

Ekspresja receptorów estrogenowych α w zakręcie przyhipokampowym samic królików po 17β estradiolu

IZABELA KRAKOWSKA, JADWIGA JAWORSKA-ADAMU

Katedra Anatomii i Histologii Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

Krakowska I., Jaworska-Adamu J.

Expression of estrogen receptors α in parahippocampal gyrus following 17β estradiol application in female rabbits

Summary

The aim of the study was to determine the localization of estrogen receptors α in the parahippocampal gyrus (gyrus parahippocampalis) following 17β application in ovariectomized rabbits. Studies were carried out using an immunocytochemical method. Estrogen receptors α immunoreactivity in neurons and astrocytes were detected in the cellular layers of parasubiculum, perisubiculum and entorhinalis region. However ER α immunoreactivity was not detected in astrocytes ovariectomized rabbits in the experimental group where there was no E2 application. On the other hand, the neurons showed very weak colorization. The results obtained indicate that the structure of rabbit parahippocampal gyrus is under the influence of estrogen, which causes an increase in ER α expression.

Keywords: estrogen receptors α , hippocampal gyrus, rabbit

Do zakrętu przyhipokampowego (*gyrus parahippocampalis*) należą: przedpodpora (*presubiculum*), przypodpora (*parasubiculum*) i pole śródwęchowe (*area entorhinalis*). Obszar ten jest związany m.in. z procesami zapamiętywania i uczenia się. Podpora (*subiculum*), należąca do tworu hipokampa (*formatio hippocampi*), przechodzi w kilkuwarstwową przedpodporę (*presubiculum*). *Presubiculum* utworzone jest z szerokiego pasma komórek nerwowych, w którym stwierdzono obecność 4 warstw – trzy warstwy komórkowe i jedną brzeżną. Przedpodpora zagina się do przodu i przechodzi w strukturę zwaną przypodporą (*parasubiculum*), która również posiada czterowarstwową budowę składającą się z jednej warstwy brzeżnej i trzech warstw komórkowych. Przypodpora przechodzi w pole śródwęchowe (12, 14).

Wiele obszarów mózgowia dorosłych ssaków znajduje się pod wpływem estrogenów, które oddziałują zarówno na neurony, jak i astrocyty przez receptory estrogenowe. Astrocyty pobudzone estrogenem uwalniają czynniki neurotroficzne zapobiegające śmierci neuronów (4). W tych komórkach glejowych wykryto receptory estrogenowe α (ER α). Estrogeny wpływają na dojrzewanie neuronów i astrocytów, ich przeżywalność, a w konsekwencji mogą prowadzić do rozwoju chorób neurodegeneracyjnych wraz z wiekiem. W dostępnej literaturze mało jest danych dotyczących wpływu estrogenów i występowania ER α w mózgowiu królika (1). Króliki, jako poliestralne, są interesującym obiektem badawczym, ponieważ nie wykazują cykli rujowych jak inne gatunki.

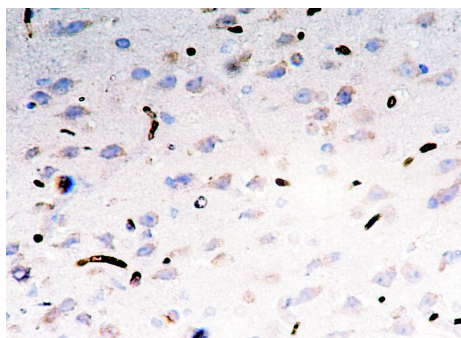
Celem badań było określenie wpływu 17β estradiolu (E2) na ekspresję immunoreaktywności ER α w neuronach i astrocytach zakrętu przyhipokampowego królików poddanych ovariectomii (OVX). Było nim również porównanie intensywności immunozabarwienia ER α astrocytów u samic OVX z królikami OVX, którym podawano E2.

Materiał i metody

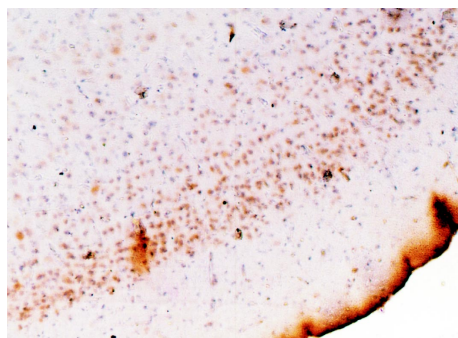
Do badań użyto 5 samic królików w wieku od 4 do 5 lat. Samice te poddano obustronnej ovariectomii (OVX), w pełnym znieczuleniu ogólnym 5% ketaminą w dawce 30 mg/kg m.c. Materiał do badań stanowił zakręt przyhipokampowy (*presubiculum*, *parasubiculum* i *area entorhinalis*). Króliki podzielono na dwie grupy doświadczalne. Pierwszą grupę stanowiły 2 samice, które nie otrzymywały 17β estradiolu (E2), a materiał do badań pobierano 4 tyg. po ovariectomii (OVX). Druga grupa to 3 ovariectomizowane samice (OVX + E2), którym po 4 tyg. od OVX dożylnie podawano przez 7 kolejnych dni E2 (Mesalin firmy Polfa). Króliki po 24 h od ostatniego podania E2 poddano eutanazji morbitalem. Pobrany materiał utrwalono i wykonano parafinowe skrawki o grubości 4 μ m. Następnie przeprowadzono immunocytochemiczną reakcję wykrywania ER α w zakręcie przyhipokampowym metodą DAKO LSAB+Kit Peroxidase. Skrawki inkubowano z pierwotnym, monoklonalnym przeciwciałem mysim anti-ER α NCL-L-ER-6F11 (firmy Novocastra), potem z monoklonalnym wtórnym biotynylowanym anti-mysim IgG (firmy DAKO). Następnie skrawki inkubowano z kompleksem streptowidynaperoksydaza (firmy DAKO). Jako chromogenu użyto DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride firmy DAKO). Dodatkowo skrawki podbarwiono hematoksyliną Mayera. Otrzymano końcowy, nierozpuszczalny produkt reakcji o różnej intensywności brązowego zabarwienia. Kontrolę specyficzności reakcji wykonano omijając pierwotne przeciwciało dla antygeny lub zastępowano je normalną surowicą króliczą; w preparatach nie zaobserwowano produktu reakcji. Immunoreaktywne ER α neurony i astrocyty zakrętu przyhipokampowego oglądano i fotografowano w mikroskopie optycznym Jenaval (Zeiss).

Wyniki i omówienie

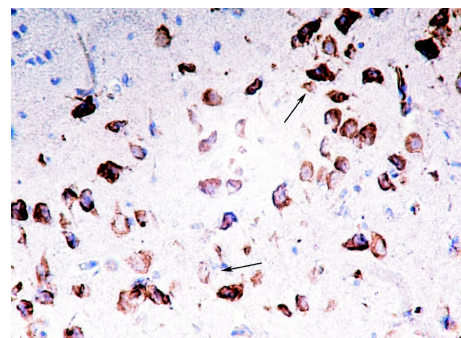
U samic królików z pierwszej grupy doświadczalnej po OVX, bez podawania E2, od których pobrano materiał do badań po 2 tygodniach, astrocyty cechowały się brakiem immunoreaktywności ER α i podbarwione były jedynie he-



Ryc. 1. Słaba immunoreaktywność ER α w neuronach i brak immunozabarwienia w astrocytach *presubiculum* OVX królików (pow. ok. 450 \times)



Ryc. 2. Immunoreaktywność ER α w strukturach *parasubiculum* u OVX+E2 królików (pow. ok. 35 \times)



Ryc. 3. Intensywna immunoreaktywność ER α w neuronach, pewnych astrocytach (\downarrow) z *area entorhinalis* u OVX+E2 królików (pow. ok. 450 \times)

matoksyliną Mayera na niebiesko we wszystkich warstwach komórkowych *presubiculum*, *parasubiculum* oraz *area entorhinalis*. Neurony wykazywały bardzo słabe immunozabarwienie ER α we wszystkich wyżej opisanych strukturach (ryc. 1).

W drugiej grupie królików po OVX + E2, od których materiał pobrano po 24 h od zaprzestania podawania estradiolu, obserwowano intensywnie immunozabarwienie ER α w neuronach oraz astrocyty o różnej intensywności brązowego immunozabarwienia w warstwach komórkowych *presubiculum*, *parasubiculum* oraz *area entorhinalis*. Za astrocyty przyjęto komórki znacznie mniejsze od neuronów. Na podstawie immunozabarwienia określono wewnątrzkomórkową lokalizację ER α w astrocytach. Immunoreaktywność we wszystkich badanych obszarach lokalizowała się zwłaszcza w cytoplazmie ciał komórkowych i niektórych głównych wypustkach oraz w niektórych jądrach komórkowych astrocytów. Należy zaznaczyć, że nie wszystkie astrocyty badanych obszarów wykazywały immunozabarwienie (ryc. 2, 3).

U dorosłych osobników E2 oddziałuje nie tylko na obszary włączone w procesy neurohormonalne, ale także na inne pola mózgowia, przyczyniając się do zmian morfologicznych i czynnościowych astrocytów w celu prawidłowego funkcjonowania neuronów (6, 7, 9). Astrocyty są najliczniejszymi komórkami glejowymi, służącymi do utrzymania homeostazy mózgowia włączone są w remodelację synaps oraz neuroprotekcję. Estrogen stymuluje astrocyty do uwalniania czynników neurotroficznycych (4). Występowanie ER α w astrocytach wykryto, zaś w innych komórkach glejowych sugeruje się ich brak (8). Podobnie jak w badaniach własnych zakreślu przyhipokampowego u OVX królików, także w hipokampie OVX szczurów opisano brak lub słabą immunoreaktywność ER α w neuronach i astrocytach (8, 9). Sugeruje się, że może to być związane ze spadkiem endogennych estrogenów we krwi po ovariectomii zwierząt, co w konsekwencji powoduje spadek ekspresji ER α (13).

Potwierdzono obecność ER α w ok. 50% astrocytów, co wskazuje na ich heterogenność w wyniosłości przyśrodkowej świnki morskiej (8). Inni autorzy sugerują, że ER α nie występuje w całym mózgowiu (4, 13). Opisano wewnątrzkomórkową lokalizację ER α w ciele komórkowym, niektórych jądrach i pewnych początkowych wypustkach astrocytów, co jest zgodne z wynikami badań własnych (7, 15). Poznano mechanizm oddziaływania estrogenu w neuronach przez jądrowe ER α , w celu transkrypcji i wzrostu produk-

cji białek. Nadto opisano cytoplazmatyczną lokalizację ER α w neuronach, która wskazuje na ich syntezę na siateczce śródplazmatycznej szorstkiej, skąd mogą być przemieszczane do jądra komórkowego (10). Ostatnio ER α opisano w błonie komórkowej (2, 3). Podobnie jak w neuronach, także w astrocytach ER α mogą służyć do bezpośredniego wpływu estrogenu na te komórki glejowe w celu ich prawidłowego funkcjonowania, mogą też regulować interakcje neuron-astrocyt.

Wyniki badań własnych dostarczyły dowodów, że egzogeny estrogen podany OVX królikom powoduje znaczny wzrost ekspresji ER α w neuronach i niektórych astrocytach, co może świadczyć o ich różnej specjalizacji czynnościowej.

Piśmiennictwo

1. Caba M., Beyer C., Gonzáles-Mariscal G., Morrell J. I.: Immunocytochemical detection of estrogen receptor- α in the female rabbit forebrain: topography and regulation by estradiol. *Cell Neuroendocrinol.* 2003, 77, 208-222.
2. Caldwell J. D.: A sexual arousability model involving steroid effects at the plasma membrane. *Neurosci. Behav. Rev.* 2002, 26, 13-30.
3. Dhanadapani K. M., Brann D. W.: Estrogen-astrocyte interactions: implications for neuroprotection. *BMC Neurosci.* 2002, 3, 6.
4. Donahue J. E., Stopa E. G., Chorsky R. L., King J. C., Schipper H. M., Tobet S. A., Blaustein J. D., Reichlin S.: Cells containing immunoreactive estrogen receptor- α in the human basal forebrain. *Brain Res.* 2000, 856, 142-151.
5. Garcia-Segura L. M., Chowen J. A., Dueñas M., Torres-Aleman L., Naftalin F.: Gonadal steroids as promoters of neuro-glial plasticity. *Psychoneuroendocrinol.* 1994, 19, 445-453.
6. Hösl E., Rühl W., Hösl L.: Histochemical and electrophysiological evidence for estrogen receptors on cultured astrocytes: colocalization with cholinergic receptors. *Int. J. Devl. Neurosci.* 2000, 18, 101-111.
7. Jaworska-Adamu J., Cybulska R., Kalinowska M.: Zmiany morfologii astrocytów w istocie szarej środkowej i jądrze łukowatym w cyklu rujowym szczura. *Medycyna Wet.* 2004, 60, 1114-1117.
8. Langub M. C., Watson R. E.: Estrogen receptor-immunoreactive glia, endothelium and ependyma in guinea pig preoptic area and median eminence: electron microscopy. *Endocrinology* 1992, 130, 364-372.
9. Luquin S., Naftalin F., Garcia-Segura L. M.: Natural fluctuation and gonadal hormone regulation of astrocytes immunoreactivity in dentate gyrus. *J. Neurobiol.* 1993, 24, 913-924.
10. Milner T. A., McEwen B. S., Hayashi S., Li C. J., Reagan L. P., Alves S. E.: Ultrastructural evidence that hippocampal alpha receptors are located at extranuclear sites. *J. Comp. Neurol.* 2001, 429, 355-371.
11. Mitra S. W., Hoskin E., Yudkovitz J., Pear L., Wilkinson H. A., Hayashi S., Pfaff D. W., Ogawa S., Rohrer S. P., Schaeffer J. M., McEwen B. S., Alves S. E.: Immunolocalization of estrogen receptor β in the mouse brain comparison with estrogen receptor α . *Endocrinol.* 2003, 144, 2055-2067.
12. Oswald S.: Topographic organization of the projections from the entorhinal area to the hippocampal formation of the rat. *J. Comp. Neurol.* 1986, 167, 285-314.
13. Rune G. M., Wehrenberg U., Prange-Kiel J., Zhou L., Adelman G., Frotscher M.: Estrogen up-regulates estrogen receptor α and synaptophysin in slice cultures of rat hippocampus. *Neurosci.* 2002, 113, 167-172.
14. Szczech J.: Mielinizacja układu limbicznego w rozwoju ontogenetycznym szczura. *Neuropatol. Pol.* 1978, 16, 25.

Adres autora: dr Izabela Krakowska, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin