Cell Tissue Res.*, 180, 11-29.
180. Taxi, J. (1965) Contribution a l'étude des connexions des neurones moteurs du systeme nerveux autonomie. *Ann. Sci. Nat. Zool. Biol. Anim.*, 12, 413-647.
181. Theodosis, D.T., Poulain, D.A. (1984) Evidence that oxytocin-secreting neurones are involved in the ultrastructural reorganization of the rat supraoptic nucleus apparent at lactation. *Cell Tissue Res.*, 235, 217-219.
182. Trendelenburg, P. (1917) Physiologische und pharmakologische über die Dunndarm peristaltick. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, 81, 55-129.
183. Valtin, H., Schroeder, H.A. (1964) Familial hypothalamic diabetes insipidus in rats (Brattleboro strain). *Am. J. Physiol.*, 206, 425-430.

184. Valtin, H., Sawyer, W.H., Sokol., H.W. (1965) Neurohypophysial principles in rats homozygous and heterozygous for hypothalamic diabetes insipidus (Brattleboro strain). *Endocrinology*, 77, 701-706.
185. Van Leeuwen, F.W., Swabb, D.F. (1977) Specific immunoelectron-microscopic localization of vasopressin and oxytocin in the neurohypophysis of the rat. *Cell Tissue Res.*, 177, 493-501.
186. Van Leeuwen, F.W., Pool, C.W., Sluter, A.A. (1983) Enkephalin immunoreactivity in synaptoid elements on glial cells in the rat neural lobe. *Neuroscience*, 8, 229-249.
187. Van Leeuwen, F.W., De Raay, C., Swaab, D.F., Fisser, B. (1979) The localization of oxytocin, vasopressin, somatostatin and luteinizing hormone releasing hormone in the rat neurohypophysis. *Cell Tissue Res.*, 202, 189-201.
188. Vanderhaeghen, J.J., Lotstra, F., Vandesande, F., Dierickx, K. (1981) Coexistence of cholecystokinin and oxytocin-neurophysin in some magnocellular hypothalamo-neurohypophyseal neurons. *Cell Tissue Res.*, 221, 227-231.
189. Vandesande, F., Dierickx, K. (1975) Identification of the vasopressin producing and of the oxytocin producing neurons in the hypothalamic magnocellular neurosecretory system of the rat. *Cell Tissue Res.*, 154, 153-162.
190. Vandesande, F., Dierickx, K. (1976) Immuno-cytochemical demonstration of the inability of the homozygous Brattleboro rat to synthesize vasopressin and vasopressin-associated neurophysin. *Cell Tissue Res.*, 165, 307-316.
191. Vandesande, F., Dierickx, K., De Mey, J. (1975) Identification of the vasopressin-neurophysin II and oxytocin-neurophysin I producing neurons in the bovine hypothalamus. *Cell Tissue Res.*, 156, 189-200.
192. Vandesande, F., Dierickx, K., De Mey, J. (1977) The origin of the vasopressinergic and oxytocinergic fibres of the external region of the median eminence of the rat hypophysis. *Cell Tissue Res.*, 180, 443-452.

193. Walsh, C.H., Baylis, P.H., Malins, J.M. (1979) Plasma arginine vasopressin in diabetic ketoacidosis. *Diabetologia*, 16, 93-96.
194. Watson, S.J., Akil, H., Fischli, W., Goldstein, A., Zimmerman, E., Nilaver, G., Van Wiersma Greidanus, T.B. (1982) Dynorphin and vasopressin: Common localization in magnocellular neurons. *Science*, 216, 85-87.
195. Weekley, D.B. (1984) A mechanism by which primary or secondary hypothalamic involvement results in the development of insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *J. Theor. Biol.*, 111, 171-182.
196. Weihe, E., Reinecke, M., Forssmann, W.G. (1984) Distribution of vasoactive intestinal polypeptide-like immunoreactivity in the mammalian heart. Interrelation with neurotensin- and substance P-like immunoreactive nerves. *Cell Tissue Res.*, 236, 527-540.
197. Wood, J.D. (1975) Neurophysiology of Auerbach's plexus and control of intestinal motility. *Physiol. Rev.*, 55, 307-324.
198. Wood, J.D. (1979) Neurophysiology of the enteric nervous system. *W: Integrative Function of the Anatomic Nervous System*, (wyd.: McBrooks, C., Koizumi, K., Sato, A.), Elsevier/North-Holland, Amsterdam, 177-193.
199. Young, T.K., Van Dyke, H.B. (1968) Depletion of vasopressin and oxytocin in the posterior lobe of the pituitary gland of the rat. *J. Endocrinol.*, 40, 337-342.
200. Yu, M.C., Bakay, L., Lee, J.C. (1972a) Ultrastructure of the central nervous system after prolonged hypoxia. I. Neuronal alterations. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 22, 222-234.
201. Yu, M.C., Bakay, L., Lee, J.C. (1972b) Ultrastructure of the central nervous system after prolonged hypoxia. II. Neuroglia and blood vessels. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 22, 235-244.

202. Yukitake, Y., Taniguchi, Y., Kurosumi, K. (1977) Ultrastructural studies on the secretory cycle of the neurosecretory cells and the formation of Herring bodies in the paraventricular nucleus of the rat. *Cell Tissue Res.*, 177, 1-8.
203. Zambrano, D., De Robertis, E. (1966) The secretory cycle of supraoptic neurons in the rat. A structural and functional correlation. *Z. Zellforsch.*, 73, 414-431.
204. Zerbe, R.L., Vinicor, F., Robertson, G.L. (1979) Plasma vasopressin in uncontrolled diabetes mellitus. *Diabetes*, 28, 503-508.
205. Zimmerman, E.A., Antunes, J.L. (1976) Organization of the hypothalamic-pituitary system: Current concepts from immunocytochemical studies. *J. Histochem. Cytochem.*, 24, 807-815.

Andrzej Loesch

ZMIANY ULTRASTRUKTURALNE I IMMUNOCYTOCHEMICZNE NEUROSEKRECYJNEGO
UKŁADU PODWZGÓRZOWO-PRZYSADKOWEGO ORAZ SPLOTU AUERBACHA JELITA
KRĘTEGO SZCZURA W DOŚWIADCZALNEJ CUKRZYCY INSULINOZALEŻNEJ

Dokumentacja fotograficzna

Z Pracowni Ultrastruktury Układu Nerwowego kierowanej przez
Prof. Jerzego W. Borowicza - Instytut Centrum Medycyny
Doświadczalnej i Klinicznej Polskiej Akademii Nauk,
ul. Dworkowa 3, 00-784 Warszawa

Praca wykonana na stopień doktora habilitowanego
nauk przyrodniczych

Warszawa 1986

SPIS RYCIN

Ryciny poglądowe

- Ryc. A. Obszar podwzgórza szczura związany ze zjawiskiem neurosekrecji oksytocyny i wazopresyny.
- Ryc. B. Jelito kręte szczura i wazoaktywny polipeptyd jelitowy w splocie Auerbacha.

Badania konwencjonalne

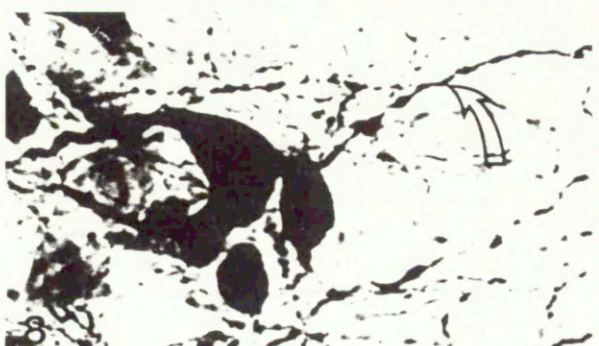
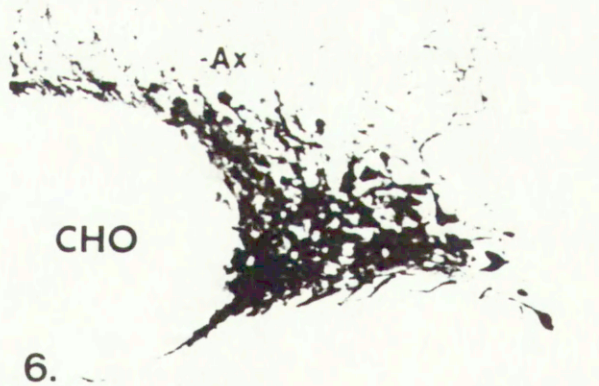
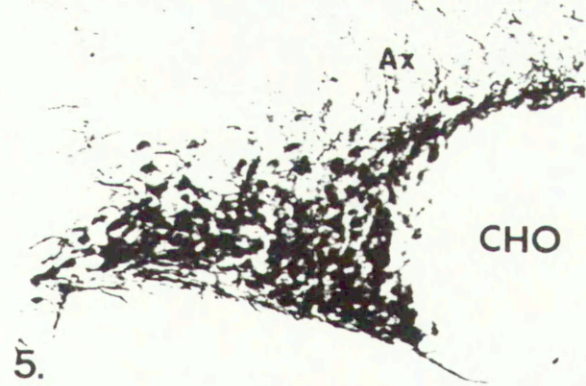
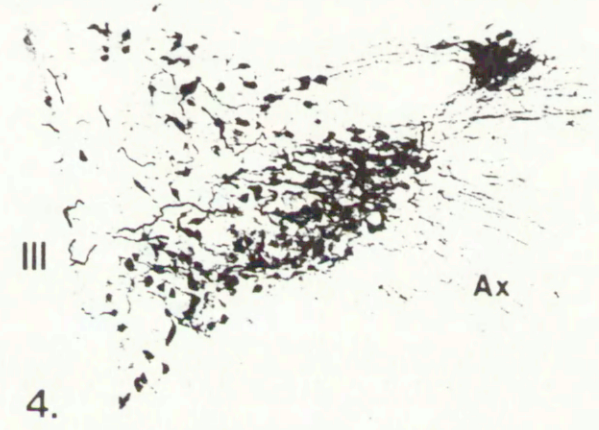
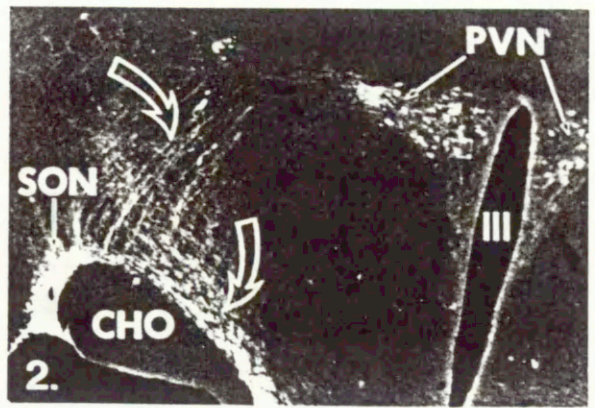
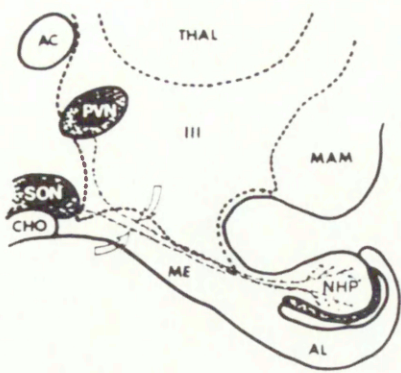
- Ryc. 1. STZ-niediabetyczny szczur; jądro nadwzrokowe i jądro przykomorowe.
- Ryc. 2. STZ-niediabetyczny szczur; przysadka nerwowa.
- Ryc. 3. STZ-niediabetyczny szczur; splot Auerbacha.
- Ryc. 4. STZ-diabetyczny szczur; jądro nadwzrokowe i jądro przykomorowe.
- Ryc. 5. STZ-diabetyczny szczur; jądro nadwzrokowe i jądro przykomorowe.
- Ryc. 6. STZ-diabetyczny szczur; przysadka nerwowa.
- Ryc. 7. STZ-diabetyczny szczur; splot Auerbacha.

Badania immunocytochemiczne

- Ryc. 8. STZ-niediabetyczny szczur; jądro nadwzrokowe i jądro przykomorowe.
- Ryc. 9. STZ-niediabetyczny szczur; jądro nadwzrokowe i jądro przykomorowe.
- Ryc. 10. STZ-niediabetyczny szczur; przysadka nerwowa.
- Ryc. 11. STZ-niediabetyczny szczur; splot Auerbacha.
- Ryc. 12. STZ-diabetyczny szczur; jądro nadwzrokowe i jądro przykomorowe.
- Ryc. 13. STZ-diabetyczny szczur; jądro nadwzrokowe i jądro przykomorowe.
- Ryc. 14. STZ-diabetyczny szczur; jądro nadwzrokowe, jądro przykomorowe i przysadka nerwowa.
- Ryc. 15. STZ-diabetyczny szczur; splot Auerbacha.

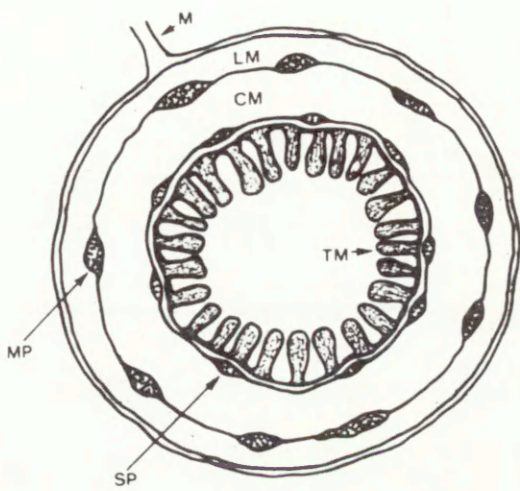
Ryc. A(1-8). Obszar podwzgórza szczura związany ze zjawiskiem neurosekrecji oksytocyny (OT) i wazopresyny (VP).

1. Schemat obrazuje podwzgórze i jego powiązanie z przysadką nerwową ujęte w płaszczyźnie strzałkowej. PVN-jądro przykomorowe, SON-jądro nadwzrokowe, NHP-przysadka nerwowa, AL-przysadka gruczołowa, ME-wyniosłość przysadkowa, THAL-wzgórze, AC-wiązadło przednie, CHO-skrzyżowanie wzrokowe, MAM-ciała suteczkowate, III-komora trzecia (ograniczona linią przerywaną). Strzałki wskazują szlak nadwzrokowo-i przykomorowo-przysadkowy.
2. Przekrój poprzeczny podwzgórza uwidacznia w ujęciu negatywowym PAP-dodatnie jądro przykomorowe (PVN), jądro nadwzrokowe (SON) oraz szlak nadwzrokowo-i przykomorowo-przysadkowy (strzałki). CHO-skrzyżowanie wzrokowe, III-światło komory trzeciej.
3. Neurony zawierające OT w jądrze przykomorowym. Ax-aksony szlaku przykomorowo-przysadkowego, III-komora trzecia.
4. Neurony zawierające VP w jądrze przykomorowym. Ax-aksony szlaku przykomorowo-przysadkowego, III-komora trzecia.
5. Neurony zawierające OT w jądrze nadwzrokowym. Ax-aksony szlaku nadwzrokowo-przysadkowego, CHO-skrzyżowanie wzrokowe.
6. Neurony zawierające VP w jądrze nadwzrokowym. Ax-aksony szlaku nadwzrokowo-przysadkowego, CHO-skrzyżowanie wzrokowe.
7. Neurony zawierające OT; strzałka wskazuje akson.
8. Neurony zawierające VP; strzałka wskazuje akson.

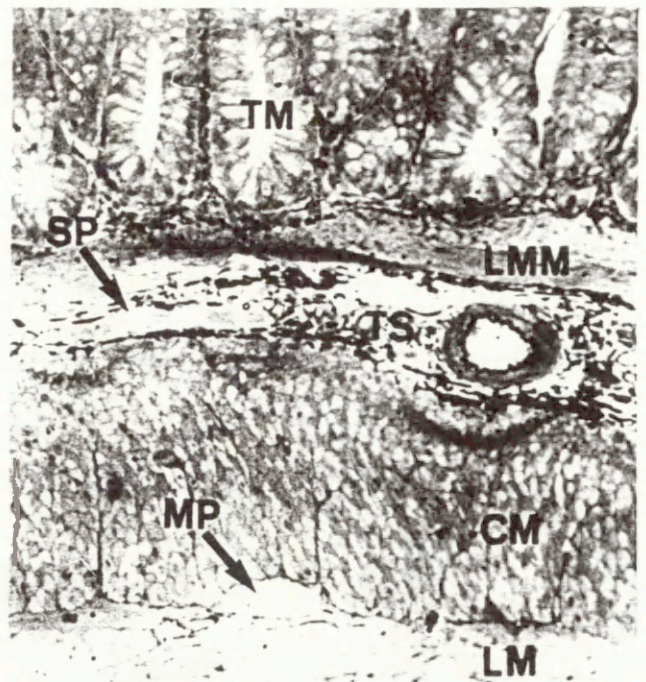


Ryc. B(1-5). Jelito kręte szczura i VIP-ergiczny komponent splotu Auerbacha.

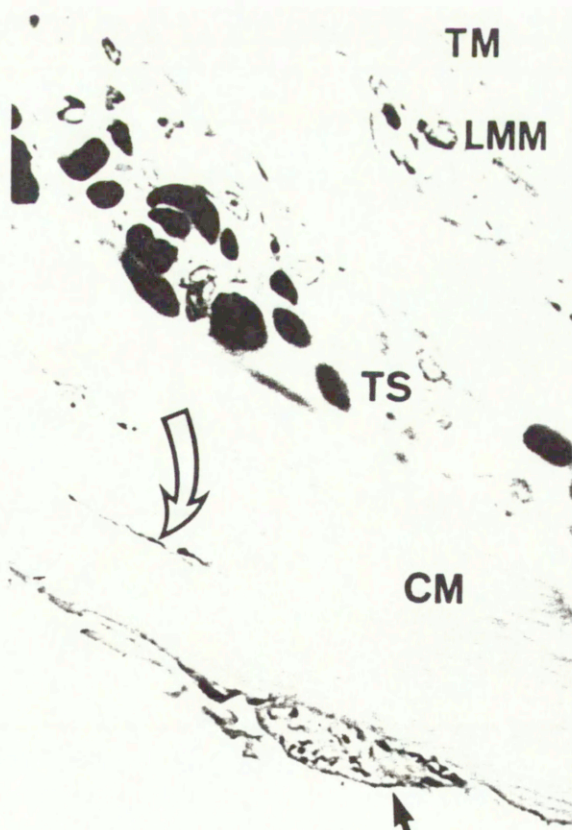
1. Schemat obrazuje jelito cienkie przekrojone poprzecznie. M-kreska, LM-podłużna warstwa mięśniowa, MP-zwój splotu Auerbacha, CM-okrężna warstwa mięśniowa, SP-zwój splotu Meissnera, TM-błona śluzowa.
2. Makroskrawek aralditowy jelita krętego uwidacznia błonę śluzową (TM), podśluzową błonę mięśniową (LMM), zwój splotu Meissnera (SP), kolagenową tkankę podśluzową (TS), okrężną warstwę mięśniową (CM), zwój splotu Auerbacha (MP) i podłużną warstwę mięśniową (LM).
3. Makroskrawek aralditowy poprzecznie przekrojonego jelita krętego z usuniętą podłużną warstwę mięśniową. Odskonięty zwój splotu Auerbacha (MP) uwidacznia PAP-dodatnie VIP-ergiczne unerwienie (ciemny precypitat); VIP-ergiczne unerwienie (strzałka) widoczne jest również w obrębie okrężnej warstwy mięśniowej (CM). TS-kolagenowa tkanka podśluzowa, LMM-podśluzowa błona mięśniowa, TM-fragment błony śluzowej.
4. Immunofluorescencja VIP-ergicznego komponentu splotu Auerbacha jelita krętego STZ-niediabetycznego szczura. Zdjęcie wykonano prostopadle do powierzchni jelita z usuniętą błoną śluzową i podśluzową tkanką kolagenową. (Zdjęcie z pracy: Belai i wsp., 1985).
5. Intensywna immunofluorescencja VIP-ergicznego komponentu nerwowego splotu Auerbacha jelita krętego STZ-diabetycznego szczura. Zdjęcie wykonano prostopadle do powierzchni jelita z usuniętą błoną śluzową i podśluzową tkanką kolagenową. (Zdjęcie z pracy: Belai i wsp., 1985).



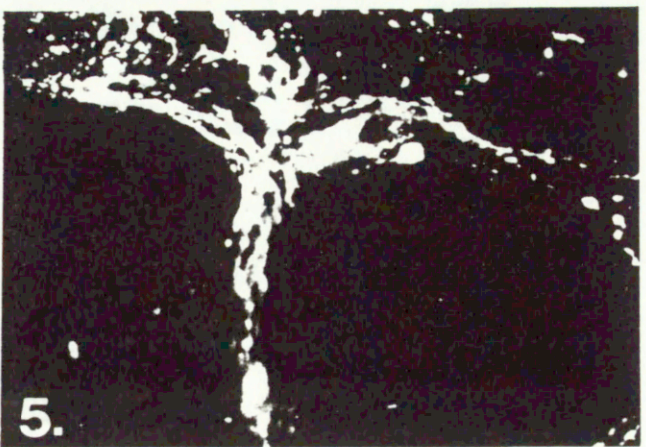
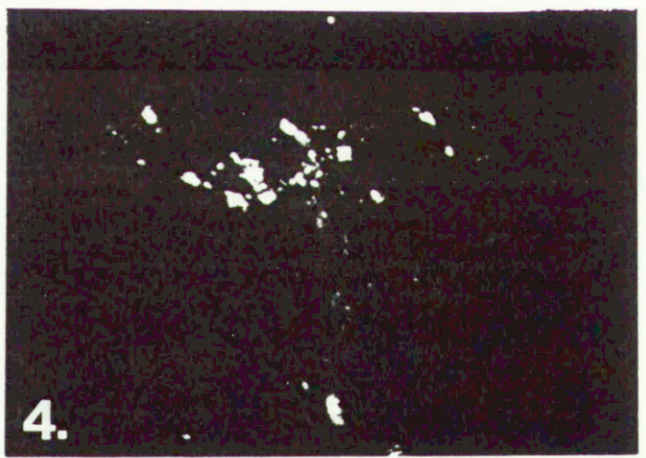
1.



2.

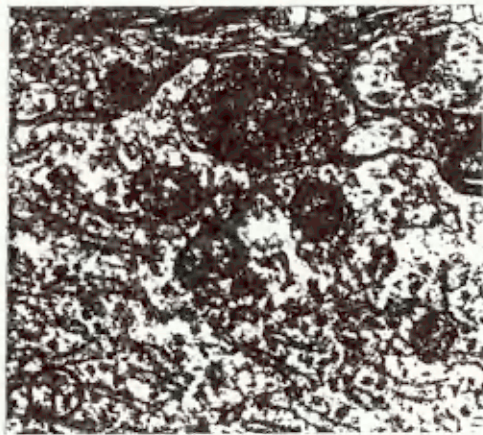
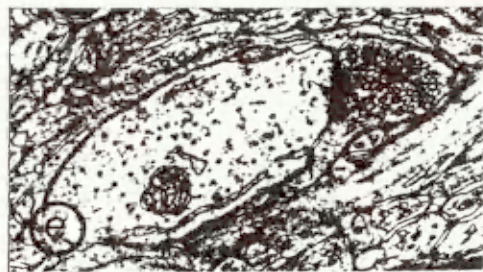
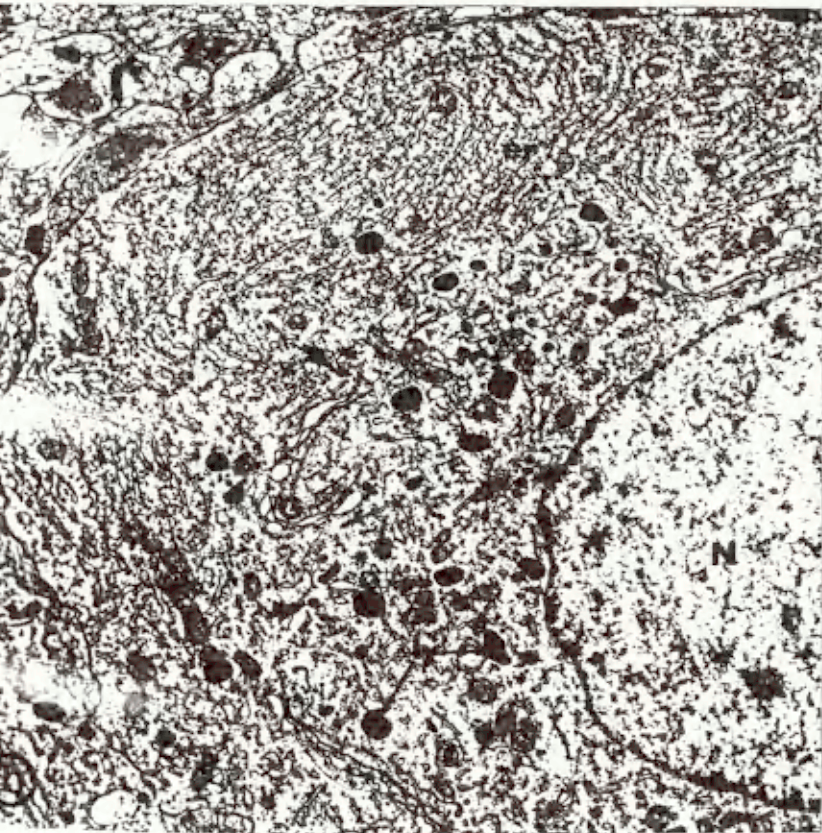
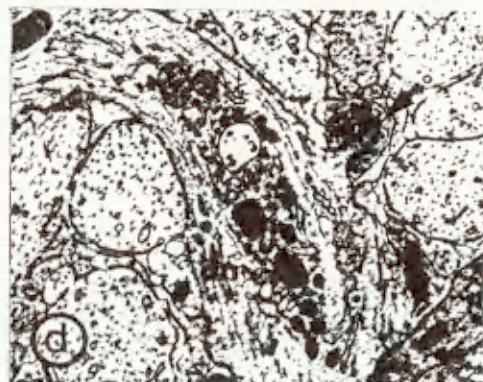
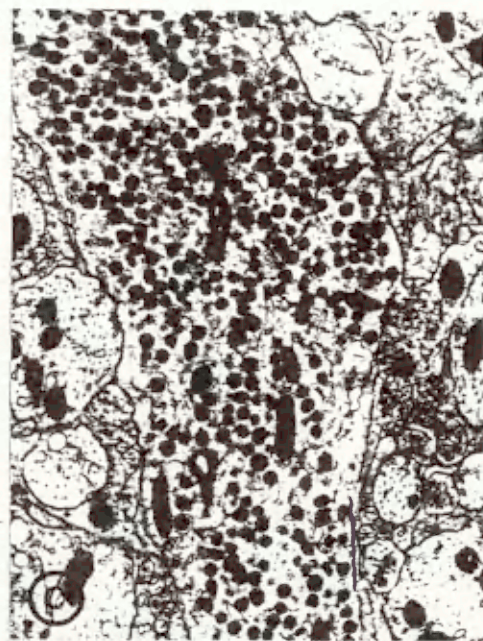
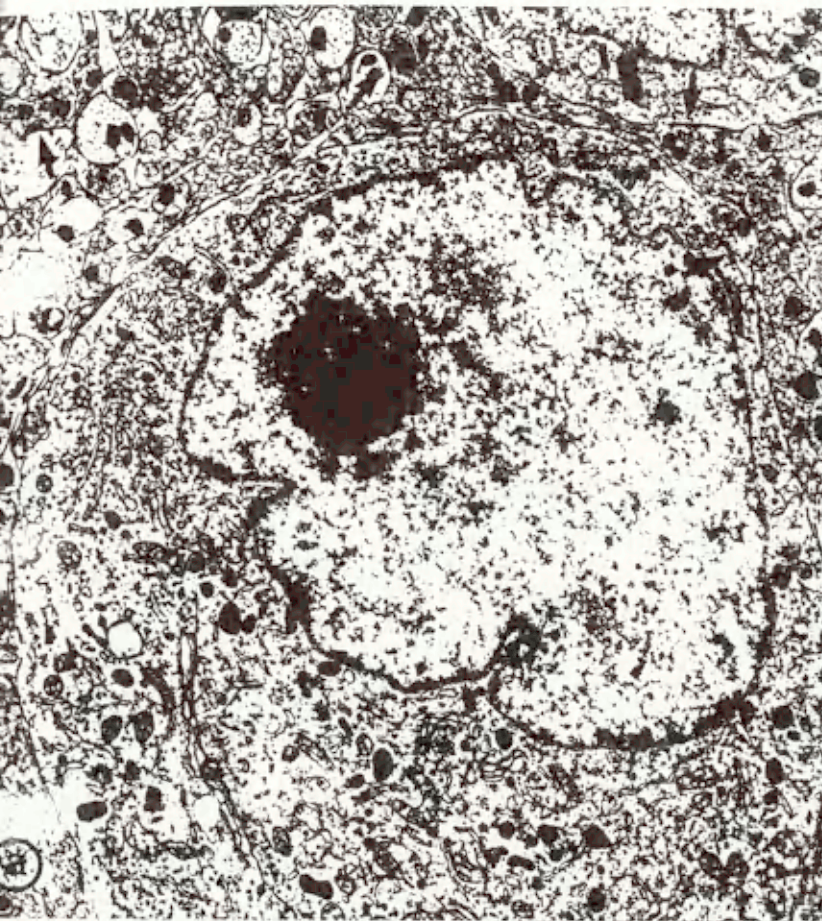


3.



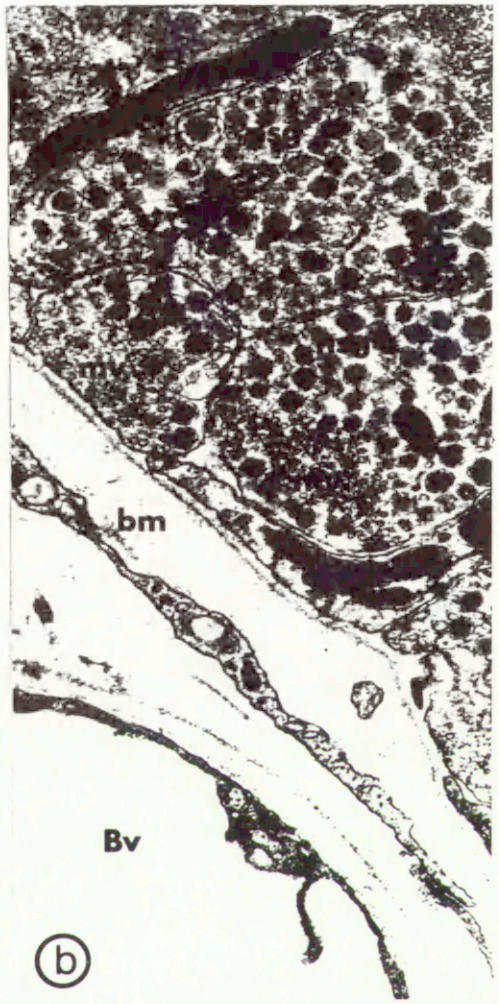
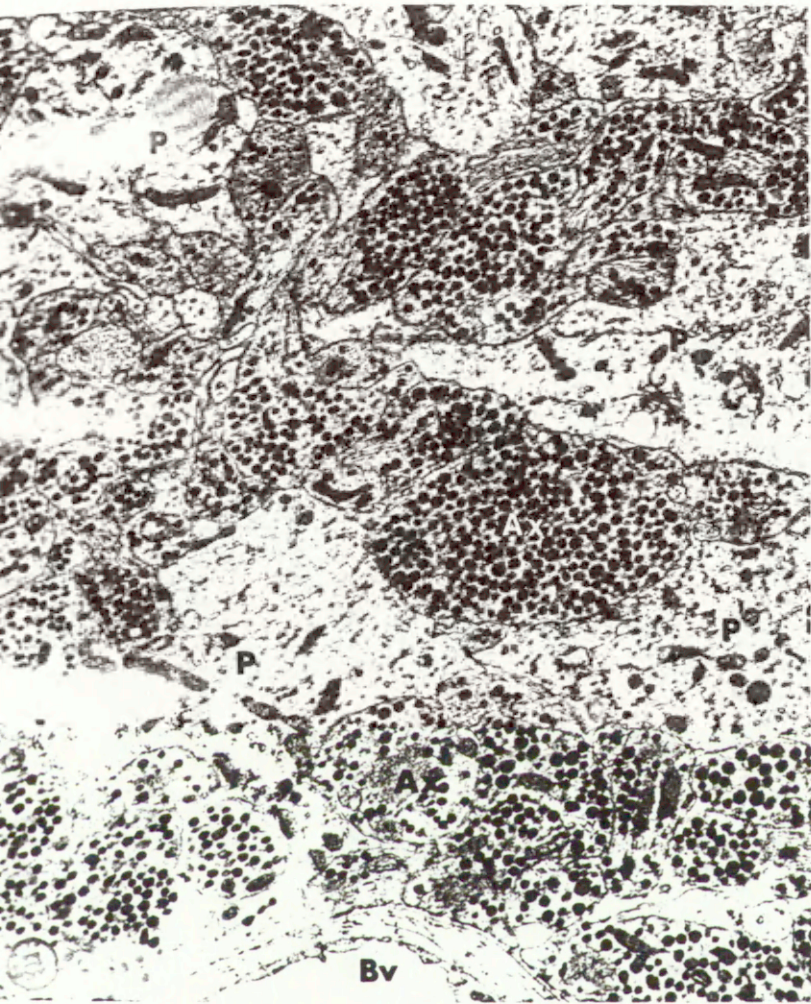
Ryc. 1(a-f). STZ-niediabetyczny szczur/badania konwencjonalne; jądro nadwzrokowe (SON) i jądro przykomorowe (PVN).

- a. SON. Perykarion z widocznym jądrem i jąderkiem; G-kompleks Golgiego. Widoczne są akso-dendrytyczne i akso-somatyczne synapsy asymetryczne (strzałki). Pow. 7 000 x.
- b. PVN. Perykarion z obwodowo umiejscowioną obfitą siateczką śródplazmatyczną ziarnistą (er); H-jądro, G-kompleks Golgiego, ly-lizosomy, strzałki-ziarnistości neurosekrecyjne. Pow. 7 000 x.
- c. SON. W neuropilu profil aksonu wypełniony ziarnistościami neurosekrecyjnymi. Widoczne są zakończenia aksonów tworzące asymetryczne połączenia akso-aksonalne (strzałki). Pow. 10 000 x.
- d. SON. W neuropilu profil dendrytu (dn) z rybosomami, lizosomami, mitochondriami i kilkoma ziarnistościami neurosekrecyjnymi; na kolcu tego dendrytu jest utworzone asymetryczne połączenie synaptyczne (strzałka). Pow. 10 000 x.
- e. PVN. W neuropilu widoczna jest asymetryczna synapsa akso-dendrytyczna. Pow. 20 000 x.
- f. PVN. W neuropilu widoczna jest asymetryczna synapsa akso-somatyczna. Pow. 20 000 x.



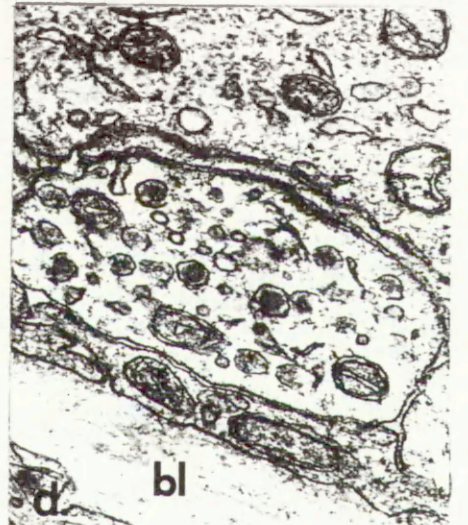
Ryc. 2(a-b). STZ-niediabetyczny szczur/badania konwen-
cjonalne; przysadka nerwowa (NHP).

- a. Ogólny widok NHP obrazujący liczne aksony z ziarnistościami neurosekrecyjnymi (Ax) i wypustki pituicytów (P); Bv-naczynie krwionośne. Pow. 5 000 x.
- b. Zakończenia aksonów opierające się o ścianę naczynia krwionośnego (Bv) zawierają liczne ziarnistości neurosekrecyjne (nsq) i agranularne mikropęcherzyki (mv); bm-błona podstawna. Pow. 25 000 x.



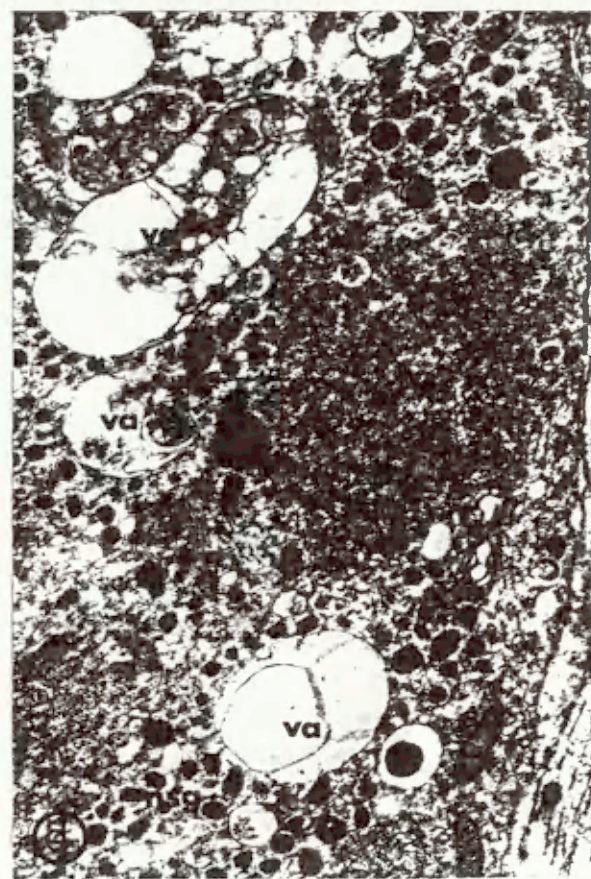
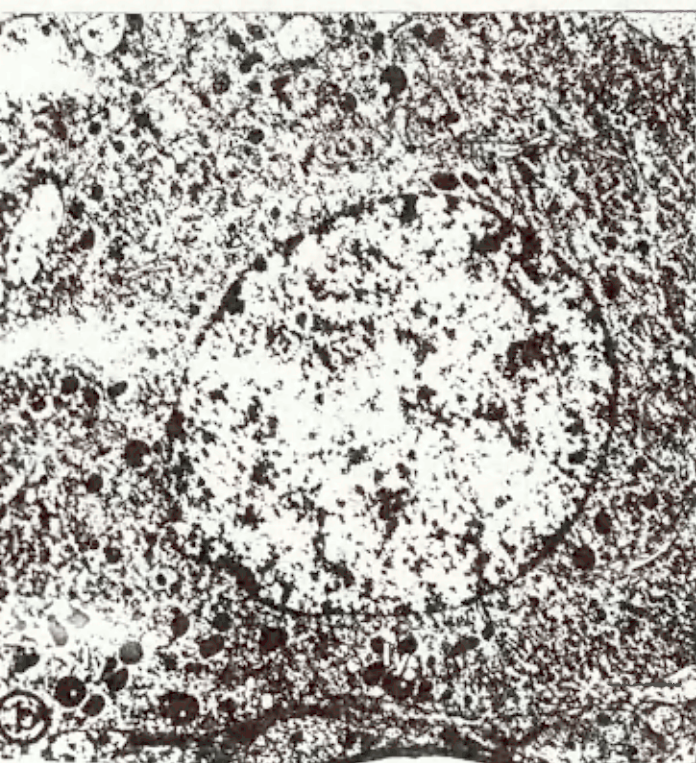
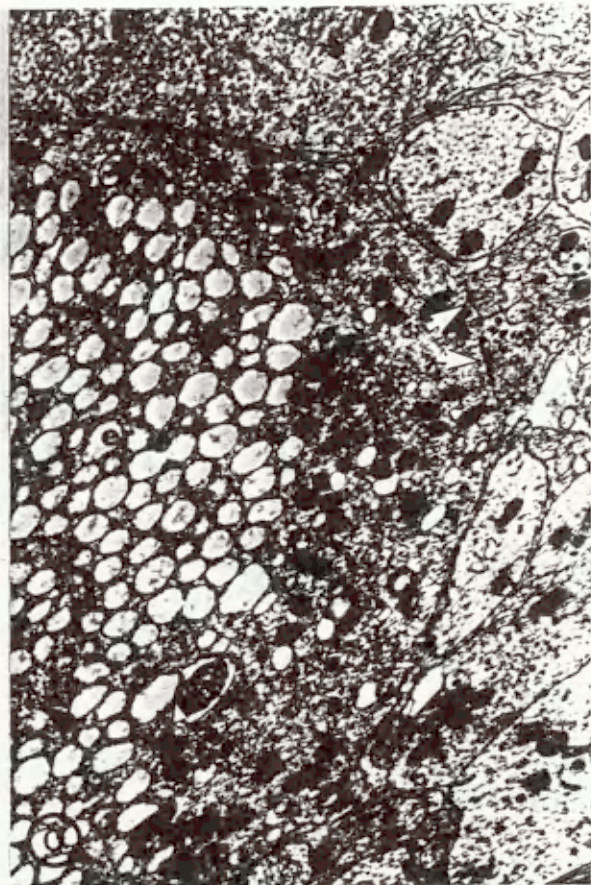
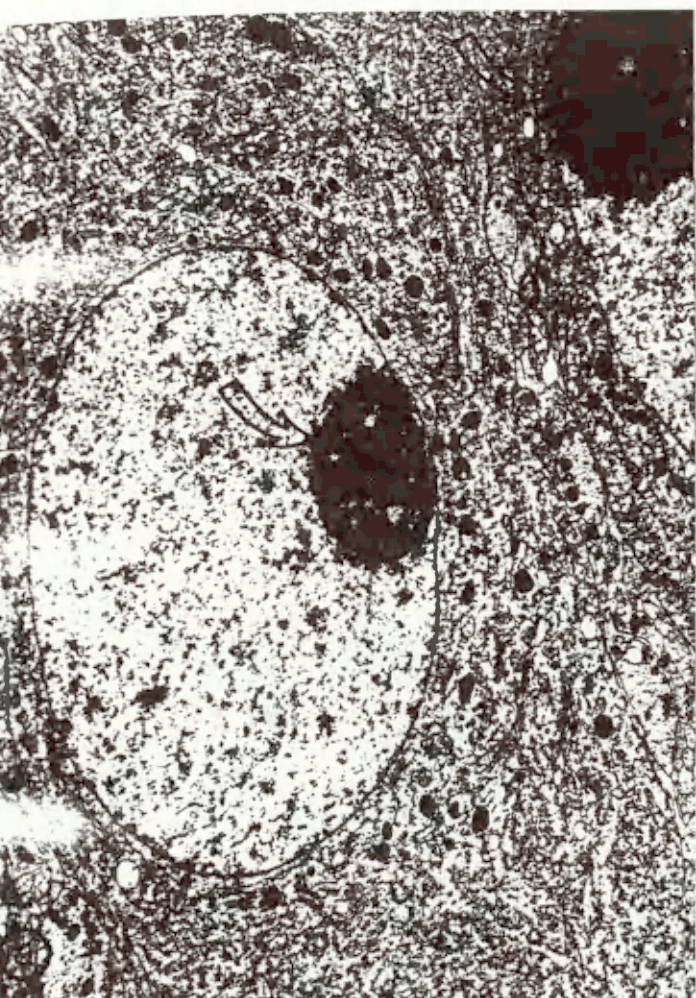
Ryc. 3(a-d). STZ-niediabetyczny szczur/badania konwen-
cjonalne; splot Auerbacha.

- a. Widoczne są profile aksonów zawierające zarówno małe pęcherzyki agranularne i duże granularne. Pow. 50 000 x.
- b. Profil aksonu z centralnego obszaru zwoju Auerbacha uwidacznia małe pęcherzyki agranularne. Pow. 47 000 x.
- c. Profil aksonu z peryferyjnego obszaru zwoju Auerbacha zawiera małe pęcherzyki agranularne; bl-błaszka podstawna. Pow. 36 000 x.
- d. Profil aksonu zawierający duże pęcherzyki granularne; bl-błaszka podstawna. Pow. 40 000 x.



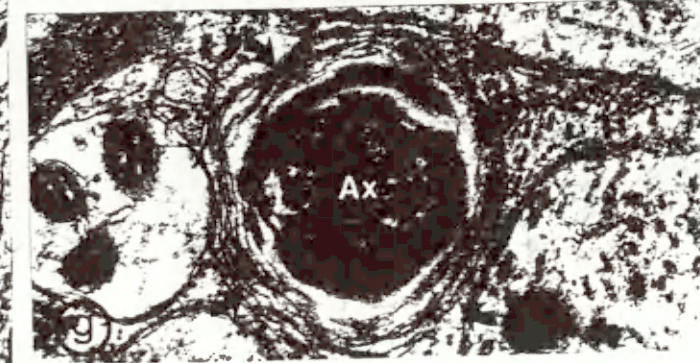
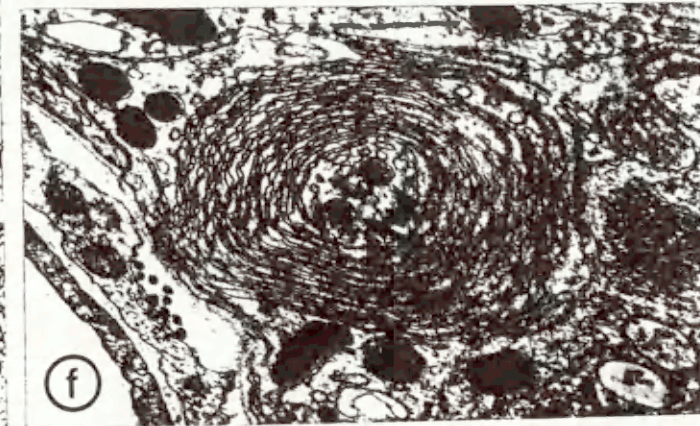
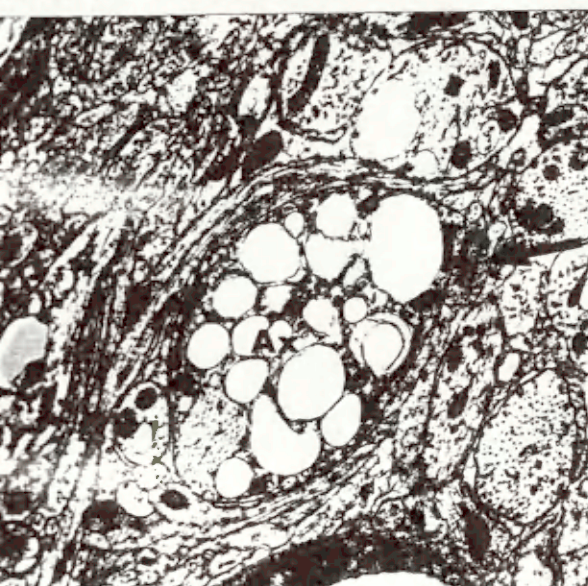
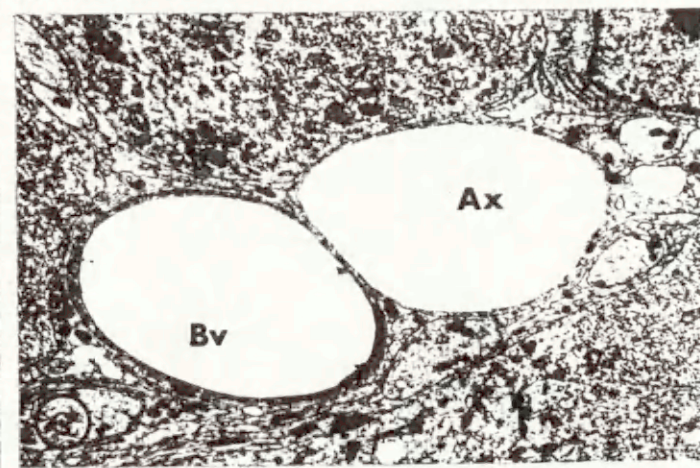
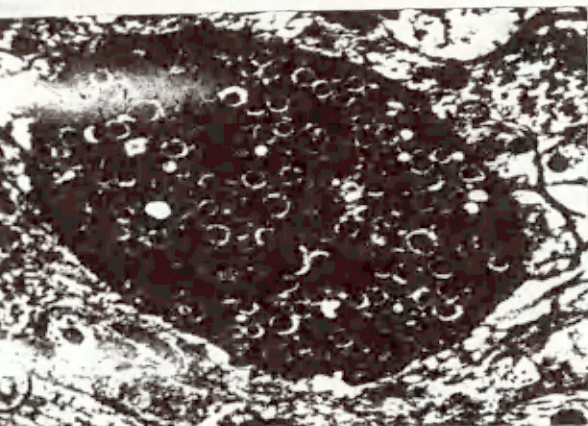
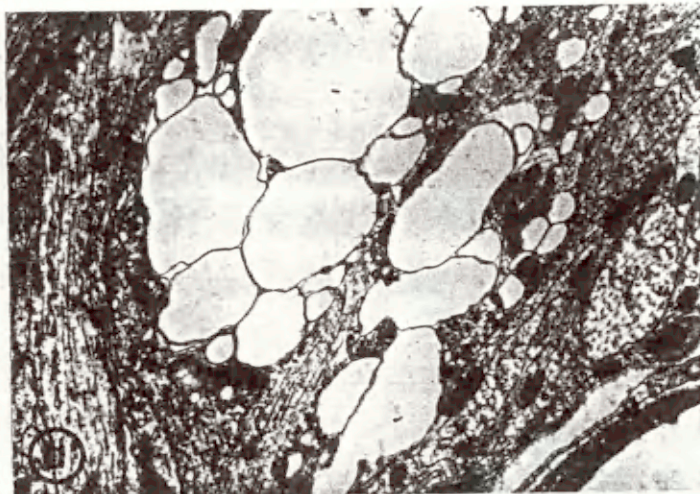
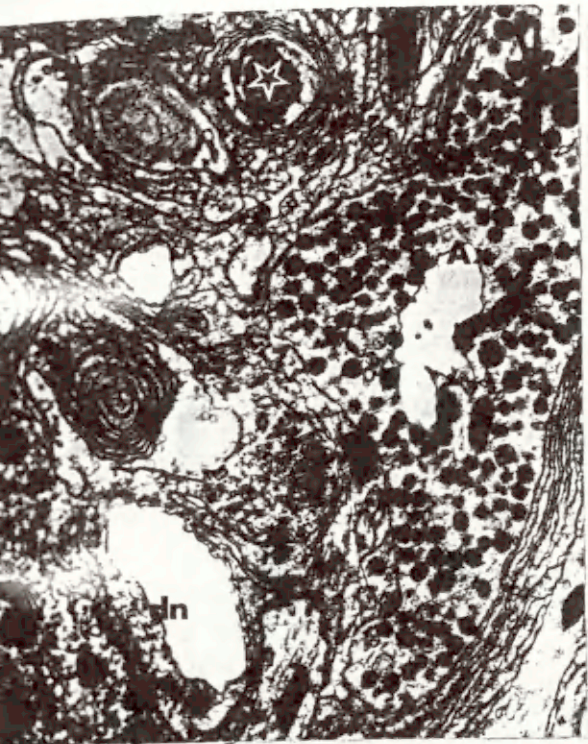
Ryc. 4(a-d). STZ-diabetyczny szczur/badania konwencjo-
nalne; jądro nadwzrokowe (SON) i jądro
przykomorowe (PVN).

- a. SON. Hipertroficzne perykariony z jąderkami leżącymi peryferyjnie (strzałki). Pow. 6 000 x.
- b. PVN. Hipertroficzny perykarion obfitujący w organelle cytoplazmatyczne w tym i lizosomy (ly). Pow. 5 000 x.
- c. SON. Fragment perykarionu uwidacznia konglomerat sferycznych pęcherzyków ziarnistej siateczki śródplazmatycznej (er) otoczony przez wąski pas cytoplazmy obfitującej w pozostałe organelle cytoplazmatyczne w tym i ziarnistości neurosekrecyjne. Na powierzchni perykarionu widoczne są dobrze zachowane asymetryczne synapsy akso-somatyczne (strzałki). Pow. 13 000 x.
- d. PVN. Fragment perykarionu uwidacznia ziarnistą siateczkę śródplazmatyczną (er) odznaczającą się obecnością gęstego materiału w obrębie jej cystern; widoczne są również wakuole autofagowe (va) i liczne polimorficzne ziarnistości neurosekrecyjne (nsg). Pow. 20 000 x.



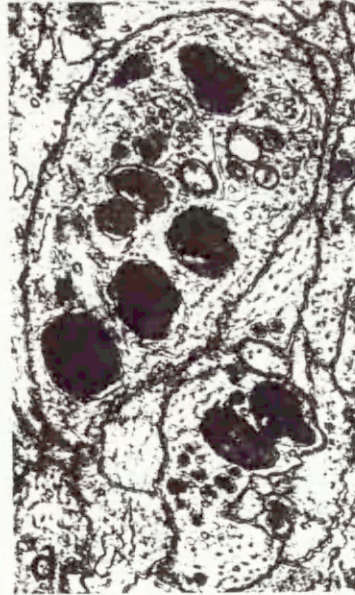
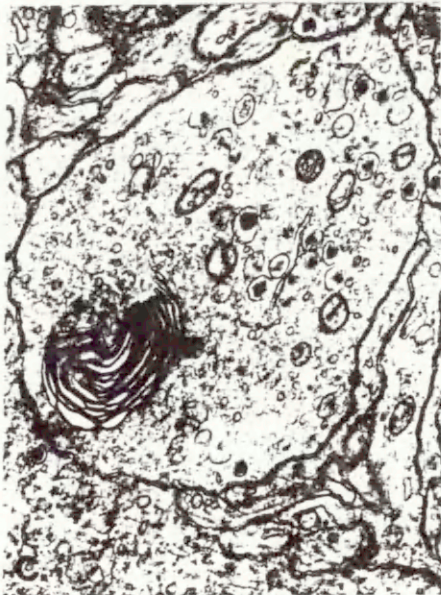
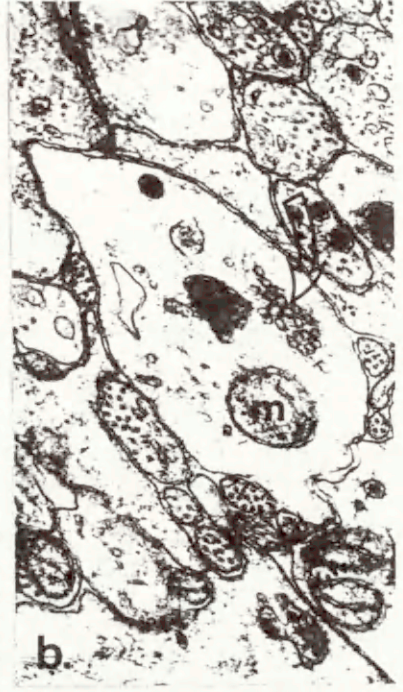
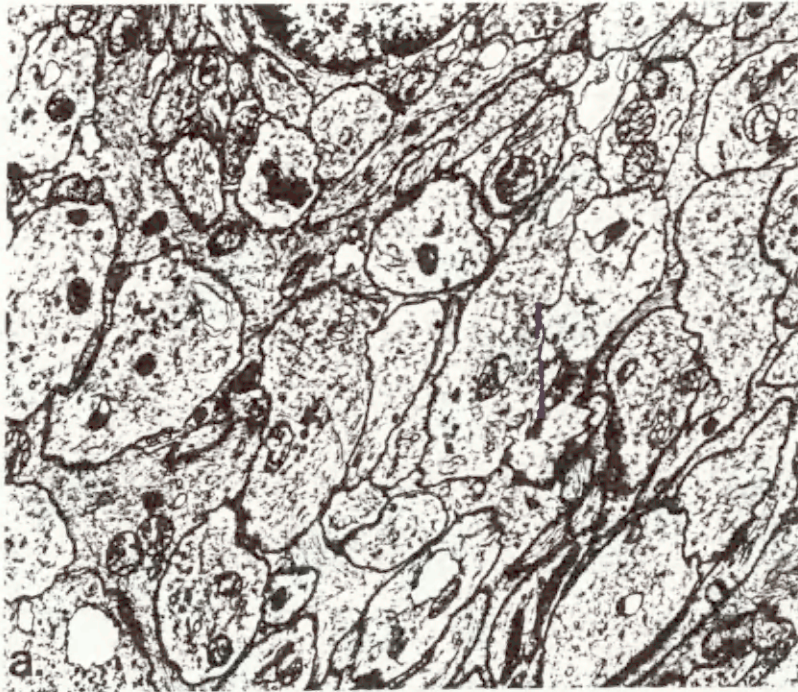
Ryc. 5(a-g). STZ-diabetyczny szczur/badania konwencjonalne; jądro nadwzrokowe (SON) i jądro przykomorowe (PVN).

- a. SON. W neuropilu widoczne są blaszkowate pierścienie (strzałki) w łączności z profilami aksonów; jeden z profili zawiera także w aksoplazmie amorficzne złogi (gwiazdka). W aksonie zawierającym ziarnistości neurosekrecyjne (Ax) i w dendrycie (dn) widoczne są wakuole. Pow. 8 000 x.
- b. PVN. W neuropilu widoczny jest intensywnie zabarwiony profil aksonu obfitujący w pleomorficzne ziarnistości neurosekrecyjne. Pow. 9 000 x.
- c. SON. W neuropilu widoczny jest profil aksonu (Ax) obfitujący w wakuole. Widoczna jest również dobrze zachowana synapsa akso-aksonalna (strzałka). Pow. 7 000 x.
- d. PVN. Dominacja dużych wakuol w skośnie przekrojonym profilu perykarionu. Pow. 7 000 x.
- e. SON. W neuropilu widoczny jest akson (Ax) ukazujący jedynie aksoplazmę; Bv-naczynie krwionośne (zidentyfikowane na podstawie obecności śródbłonna). Pow. 5 000 x.
- f. SON. W neuropilu widoczne są blaszkowate pierścienie zlokalizowane na obwodzie aksonu sekrecyjnego; dwie ziarnistości neurosekrecyjne są także widoczne w aksonie (strzałki). Pow. 28 000 x.
- g. PVN. W neuropilu widoczny jest profil aksonu (Ax) otoczony przez blaszkowate pierścienie (strzałki); w aksoplazmie widoczne są również złogi amorficznego materiału. Pow. 40 000 x.



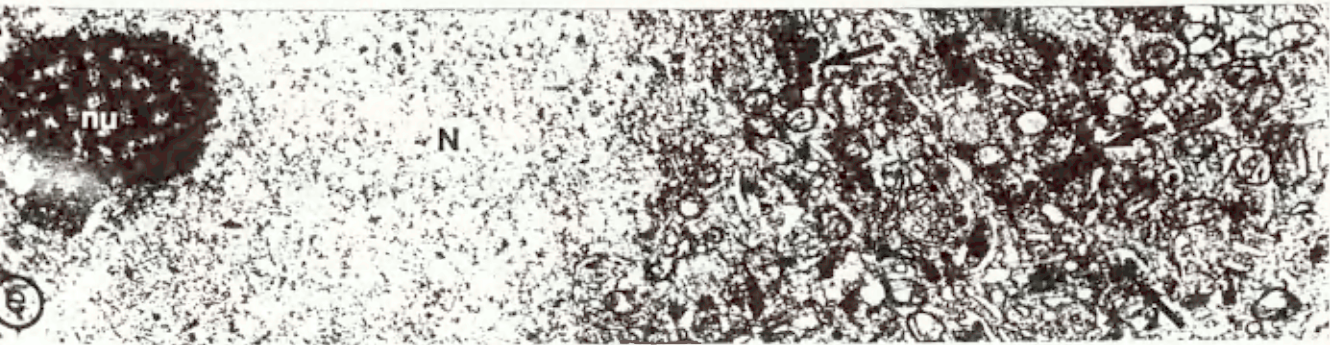
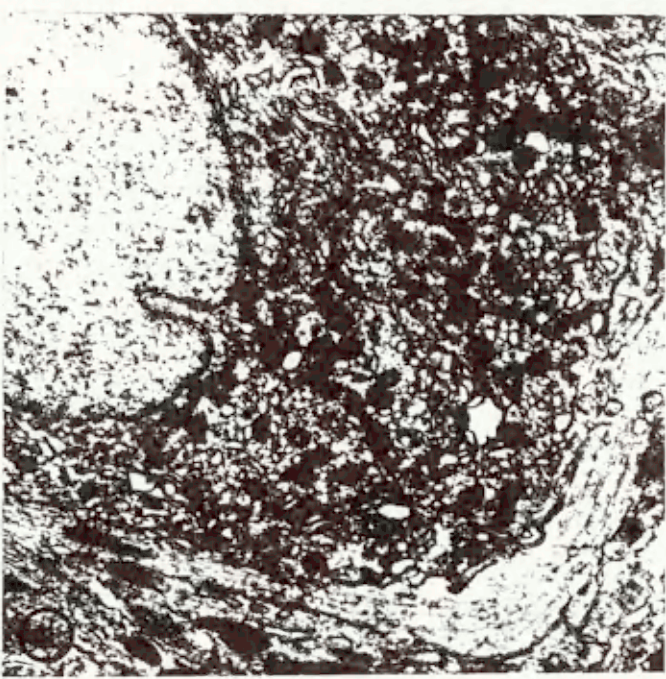
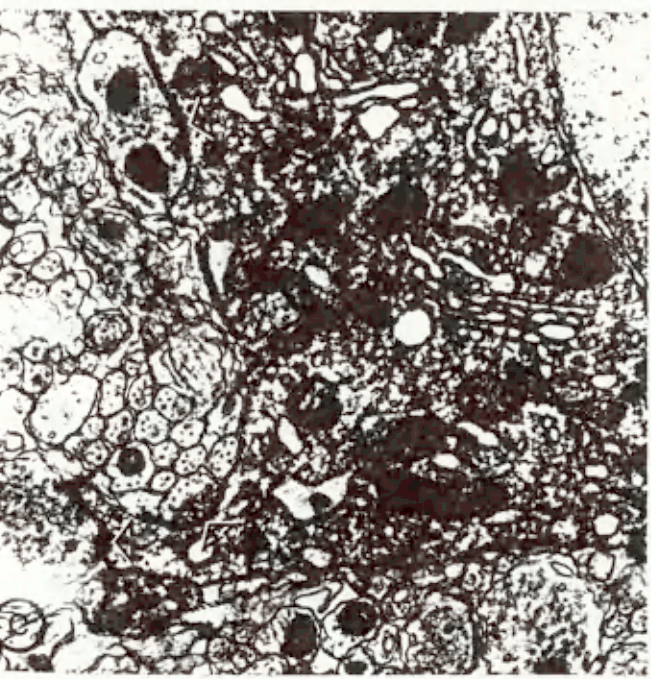
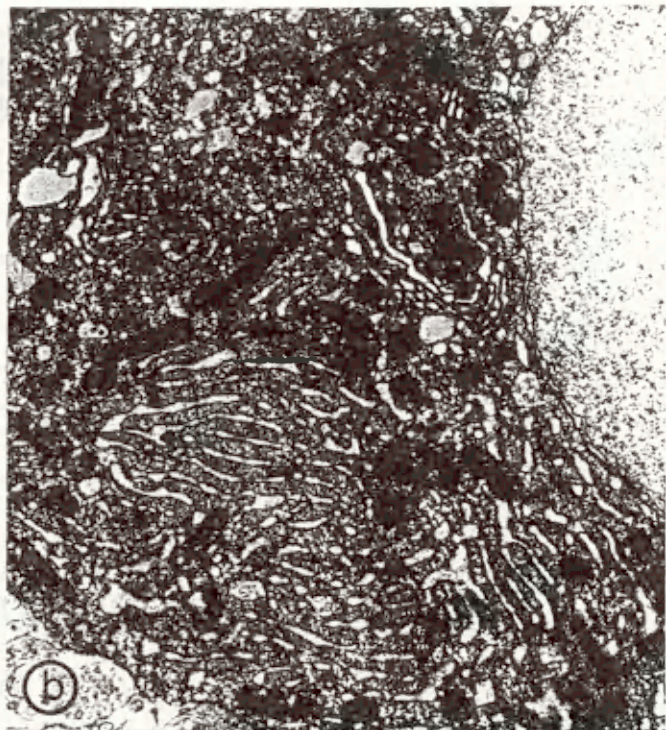
Ryc. 7(a-e). STZ-diabetyczny szczur/badania konwencjo-
nalne; splot Auerbacha.

- a. Fragment zwoju Auerbacha uwidacznia profile aksonów ubogie w pęcherzyki synaptyczne. Pow. 11 000 x.
- b. Akson z centralnego obszaru zwoju zawiera aglomerat masyk pęcherzyków agranularnych (strzałka); widoczne są również spęczniałe mitochondria (m). Pow. 28 000 x.
- c. Akson z centralnego obszaru zwoju zawiera figurę mieliniową i pleomorficzne pęcherzyki synaptyczne. Pow. 20 000 x.
- d. Peryferyjny obszar zwoju uwidacznia profile aksonów z wakuolami autofagowymi obejmującymi granularne pęcherzyki lub trudny do zidentyfikowania materiał. Pow. 13 000 x.
- e. Profil aksonu szczególnie obficie wypełniony dużymi pęcherzykami granularnymi; bl-błaszka podstawna. Pow. 48 000 x.



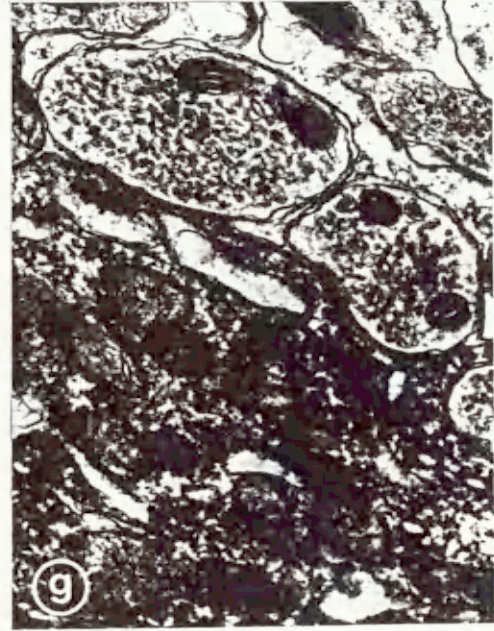
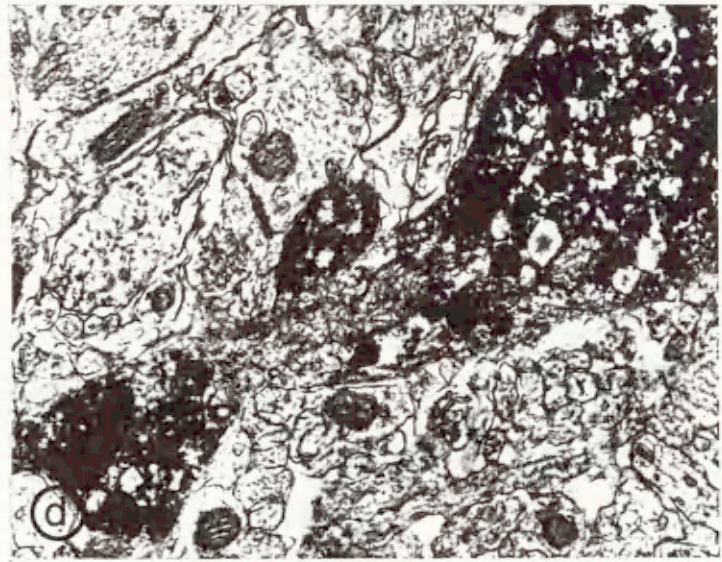
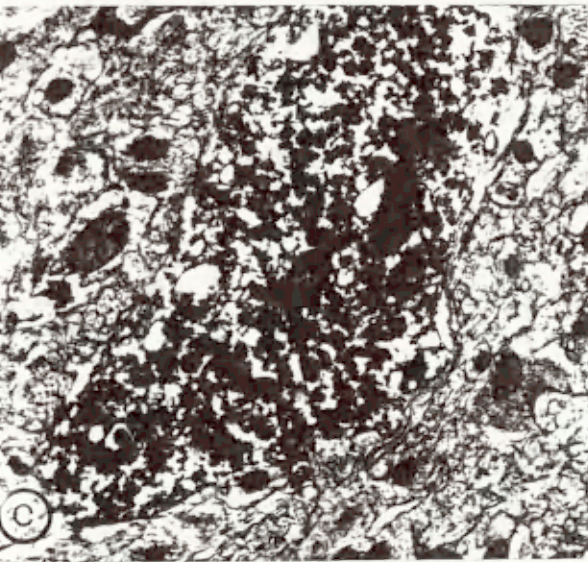
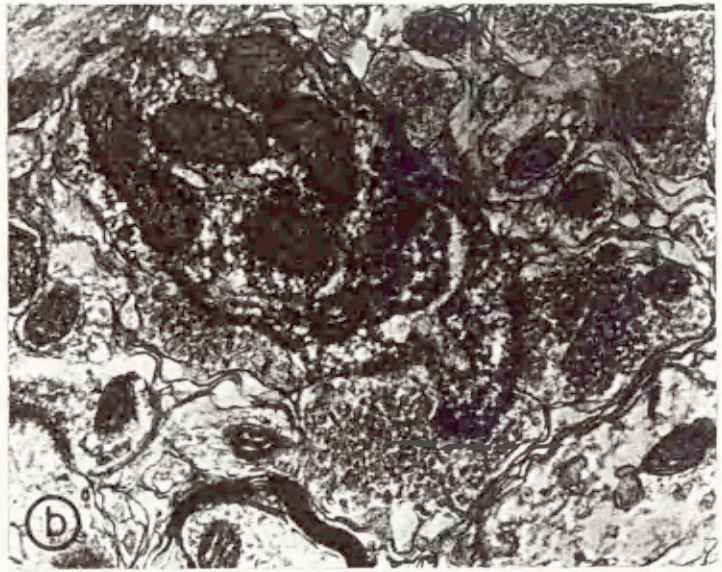
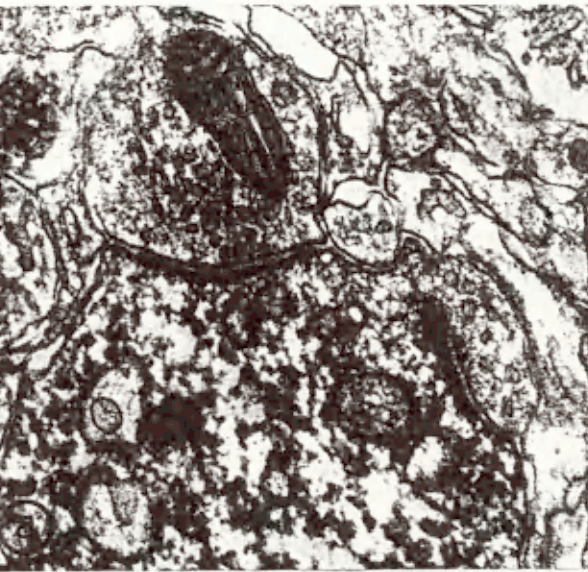
Ryc. 8(a-e). STZ-niediabetyczny szczur/badania immunocytochemiczne; jądro nadwzrokowe (SON) i jądro przykomorowe (PVN).

- a. PVN. Perykarion zawierający oksytocynę. Pow. 6 000 x.
- b. SON. Fragment perykarionu zawierającego oksytocynę. Pow. 9 000 x.
- c. PVN. Perykarion zawierający wazopresynę; widoczne są asymetryczne akso-somatyczne synapsy (strzałki) utworzone na wyznakowanym perykarionie. Pow. 12 000 x.
- d. SON. Perykarion zawierający wazopresynę. Pow. 7 000 x.
- e. SON. Fragment perykarionu zawierającego wazopresynę uwidacznia wyznakowane ziarnistości neurosekrecyjne (strzałki); N-jądro komórkowe, nu-jąderko. Pow. 10 000 x.



Ryc. 9(a-g). STZ-niediabetyczny szczur/badania immuno-
cytochemiczne; jądro nadwzrokowe (SON)
i jądro przykomorowe (PVN).

- a. SON. Na powierzchni wazopresyno-dodatniego dendrytu widoczne są asymetryczne synapsy. Immunoprecypitat znajduje się w łączności z ziarnistą siateczką śródplazmatyczną. Pow. 40 000 x.
- b. PVN. Oksytocyno-dodatni dendryt z asymetrycznymi synapsami. Immunoprecypitat związany jest z ergastoplazmą. Pow. 30 000 x.
- c. SON. Wazopresyno-dodatni profil aksonu zawiera liczne wyznakowane ziarnistości neurosekrecyjne. Pow. 10 000 x.
- d. PVN. Oksytocyno-dodatni profil aksonu obfitujący w wyznakowane ziarnistości neurosekrecyjne. Pow. 20 000 x.
- e. SON. Oksytocyno-dodatnia kolbka synaptyczna w asymetrycznym kontakcie z immuno-ujemnym profilem dendrytu (dn). Pow. 20 000 x.
- f. PVN. Asymetryczna synapsa na oksytocyno-dodatnim perykarionie. Pow. 40 000 x.
- g. SON. Zakończenia aksonów tworzące symetryczne synapsy z oksytocyno-dodatnim perykarionem. Pow. 35 000 x.



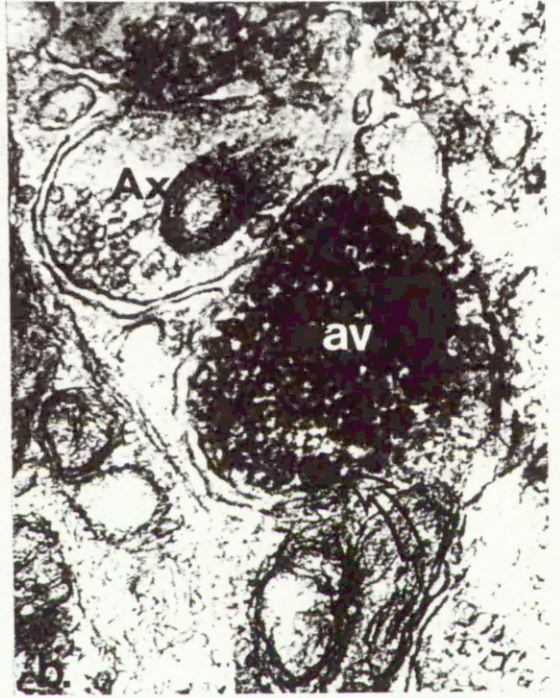
Ryc. 10(a-b). STZ-niediabetyczny szczur/badania immunocytochemiczne; przysadka nerwowa (NHP).

- a. Widoczne są wazopresyno-dodatnie (VP) i ujemne profile aksonów wypełnione ziarnistościami neurosekrecyjnymi; bm- błona podstawna. Pow. 23 000 x.
- b. Widoczne są oksytocyno-dodatnie (OT) i ujemne profile aksonów obfitujące w ziarnistości neurosekrecyjne; bm-błona podstawna. Pow. 27 000 x.



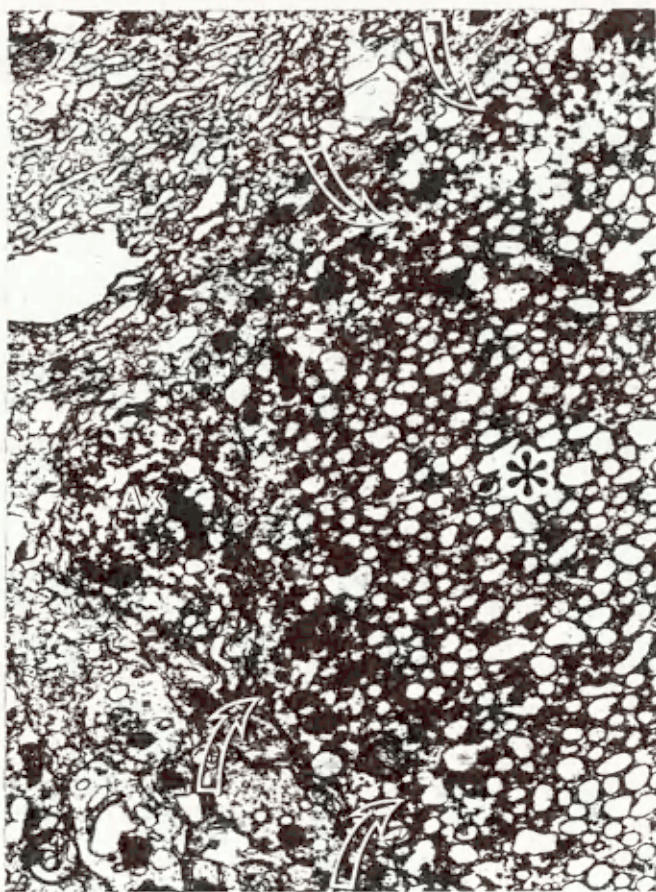
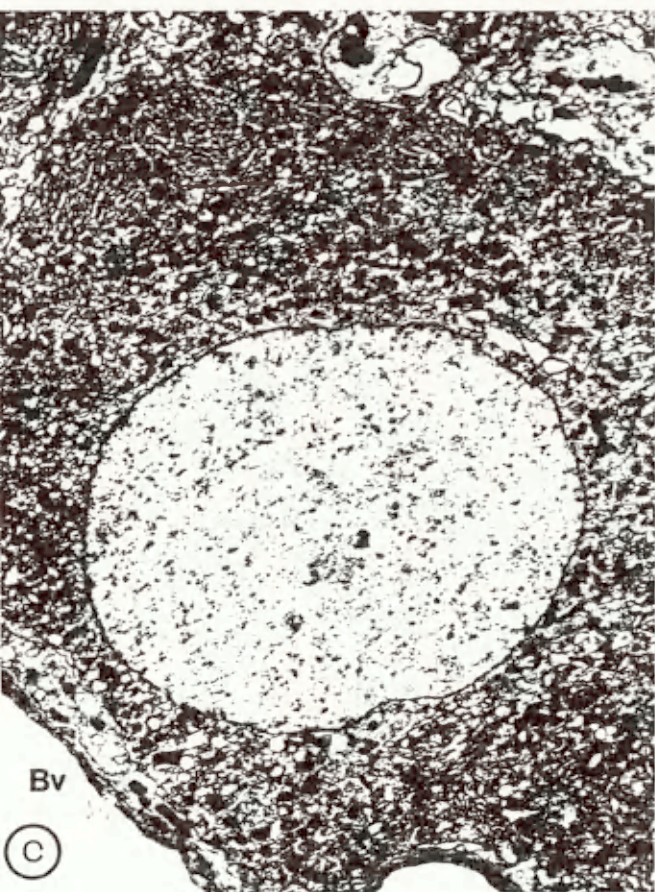
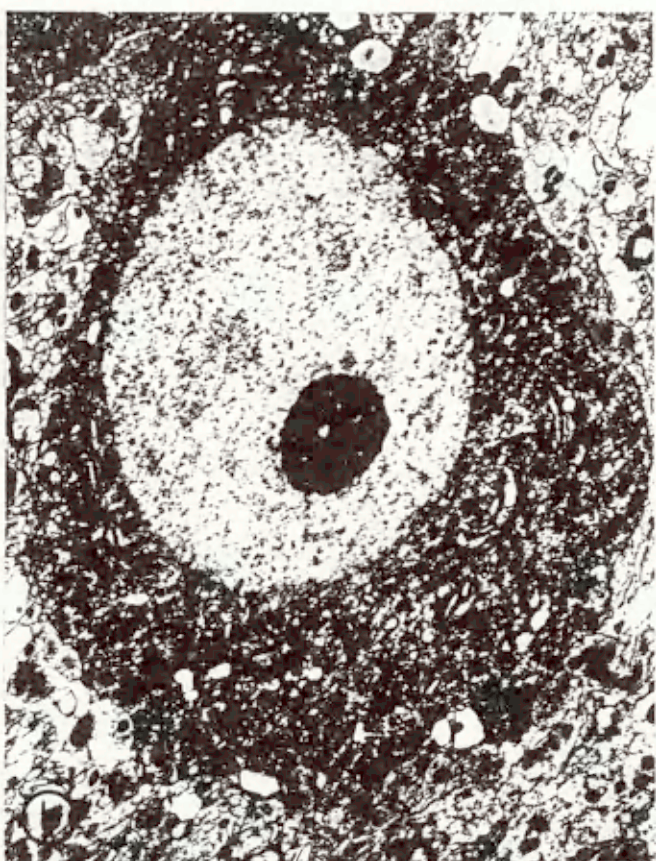
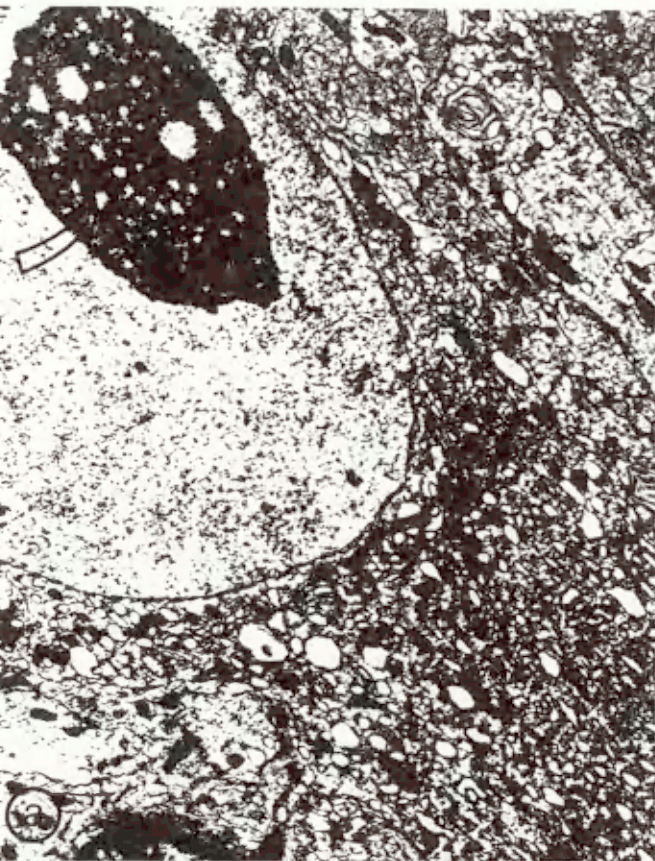
Ryc. 11(a-b). STZ-niediabetyczny szczur/badania immuno-
cytochemiczne: splot Auerbacha.

- a. Fragment zwoju Auerbacha uwidacznia ciemno zabarwione profile aksonów zawierające wazoaktywny polipeptyd jelitowy; bl-błaszka podstawna. Pow. 40 000 x.
- b. Fragment centralnego obszaru zwoju uwidacznia profil aksonu zawierający wyznakowane na wazoaktywny polipeptyd jelitowy małe pęcherzyki agranularne (av); widoczny jest również jeden duży pęcherzyk granularny (strzałka). Ax-immuno-ujemny profil aksonu. Pow. 47 000 x.



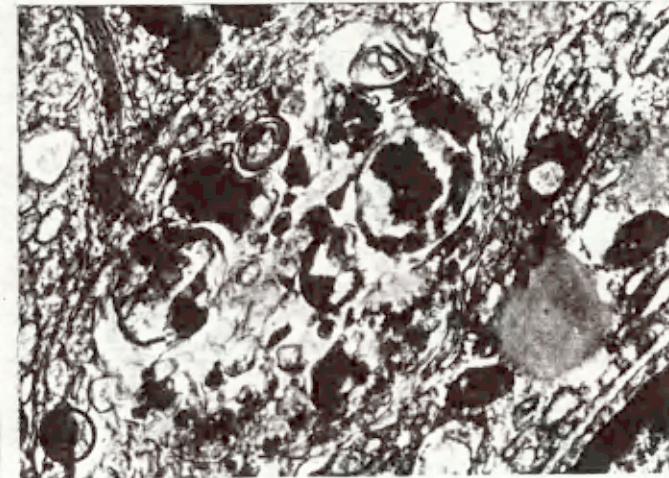
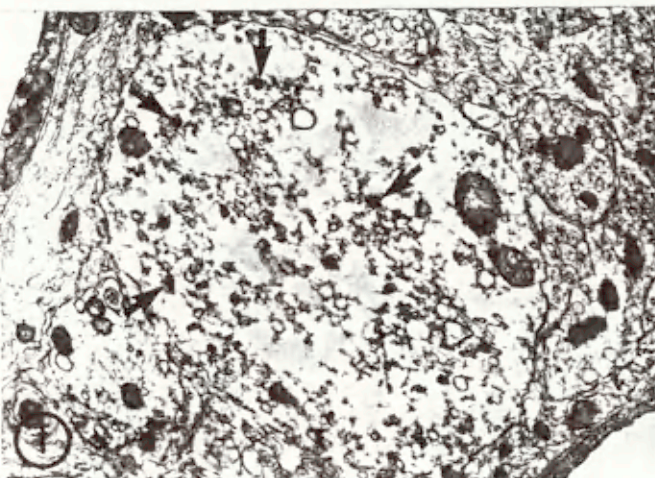
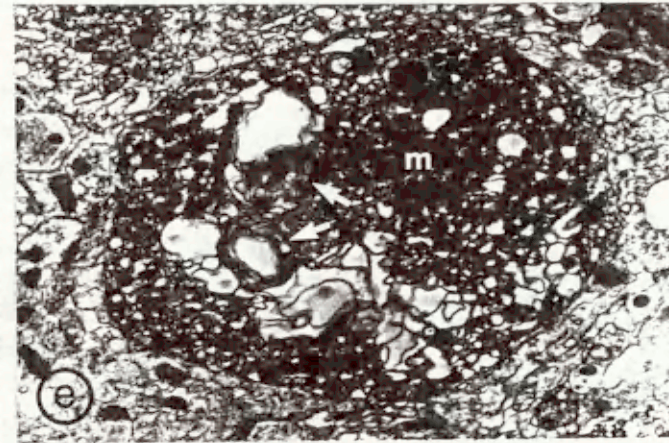
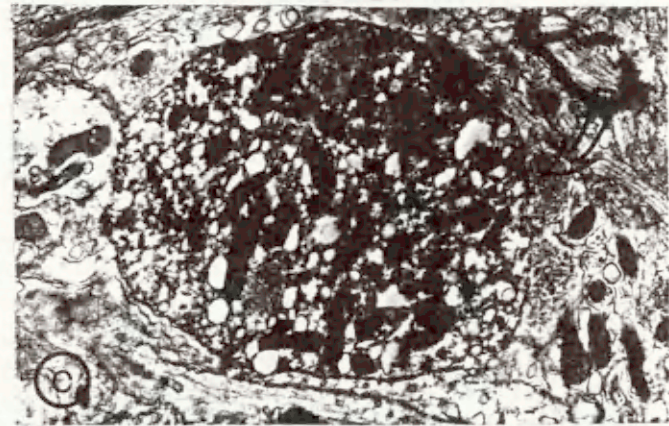
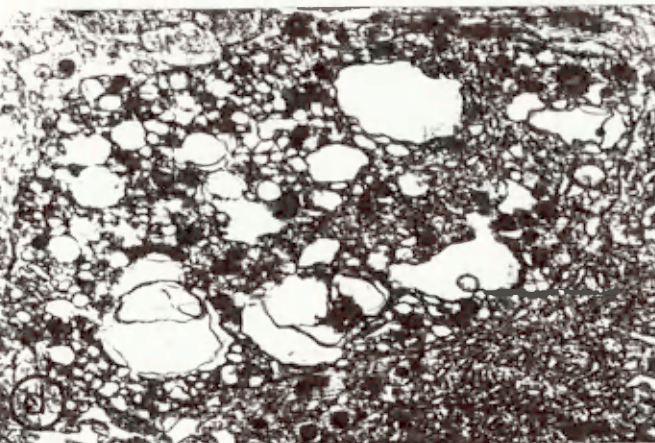
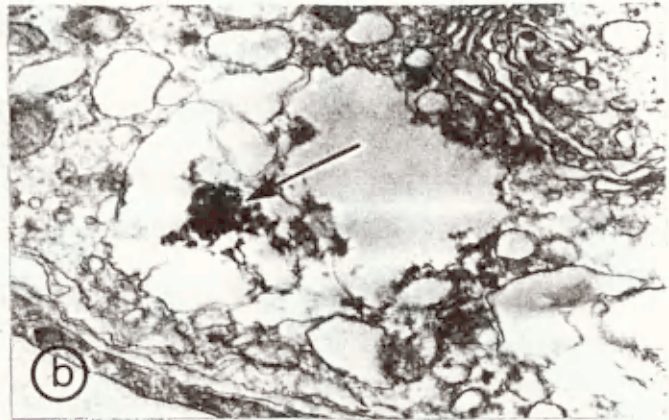
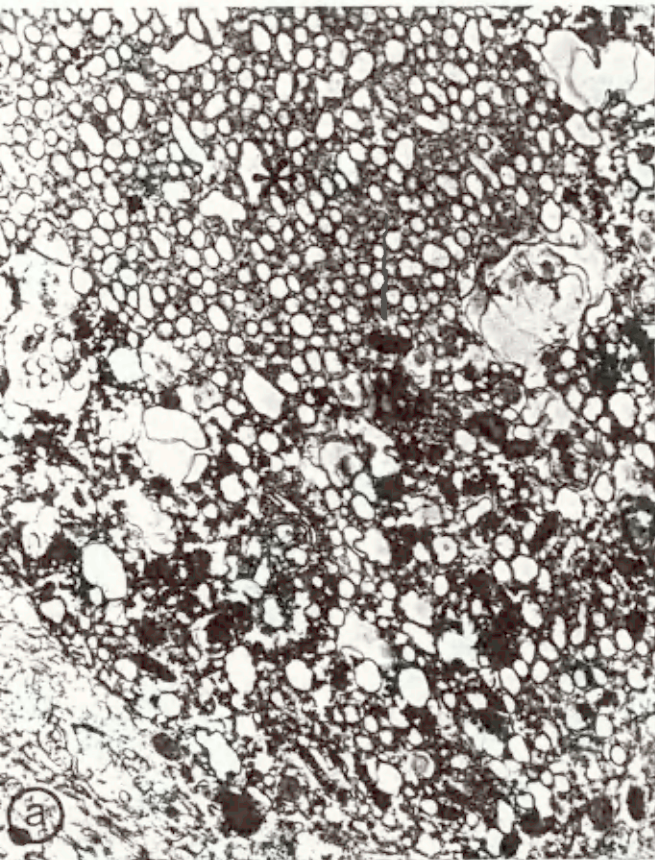
Ryc. 12(a-d). STZ-diabetyczny szczur/badania immunocytochemiczne; jądro nadwzrokowe (SON) i jądro przykomorowe (PVN).

- a. SON. Wazopresyno-dodatni hipertroficzny perykarion z dużym jądrem (strzałka). Pow. 6 000 x.
- b. PVN. Oksytocyno-dodatni hipertroficzny perykarion z dużym owalnym jądrem i bogatą w organelle cytoplazmą. Pow. 4 000 x.
- c. SON. Oksytocyno-dodatni hipertroficzny perykarion uwidacznia sferycznego kształtu jądro i obfitą cytoplazmę; Bv-naczynie krwionośne. Pow. 5 000 x.
- d. SON. Fragment wazopresyno-dodatniego perykarionu uwidacznia peryferyjne rozproszenie immunoprecypitatu (strzałki); gwiazdka wskazuje aglomerat immuno-ujemnych sferycznych cystern ziarnistej siateczki śródplazmatycznej. Ax-immuno-dodatni profil aksonu. Pow. 14 000 x.



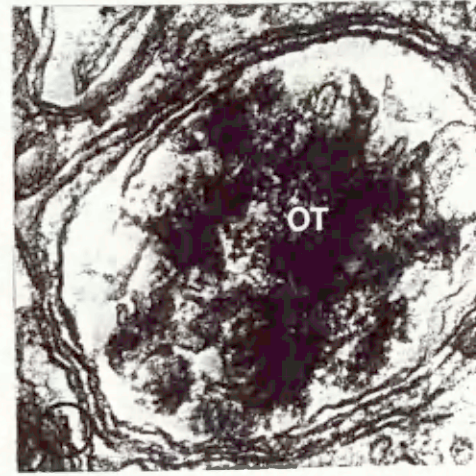
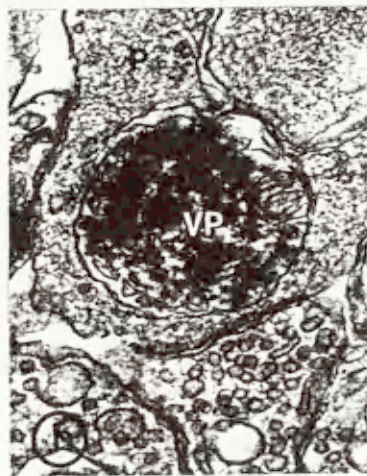
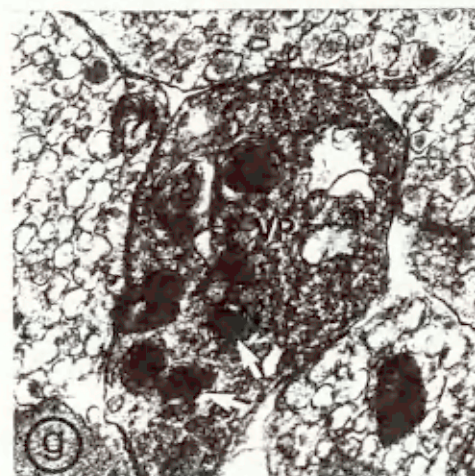
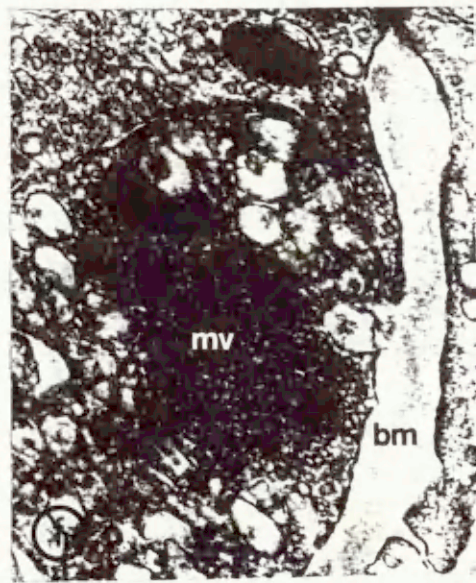
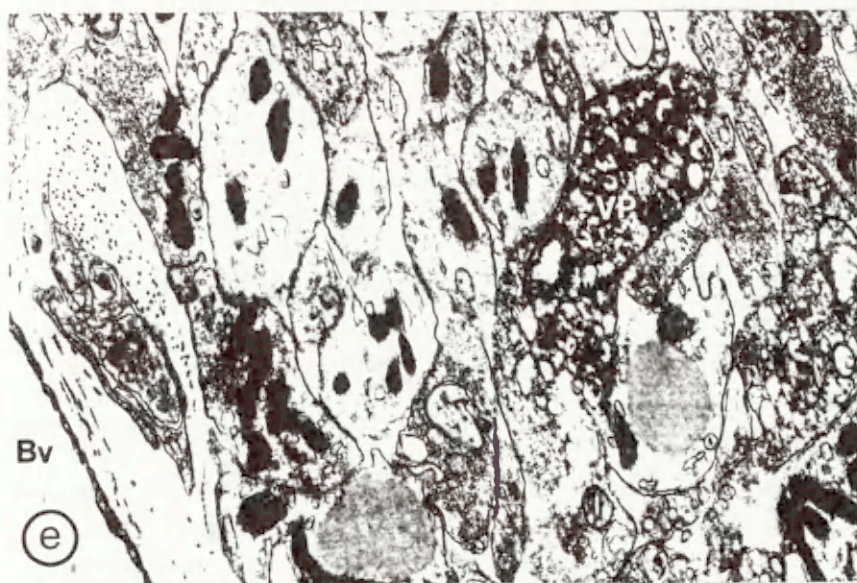
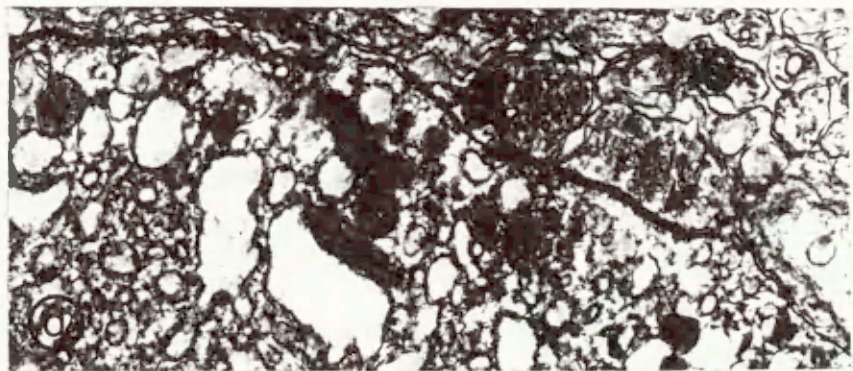
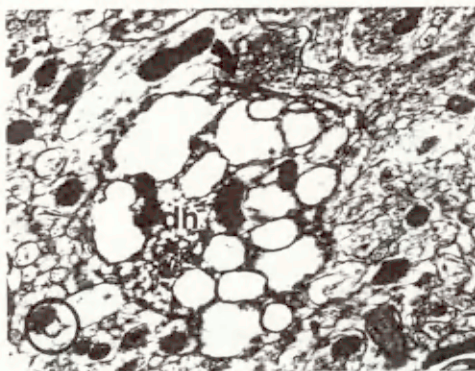
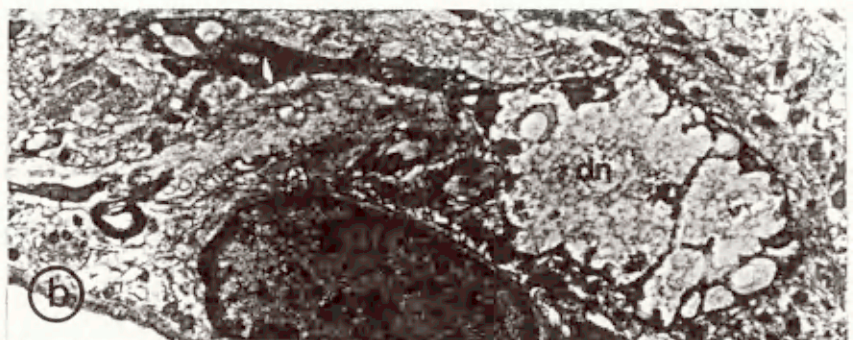
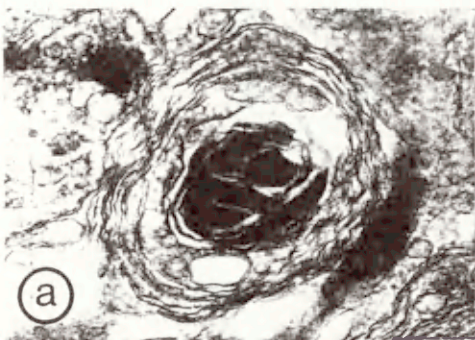
Ryc. 13(a-g). STZ-diabetyczny szczur/badania immunocytochemiczne; jądro nadwzrokowe (SON) i jądro przykomorowe (PVN).

- a. PVN. Fragment wazopresyno-dodatniego hipertroficznego perykarionu uwidacznia peryferyjnie rozproszony immunoprecypitat pomiędzy/lub w łączności z/ licznymi wakuolami, lizosomami i pozostałymi organelami cytoplazmatycznymi; centralnie usytuowany w perykarionie aglomerat immuno-ujemnych cystern ziarnistej siateczki śródplazmatycznej (gwiazdka) otoczony jest immuno-dodatnią peryferyjną cytoplazmą. Pow. 13 000 x.
- b. SON. Fragment peryferyjnej cytoplazmy perykarionu zawierającego oksytocynę uwidacznia dużą wakuolę z immuno-dodatnim materiałem resztkowym (strzałka). Pow. 40 000 x.
- c. PVN. Wazopresyno-dodatni profil aksonu wypełniony jest wyszkiełkowanymi i niewyszkiełkowanymi ziarnistościami neurosekrecyjnymi, mitochondriami i wakuolami autofagowymi; na powierzchni tego aksonu widoczne jest dobrze zachowane zakończenie synaptyczne (strzałka). Pow. 14 000 x.
- d. SON. Reaktywna postać wazopresyno-dodatniego aksonu uwidacznia liczne wakuole. Pow. 13 000 x.
- e. SON. Reaktywna postać oksytocyno-dodatniego aksonu uwidacznia liczne ciała blaszkowate (strzałki) i mitochondria (m). Pow. 13 000 x.
- f. PVN. Profil aksonu ubogi w organelle uwidacznia kilka wazopresyno-dodatnich pęcherzyków (strzałki). Pow. 14 000 x.
- g. SON. Profil aksonu uwidacznia wazopresyno-dodatnie wakuole autofagowe. Pow. 20 000 x.



Ryc. 14(a-i). BTZ-diabetyczny szczur/badania immunocytochemiczne; jądro nadwzrokowe (SON), jądro przykomorowe (PVN) i przysadka nerwowa (NHP).

- a. PVN. W aksonie otoczonym przez blaszkowate pierścienie widoczny jest wazopresyno-dodatni materiał. Pow. 27 000 x.
- b. PVN. W wyzłokowanym na oksytocynę dendrycie (dn) widoczne są wybitnie poszerzone/zwakuolizowane/cysterny ziarnistej siateczki śródplazmatycznej. Pow. 4 000 x.
- c. PVN. W oksytocyno-dodatnim dendrycie (dn) widoczne są liczne poszerzone cysterny ziarnistej siateczki śródplazmatycznej. Widoczne jest również dobrze zachowane zakończenie synaptyczne (strzałka) na powierzchni dendrytu. Pow. 5 000 x.
- d. SON. Dobrze zachowane kolbki synaptyczne (strzałki) kontaktujące się asymetrycznie z wazopresyno-dodatnim perykarionem. Pow. 30 000 x.
- e. NHP. Pośród wielu profili aksonów tylko jeden z nich (VP) wykazuje dodatnią reakcję na wazopresynę; w obrębie tego profilu widoczne są ziarnistości neurosekrecyjne. Bv-naczynie krwionośne. Pow. 20 000 x.
- f. NHP. Zakończenie aksonu oksytocyno-ergicznego zawiera ziarnistości neurosekrecyjne i duże grono mikropęcherzyków (mv); bm-błona podstawna. Pow. 40 000 x.
- g. NHP. W obrębie wazopresyno-dodatniego aksonu (VP) widoczne są immunoreaktywne wakuole autofagowe (strzałki). Pow. 22 000 x.
- h. NHP. Profil aksonu zatopiony w wypustce pituicyta (P) uwidacznia pozapęcherzykowy wazopresyno-dodatni materiał (VP). Pow. 40 000 x.
- i. NHP. Profil aksonu otoczony blaszkowatymi pierścieniami uwidacznia w aksoplazmie obecność oksytocyno-dodatniego materiału (OT). Pow. 45 000 x.



Ryc. 15(a-f). STZ-diabetyczny szczur/badania immunocytochemiczne; splot Auerbacha.

- a. Akson zawierający wazoaktywny polipeptyd jelitowy uwidacznia wyznakowane liczne małe pęcherzyki agranularne; widoczne są również wakuole; bl-błaszka podstawna. Pow. 18 000 x.
- b. Wyznakowane profile aksonów z centralnego obszaru zwoju uwidaczniają immunoprecypitat pomimo braku komponentu pęcherzykowego. We fragmencie immun-ujemnego aksonu (Ax) widoczne są agranularne pęcherzyki synaptyczne. Pow. 48 000 x.
- c. Profil aksonu umiejscowiony na peryferii zwoju zawiera liczne duże pęcherzyki granularne wykazujące dodatnią reakcję na wazoaktywny polipeptyd jelitowy. Pow. 50 000 x.
- d. Peryferyjnie leżący w zwoju Auerbacha profil aksonu uwidacznia wyznakowane pleomorficzne pęcherzyki i wakuole autofagowe zawierające ziarnisty materiał (av); m-mitochondrium. Pow. 50 000 x.
- e. Profil aksonu z centralnego obszaru zwoju zawiera immuno-dodatnie pęcherzyki pleomorficzne i wakuole autofagowe (va). Pow. 45 000 x.
- f. Wyznakowany na zawartość wazoaktywnego polipeptydu jelitowego profil aksonu obfituje w immunoprecypitat pozostający w łączności ze strukturami trudnymi do identyfikacji; bl-błaszka podstawna. Pow. 58 000 x.

