

Zmiany morfologii astrocytów w istocie szarej środkowej i jądrze łukowatym w cyklu rujowym szczura

JADWIGA JAWORSKA-ADAMU, REGINA CYBULSKA, MAŁGORZATA KALINOWSKA

Zakład Histologii i Embriologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

Jaworska-Adamu J., Cybulska R., Kalinowska M.

Changes of the morphology of astrocytes in periaqueductal gray matter and arcuate nucleus during the estrous cycle in rats

Summary

The effect of steroid gonadal hormones on astrocytes and neurons of the hypothalamus directly involved in sexual behavior as well as the release of gonadotrophins in the estrous cycle are well known. This study was undertaken because only few publications exist dealing with the reaction of these hormones on the structures of extrahypothalamic areas. The changes in immunoreactivity of glial fibrillary acidic protein (GFAP), an astrocyte marker, as well as changes of astrocyte processes of arcuate nucleus and periaqueductal gray matter in the estrous cycle of 100-day-old rats were examined. As the effect of sex hormones on the structures of arcuate nucleus is well studied, this area has been taken as the pattern. It has been demonstrated that in proestrus and estrus immunoreactivity to GFAP of astrocytes increase significantly and astrocyte processes which transitionally separate axonal inputs to neuron bodies become elongated in both studied areas. In the metestrus and diestrus of mature rats, astrocyte bodies and processes revealed lower immunoreactivity to GFAP, which was accompanied by an increase of the number of axosomatic synapses. The study revealed that astrocytes of not only hypothalamus arcuate nucleus but also those of periaqueductal gray matter undergo natural and reversible changes in the estrous cycle of rats, leading to transitional separation of synapses.

Keywords: astrocytes, GFAP, estrous cycle, rat

Astrocyty, jako jeden z rodzajów komórek glejowych ośrodkowego układu nerwowego (OUN) ssaków, są niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania neuronów, zapewniając im odpowiednie mikrośrodowisko (29). Poznano ich funkcje podporową i troficzną, włączenie w metabolizm niektórych neurotransmiterów (9, 18, 26), regulację pozakomórkowego stężenia jonów (37), wytwarzanie i uwalnianie czynników neurotroficznych (6, 32, 45) oraz zdolność fagocytarną (7), a także funkcję immunoregulatorową (33) i funkcję naprawczą (22).

Autoradiograficznie wykazano, że znakowany estradiol jest gromadzony w dużej ilości szczególnie w jądrach podwzgórza i istocie szarej środkowej, zaś w innych obszarach OUN, np. w prążkowiu i korze mózgu, przedstawiono niski stopień jego wychwytu (35). W obszarach odpowiedzialnych za kontrolę mechanizmów neuroendokrynowych, tj. w jądrach podwzgórza, a także w hipokampie wykazano immunocytochemicznie obecność receptorów estrogenowych w astrocytach. Steroidowe hormony gonadalne oddziałują, być może, bezpośrednio na te komórki glejowe przez aktywację receptorów estrogenowych lub androgenowych bądź też pośrednio aktywując pierwotnie neurony (19-21, 24, 40). Estradiol wywiera istotny wpływ na przyspieszenie różnicowania i zwiększenie ekspresji włóknikowego kwasnego glejowego białka GFAP (glial fibrillary acidic protein) markera astrocytów, bez równoczesnej prolifera-

cji tych komórek (12, 16). Astrocyty u dojrzałych płciowo samic w jądrach podwzgórza: jądrze łukowatym i nadwzrostkowym oraz w zakręcie zębatym hipokampu ulegają naturalnym i odwracalnym zmianom podczas cyklu rujowego, prowadząc do plastyczności synaps (13, 14, 28, 30, 44). Wpływ hormonów gonadalnych w cyklu rujowym na obszary pozapodwzgórzowe nie jest dobrze poznany. W istocie szarej środkowej śródmózgowia wykazano wysoki stopień wychwytu estradiolu (35) oraz obecność receptorów estrogenowych w neuronach tego obszaru. Sądzi się, że wysoki poziom wychwytu estrogenów odgrywa ważną rolę w uwalnianiu gonadotropin i zachowaniu płciowym zwierząt (14, 23). Nie poznano wpływu hormonów gonadalnych na astrocyty istoty szarej środkowej, dlatego celem niniejszych badań było prześledzenie zachowania się tych komórek glejowych w cyklu rujowym szczura.

Materiał i metody

Do badań użyto 40 sztuk 100-dniowych samic szczurów Wistar. Przed pobraniem materiału do badań od samic, które wykazywały co najmniej trzy kolejne 4-dniowe cykle rujowe, wykonano rozmazy z pochwy, w celu ustalenia faz cyklu: *proestrus*, *estrus*, *metestrus*, *diestrus*. Materiał do badań w mikroskopie świetlnym pobrano od 20 samic (po 5 zwierząt w każdej fazie) i podobnie od 20 samic do badań w mikroskopie elektronowym. Dodatkowo w fazie *estrus* pobrano jajo-

wody w celu wykazania w nich obecności komórek jajowych. Zwierzęta znieczulano 5% ketaminą i dekapitowano. Do badań pobrano istotę szarą środkową śródmózgowia i jądro łukowate podwzgórza. Materiał utrwalono w świeżej buforowanej 10% formalinie pH = 7,0 przez 12 godzin, w temperaturze 281 K. Wykonano z niego parafinowe skrawki o grubości 6 μm , odparafinowano je w ksylenie ($3 \times 15 \text{ min.}$) i nawodniono, po czym inkubowano w 0,4% H_2O_2 w buforze fosforanowym, w temperaturze pokojowej przez 30 min. w celu zahamowania aktywności endogennej peroksydazy. Następnie skrawki płukano w świeżym buforze trisowym (TBS – Tris Buffered Saline) pH = 7,6 ($2 \times 15 \text{ min.}$). Skrawki traktowano normalną surowicą końską (Biowet Puławy 1 : 20) w temperaturze pokojowej przez 20 min. w celu usunięcia podbarwienia tła.

Immunocytochemiczna reakcja na GFAP astrocytów.

Immunocytochemiczne wykrywanie markera astrocytów, glicynowego włóknikowego kwaśnego białka (GFAP), przeprowadzono metodą Sternbergera (38). Do immunobarwienia użyto przeciwciał i odczynników rozcieńczonych w buforze – 0,5 M TBS pH = 7,6. Skrawki inkubowano z pierwszym specyficznym monoklonalnym przeciwciałem króliczym anti-GFAP (Sigma 1 : 400) przez 16 godzin w temperaturze 4°C . Drugim przeciwciałem było monoklonalne mysie przeciw króliczym IgG (Sigma 1 : 50) – przez godzinę w temperaturze pokojowej. Następnie dokonano inkubacji z kompleksem peroksydaza-antyperoksydaza (PAP) rozwiniętym na króliku (Sigma 1 : 200) przez godzinę w temperaturze pokojowej. Po płukaniu w buforze ($3 \times 15 \text{ min.}$) jako chromogenu użyto DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, Aldrich) w temperaturze pokojowej przez 30 min. Otrzymano końcowy, nierozpuszczalny produkt reakcji o różnej intensywności brązowego zabarwienia. Następnie skrawki płukano, odwadniano, prześwietlano i zamykano w DPX (Fluka). Kontrolę specyficzności reakcji wykonano, omijając pierwsze przeciwciało dla antygeny lub zastępowano je normalną surowicą końską. Immunopoztywne na GFAP astrocyty oglądano i fotografowano w mikroskopie optycznym Axiolab (Zeiss).

Badania w mikroskopie elektronowym.

Zwierzętom w narkozie podano do lewej komory serca najpierw 50 cm^3 0,9% NaCl, a następnie 250 cm^3 1% glutaraldehydu i 1% paraformaldehydu w 0,1 M buforze fosforanowym w temperaturze pokojowej (36). Pobrano te same obszary mózgu,

jak do analiz w mikroskopie świetlnym, które utrwalono w roztworze o takim samym składzie, jak roztwór perfuzyjny. Błoczki tkankowe płukano w 0,1 M buforze fosforanowym i dotrwalało w 2% OsO_4 . Następnie odwadniano i dobarwiano w octanie uranylu i cytrynianie ołowiu. Błoczki zatopione w żywicy skrawano na ultracienkie skrawki, które oglądano i fotografowano w mikroskopie elektronowym Tesla BS 500.

Wyniki i omówienie

Immunoreaktywność na GFAP astrocytów w cyklu rujowym szczura. W obu badanych obszarach obserwowano astrocyty immunoreaktywne na GFAP, wyrażające typową gwiaździstą morfologię z licznymi wypustkami cytoplazmatycznymi odchodzącymi od ciała komórkowego. W *proestrus* w istocie szarej środkowej astrocyty były intensywnie immunoreaktywne na GFAP, z licznymi długimi wypustkami, podobne do tych w jądrze łukowatym. W *estrus* zarówno w istocie szarej środkowej, jak i w jądrze łukowatym astrocyty charakteryzowały się podobną, najintensywniejszą na GFAP immunoreaktywnością ciał i wypustek w porównaniu z innymi fazami cyklu (ryc. 1, 2). W *metestrus* astrocyty istoty szarej środkowej i jądra łukowatego były słabiej immunoreaktywne na GFAP z mniejszą ilością wypustek niż w fazie *estrus*. W *diestrus* w obu badanych obszarach ciała i wypustki astrocytów były podobnie słabo immunoreaktywne na GFAP w porównaniu z innymi fazami cyklu (ryc. 3, 4).

Obserwacje ultrastrukturalne. Uzyskane wyniki badań w cyklu rujowym 100-dniowej samicy szczura



Ryc. 1. *Estrus* – immunoreaktywność na GFAP astrocytów istoty szarej środkowej (pow. ok. $450\times$)



Ryc. 2. *Estrus* – immunoreaktywność na GFAP astrocytów jądra łukowatego (pow. ok. $450\times$)



Ryc. 3. *Diestrus* – immunoreaktywność na GFAP astrocytów istoty szarej środkowej (pow. ok. $450\times$)

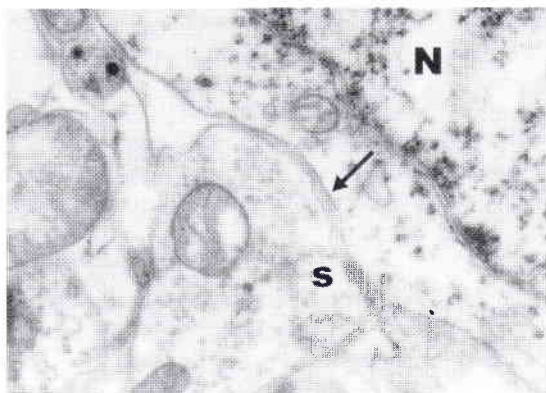


Ryc. 4. *Diestrus* – immunoreaktywność na GFAP astrocytów jądra łukowatego (pow. ok. $450\times$)

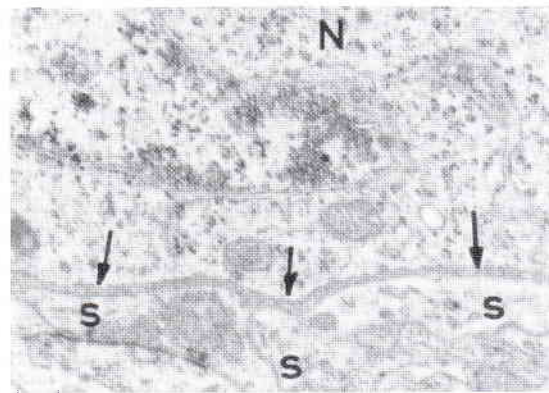
w istocie szarej środkowej i jądrze łukowatym były podobne. W fazach *proestrus* i *estrus* cyklu rujowego znacznie wzrastało otoczenie ciał neuronów przez wypustki astrocytów w obu badanych obszarach. Delikatne wypustki ułożone nawet w kilka warstw rozłączały synapsy aksosomacyjne, oddzielając biegun presynaptyczny – akson od bieguna postsynaptycznego – ciała neuronu (ryc. 5, 6). W *metestrus* i *diestrus* w obu badanych obszarach mózgu obserwowano zwiększenie kontaktów synaptycznych aksosomatycznych z błoną ciał neuronów (ryc. 7, 8).

Gonadalne hormony nie tylko zmieniają czynność neuronów podwzgórza, ale także oddziałują

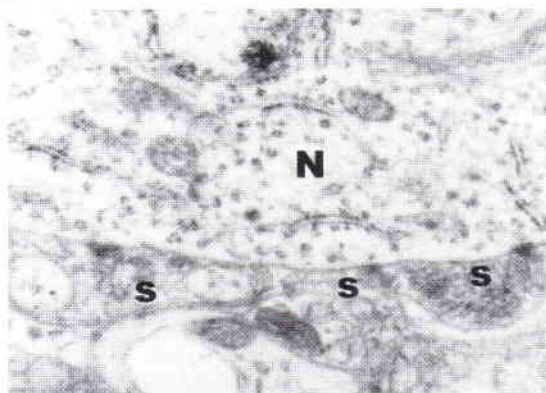
na morfologię i funkcje komórek glejowych. U ssaków najlepiej udokumentowano ich wpływ w obszarach podwzgórza, odpowiedzialnych za uwalnianie hormonów gonadalnych (10, 27, 39). W nielicznych pracach wykazano ich oddziaływanie na astrogleję w obszarach mózgu poza podwzgórzem (25, 40). W jądrze łukowatym podwzgórza opisane w wielu pracach astrocyty podlegają naturalnym i odwracalnym zmianom. Dotyczą one immunoreaktywności na GFAP, gęstości ich wypustek oraz związanej z nimi plastyczności synaps w cyklu rujowym. Z tych też względów obszar ten celowo wybrano w niniejszej pracy jako wzorcowy. Wykazano (30), że zmianom tym w *proestrus* i *estrus* w jądrze łukowatym towarzyszył równoczesny spadek ilości synaps aksosomatycznych. Delikatne, lamelarne wypustki glejowe ułożone w wiele warstw, wsuwane pomiędzy bieguny pre- i postsynaptyczne, rozłączały ok. 31% synaps. Według Garcia-Segura i wsp. (14) 17β -estradiol przyczynia się do wydłużania końcowych wypustek astrocytów i w konsekwencji do rozłączania synaps. U owariektomizowanych samic 17β -estradiol po 24 godzinach od podania powodował podobne zmiany, jakie pojawiały się w fazach *proestrus* i *estrus*. W fazach *metestrus* i *diestrus* oraz po 48 godzinach od jednorazowego podania podskórnie 17β -estradiolu owariektomizowanym szczurom wpływ hormonu był odwracalny. Manifestował się on spadkiem immunoreak-



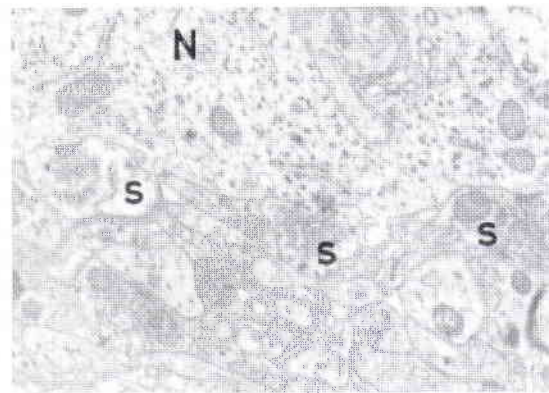
Ryc. 5. *Estrus* – fragment neuronu (N) z obszaru istoty szarej środkowej. Wypustki astrocytów (\downarrow) rozłączają synapsy (s) (pow. ok. 14 000 \times)



Ryc. 6. *Estrus* – fragment neuronu (N) z obszaru jądra łukowatego otoczonego wypustkami astrocytów (\downarrow) rozłączającymi synapsy (s) (pow. ok. 14 000 \times)



Ryc. 7. *Diestrus* – fragment neuronu (N) z obszaru istoty szarej środkowej i przylegające do niego synapsy (s) (pow. ok. 14 000 \times)



Ryc. 8. *Diestrus* – fragment neuronu (N) z obszaru jądra łukowatego z przylegającymi do niego synapsami (pow. ok. 14 000 \times)

tywności na GFAP astrocytów, zmniejszeniem gęstości ich wypustek oraz wzrostem ilości synaps aksosomatycznych. Podobne wyniki obserwowano w innych obszarach podwzgórza: jądrze nadwzrokowym i wyniosłości pośrodkowej u szczura i mały. Wpływ 17β -estradiolu był specyficzny, ponieważ doświadczenia z użyciem innych hormonów 17α -estradiolu, progesteronu i 17β -estradiolu wspólnie z progesteronem, podanych jednorazowo w różnych dawkach owariektomizowanym szczurom nie powodowały opisanych efektów (31, 34). Podobne jak w jądrze łukowatym, zmiany immunoreaktywności na GFAP astrocytów pod wpływem estrogeny wykazano w obrębie zakrętu zębatego hipokampu oraz w gałce bladej w cyklu rujowym szczura. Sugeruje to, że astrocyty obszarów niebezpośrednio włączonych w behavior płciowy mogą także ulegać zmianom. Jednakże mechanizm działania hormonów steroidowych pozostaje w dalszym ciągu niewyjaśniony (8, 13, 40).

Obszar istoty szarej środkowej zasługuje na uwagę dzięki połączeniom z wieloma innymi obszarami. Połączona jest ona z podwzgórzem zarówno szlakami wstępującymi, jak i zstępującymi. Włączony jest on m.in. w takie funkcje jak: zmiany bólowe, reakcje emocjonalne i obronne, zapamiętywanie oraz oddawanie moczu (1, 3, 17, 42, 43). Na szczególną uwagę zasługuje udział istoty szarej środkowej w uwalnianiu i hamowaniu wydzielania gonadotropin, wykazany na podstawie

badan̄ elektrofizjologicznych (4, 5, 11). Nadto niedawno immunocytochemicznie wykazano u samic szczura, kota i chomika obecność receptorów dla estrogenów w istocie szarej środkowej śródmózgowia (2, 42). Może to świadczyć o tym, że obszar ten włączony jest w zachowanie matczyne i lordozę (41). Także immunocytochemicznie, stosując specyficzne przeciwciała, wykazano różnorodność neurotransmiterów, co wskazuje, że jest on niezwykle skomplikowany czynnościowo (1, 11, 16, 17).

Wyniki badan̄ własnych, dotyczące istoty szarej środkowej są podobne do opisanych przez innych autorów w jądrze łukowatym podwzgórza. Wzrost immunoreaktywności na GFAP i wydłużanie wypustek glejowych oraz korespondujące z nimi rozłączenie synaps aksonomatyecznych w *proestrus* i *estrus* są trudne do zinterpretowania, jednakże wskazują na włączenie astrocytów w odpowiedź na hormony steroidowe. Wyniki sugerują, że gonadalne hormony steroidowe w istocie szarej środkowej wpływają na naturalne i odwracalne zmiany zachowania się astrocytów w cyklu rujowym 100-dniowych samic szczura. Wskazują również, że astrocyty są ogniwem modyfikacji transmisji neuronalnej. Niemożliwe jest określenie na podstawie niniejszych badan̄ charakteru chemicznego rozłączanych połączeń synaptycznych. Rozległe projekcje zarówno wewnątrz badanego obszaru, jak i do wielu innych oraz bogactwo neurotransmiterów świadczą o niezwyklej złożoności jego budowy i funkcji, które ciągle są odkrywane i wymagają dalszych badan̄.

Piśmiennictwo

- Barbaresi P., Gazzanelli G., Malatesta M.: Glutamate positive neurons and terminals in the rat periaqueductal gray matter (PAG): a light and electron microscopic immunocytochemical study. *J. Comp. Neurol.* 1990, 83, 381-396.
- Boers J., Gerrits P. O., Meijer E., Holstege G.: Estrogen receptor-alpha immunoreactive neurons in the mesencephalon, pons and medulla oblongata of the female golden hamster. *Neurosci. Lett.* 1999, 267, 17-20.
- Buma P., Veening J., Hafmans T., Joosten H., Nieuwenhuys R.: Ultrastructure of the periaqueductal grey matter of the rat; an electron microscopical and horse-radish peroxidase study. *J. Comp. Neurol.* 1992, 319, 519-535.
- Carrer H. F., Taleisnik S.: Effect of mesencephalic stimulation on the release of gonadotrophins. *J. Endocrinol.* 1970, 48, 527-539.
- Carrer H. F., Taleisnik S.: Neural pathways associated with the mesencephalic inhibitory influence on gonadotrophin secretion. *Brain Res.* 1972, 38, 299-313.
- Compagnone N., Fellmann D., Bugnon C., Jaquemard C.: Diffusible factors from rat arcuate nucleus and Broca's diagonal band nucleus increase size and neurite outgrowth, respectively, of cultured melanin-concentrating hormone containing neurons. *Brain Res.* 1993, 628, 137-144.
- Cummings J. F., DeLahunta A., Riis R. C., Loew E. R.: Neuropathological changes in a young adult tibetan terrier with subclinical neural ceroidlipofuscinosis. *Prog. Vet. Neurol.* 1990, 1, 301-309.
- Del Cerro S., Garcia-Estrada J., Garcia-Segura L. M.: Neuroactive steroids regulate astroglia morphology in hippocampal cultures from adult rats. *Glia* 1995, 14, 65-71.
- Derouiche A., Frotscher M.: Astroglial processes around identified glutamatergic synapses contain glutamine synthetase: evidence for transmitter degradation. *Brain Res.* 1991, 552, 346-350.
- Dueñas M., Luquin S., Chowen J. A., Torres-Aleman I., Naftolin F., Garcia-Segura L. M.: Gonadal hormone regulation of insulin-like growth factor-I-like immunoreactivity in hypothalamic astroglia of developing and adult rats. *Neuroendocrinol.* 1994, 59, 528-538.
- Elias C. F., Bittencourt J. C.: Study of the origins of melanin-concentrating hormone and neuropeptide EI immunoreactive projections to the periaqueductal gray matter. *Brain Res.* 1997, 55, 255-271.
- Garcia-Segura L. M., Cañas B., Párducz A., Rougon G., Theodosis D., Naftolin F., Torres-Aleman I.: Estradiol promotion of changes in the morphology of astroglia growing in culture depends on the expression of polysialic acid of neural membranes. *Glia* 1995, 13, 209-216.
- Garcia-Segura L. M., Chowen J. A., Dueñas M., Torres-Aleman I., Naftolin F.: Gonadal steroids as promoters of neuro-glial plasticity. *Psychoneuroendocrinol.* 1994a, 19, 445-453.
- Garcia-Segura L. M., Luquin S., Párducz A., Naftolin F.: Gonadal hormone regulation of glial fibrillary acidic protein immunoreactivity and glial ultrastructure in the rat neuroendocrine hypothalamus. *Brain Res.* 1994 b, 92, 169-180.
- Garcia-Segura L. M., Torres-Aleman I., Naftolin F.: Astrocytic shape and glial fibrillary acidic protein immunoreactivity are modified by estradiol in primary rat hypothalamic cultures. *Dev. Brain Res.* 1989, 47, 298-302.
- Gioia M., Bianchi R.: Ultrastructure of substance P immunoreactive elements in the periaqueductal gray matter of the rat. *Anat. Rec.* 1990, 228, 345-357.
- Gioia M., Bianchi R.: Enkephalin in the caudal Pag of the rat: an immunocytochemical electron microscopic study. *J. Brain Res.* 1995, 36, 421-431.
- Hertz L.: Functional interactions between neurons and glial cells. *Regulatory Mechanisms of Neuron to Vessel Communication in the Brain* 1989, 33, 271-305.
- Hösl E., Hösl L.: Cellular localization of estrogen receptors on neurons in various regions of cultured rat CNS: coexistence with cholinergic and galanin receptors. *Int. J. Dev. Neurosci.* 1999, 17, 317-330.
- Hösl E., Jurasin K., Rühl W., Lüthy R., Hösl L.: Colocalization of androgen, estrogen and cholinergic receptors on cultured rat central nervous system. *J. Dev. Neurosci.* 2001, 19, 11-19.
- Hösl E., Rühl W., Hösl L.: Histochemical and electrophysiological evidence for estrogen receptors on cultured astrocytes: colocalization with cholinergic receptors. *Int. J. Dev. Neurosci.* 2000, 18, 101-111.
- Janecko K.: The proliferative activity of astrocytes after immunoglobulin G uptake in the injured mouse cerebral hemisphere. *Folia Histochem. Cytobiol.* 1994, 32, 239-241.
- Kow L. M., Pfaff D.: Mapping of neural and signal transduction pathways for lordosis in the search for estrogen actions of the central nervous system. *Behav. Brain Res.* 1998, 92, 169-180.
- Langub M. C., Watson R. E.: Estrogen receptor-immunopositive glia, endothelia, and ependyma in guinea pig preoptic area and median eminence: electron microscopy. *Endocrinol.* 1992, 130, 364-372.
- Luquin S., Naftolin F., Garcia-Segura L. M.: Natural fluctuation and gonadal hormone regulation of astrocyte immunoreactivity in dentate gyrus. *J. Neurobiol.* 1993, 24, 913-924.
- Marcotti W., Provini L., Rosina A.: Neuronal and glial localization of the GABA transporter GAT-1 in the cerebellar cortex. *NeuroRep.* 1996, 7, 2993-2996.
- Matsumoto A., Arai Y.: Sexual dimorphism in „wiring pattern” in the hypothalamic arcuate nucleus and its modification by neonatal hormonal environment. *Brain Res.* 1980, 190, 238-242.
- Meshul Ch. K., Seil F. J., Herndon R. M.: Astrocytes play a role in regulation of synaptic density. *Brain Res.* 1987, 402, 139-145.
- Montgomery D. L.: Astrocytes: form, functions and role in disease. *Vet. Pathol.* 1994, 31, 145-167.
- Olmos G., Naftolin F., Perez J., Tranque P. A., Garcia-Segura L. M.: Synaptic remodelling in the rat arcuate nucleus during the estrous cycle. *Neurosci.* 1989, 32, 663-667.
- Párducz A., Perez J., Garcia-Segura L. M.: Estradiol induces plasticity of GABA-ergic synapses in the hypothalamus. *Neurosci.* 1993, 53, 395-401.
- Patel A. J., Gray C. W.: Neurotrophic factors produced by astrocytes involved in the regulation of cholinergic neurons in the central nervous system. *Biology and Pathology of Astrocytes-Neuron Interactions*. Plenum Press New York 1993, 103-115.
- Pentreath V. W.: The search for primary events in pathology in African sleeping sickness. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* 1991, 85, 145-147.
- Perez J., Luquin S., Naftolin F., Garcia-Segura L. M.: The role of estradiol and progesterone in phased synaptic remodeling of the rat arcuate nucleus. *Brain Res.* 1993, 608, 38-44.
- Pfaff D., Keiner M.: Atlas of estrogen-concentrating cells in the central nervous system of the female rat. *J. Comp. Neurol.* 1973, 151, 121-158.
- Sato T.: A modified method for lead staining of thin sections. *J. Electronmicroscopy* 1968, 17, 158-159.
- Sontheimer H., Waxman S. G.: Expression of voltage-activated ion channels by astrocytes and oligodendrocytes in the hippocampal slice. *J. Neurophysiol.* 1993, 70, 1863-1873.
- Sternberger L. A.: Immunocytochemistry. John Wiley and Sons, New York 1986.
- Theodosis D. T., Poulain D. A.: Neuronal-glia and synaptic plasticity in the adult rat paraventricular nucleus. *Brain Res.* 1989, 484, 361-366.
- Tranque P. A., Suarez J., Olmos G., Fernandez B., Garcia-Segura L. M.: Estradiol-induced redistribution of glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the rat brain. *Brain Res.* 1987, 406, 348-351.
- Tsukahara S., Yamanouchi K.: Neurohistochemical and behavioral evidence for lordosis-inhibiting tract from lateral septum to periaqueductal gray in male rats. *J. Comp. Neurol.* 2001, 431, 293-310.
- VanderHorst V. G. J. M., Mouton L. J., Blok B. F. M., Holstege G.: Distingt cell groups in the lumbo-sacral cord of the cat project to different areas in the periaqueductal gray. *J. Comp. Neurol.* 1996, 376, 361-385.
- Wang H., Guan J. L., Nakai Y.: Immunoelectron microscopy of the enkefalinergic innervation of GABA-ergic neurons in the periaqueductal gray. *Brain Res.* 1994, 665, 39-46.
- Wikin J. W., Ferin M., Popilskis S. J., Silverman A. J.: Effects of gonadal steroids on the ultrastructure of GnRH neurons in the rhesus monkey: synaptic input and glial apposition. *Endocrinol.* 1991, 129, 1083-1092.
- Yoshida K., Gage F. H.: Fibroblast growth factors stimulate nerve growth factor synthesis and secretion by astrocytes. *Brain Res.* 1991, 538, 118-126.