

Immunoreaktywność kalretyniny w istocie szarej środkowej śródmózgowia u szynszyli

JADWIGA JAWORSKA-ADAMU, RADOSŁAW SZALAK,
MAŁGORZATA MATYSEK, RENATA SZEWERNIAK

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

Jaworska-Adamu J., Szalak R., Matysek M., Szewerniak R.

Immunoreactivity of calretinin in the periaqueductal gray matter of the midbrain of chinchillas

Summary

The purpose of this study was to trace the immunoreactivity of the calcium binding protein calretinin in the periaqueductal gray matter of the midbrain of chinchillas. For this study the midbrains of five sexually mature male chinchillas were used. The immunoreactivity of this protein in this species has never been investigated up till now. The localization of its activity was examined by carrying out peroxidase-antiperoxidase (PAP) reaction using a mouse specific monoclonal antibody against calretinin. An intensive immunostaining for calretinin was observed in all the neurons in the dorsal and dorso-lateral periaqueductal gray matter. The results of the studies obtained suggest a similarity in the distribution of calretinin as seen in the neurons of periaqueductal gray matter of rats. This indicates that calretinin is involved in the regulation of intracellular calcium ion concentration. In this manner it can influence the proper functions of the neurons of the periaqueductal gray matter of the midbrain of the chinchilla.

Keywords: chinchilla, periaqueductal gray matter, calretinin

Jony wapnia w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) kontrolują wiele procesów, włączając szybki wychwyt cząsteczek, syntezę i uwalnianie neuroprzeźkaźników oraz przewodnictwo synaptyczne. Nadmiar jonów wapnia jest toksyczny dla neuronów, dlatego muszą istnieć sprawne systemy jego wychwyty (21). Do tych systemów należą białka wiążące jony wapnia sensoryczne bezpośrednio indukujące, wewnątrzkomórkowe procesy oraz białka buforowe utrzymujące odpowiedni poziom jonów w cytoplazmie. Białka te należą do dużej rodziny „EF-hand” i przypominają kształtem dłoń. Ich wspólną cechą strukturalną jest obecność domen zbudowanych z dwóch α -helis i pętli składającej się z 12 aminokwasów, która wiąże wapń (1, 16).

Kalretyninę zaliczono do szybkich buforów wapnia i wykazano jej strukturalne podobieństwo do kalbindyny D28k. Niektórzy autorzy opisali kalretyninę także jako białko sensoryczne. Funkcje tego białka, jak innych, nie są w pełni wyjaśnione (5, 20). Kalretyninę buduje 6 domen „EF-hand”, spośród których 5 wychwyty i wiąże wapń. Białko to włączone jest w transport jonów, w sygnalizację komórkową oraz przewodnictwo synaptyczne (16, 17, 21). Do najlepiej poznanych i uznanych białek wiążących jony wapnia jako neuroanatomicznych markerów należą: kalretynina,

kalbindyna D28k i parwalbumina. Występują one w niektórych subpopulacjach neuronów, wpływając na ich prawidłowe funkcjonowanie (1, 10, 13, 20, 21). Stosując specyficzne przeciwciała immunocytochemicznie wykazano dużą ekspresję kalretyniny w istocie szarej środkowej śródmózgowia szczura (15, 18). Istota szara środkowa śródmózgowia (substantia grisea centralis – SGC) jako obszar limbiczny zasługuje na szczególną uwagę ze względu na złożoną budowę, zawartość różnych neuroprzeźkaźników i neuropeptydów oraz na wzajemne połączenia z wieloma ośrodkami mózgowia (2, 3, 6-8, 14). SGC pełni wiele skomplikowanych funkcji (4, 9, 11, 18, 23).

Ze względu na brak badań dotyczących morfologii neuronów i rozmieszczenia w nich kalretyniny dokonano obserwacji SGC dorosłych samców szynszyli. Nadto porównano intensywność immunoreaktywności białka w grzbietowej, grzbietowo-bocznej oraz brzuszno-bocznej istocie szarej środkowej.

Materiał i metody

Do badań użyto mózgowia 5 dojrzałych płciowo (ok. 1,5-roczych) samców szynszyli pochodzących z fermy „Raba” w Myślenicach. Mózgowia wypreparowano natychmiast po uboju zwierząt. Materiał utrwalono w świeżej zbuforowanej 10% formalinie o pH = 7,0, przez 12 godzin, w tempe-

raturze 4°C. Po utrwaleniu pobrano śródmózgowia, z których wykonano 6 µm czołowe skrawki rutynową techniką parafinową. Skrawki zawierające istotę szarą środkową umieszczano na szkiełkach podstawowych i przenoszono na 30 minut do ciepłarki o temperaturze 56°C. Po odparafinowaniu w świeżym ksylenie i nawodnieniu w alkoholach o malejącym stężeniu inkubowano je, w celu zahamowania aktywności endogennej peroksydazy, w 0,4% H₂O₂ w buforze fosforanowym, w temperaturze pokojowej przez 30 minut. Następnie płukano w świeżym 0,5 M buforze trisowym (TBS-Tris Buffered Saline) o pH = 7,6. Celem usunięcia podbarwienia tła, skrawki traktowano normalną surowicą kozią i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 20 minut.

Przeprowadzono immunocytochemiczną reakcję peroksydaza-antyperoksydaza (peroxydase-antyperoxydase PAP) z wykorzystaniem specyficznego monoklonalnego przeciwciała mysiego skierowanego przeciwko kalretyninie (Sigma 1 : 2000) przez 48 godzin, w temperaturze 4°C (22). Do immunobarwienia użyto zestawu przeciwciał i odczynników rozcieńczanych w tym samym buforze 0,5 M TBS, w którym także dokonywano płukania preparatów po zastosowaniu każdego przeciwciała.

Skrawki traktowano monoklonalnym przeciwciałem przeciwko mysim immunoglobulinom (IgG) (Sigma 1 : 50) przez godzinę. Następnie przeprowadzono inkubację w monoklonalnym kompleksie peroksydaza-antyperoksydaza (PAP).

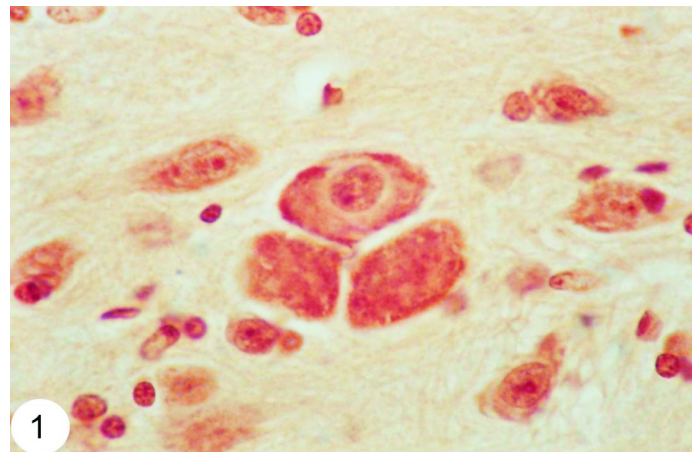
Dla badanego białka, jako chromogenu, użyto dwuaminobenzydyny (DAB, 3,3' - diaminobenzidine tetrahydrochloride, Aldrich). Inkubację z DAB przeprowadzono w temperaturze pokojowej przez 30 minut. Otrzymano nierozpuszczalny produkt reakcji o różnej intensywności brązowego zabarwienia. Następnie skrawki płukano w H₂O destylowanej, odwadniano, prześwietlano i zamykano w DPX (Fluka).

Dla użytej techniki immunocytochemicznej wykonano kontrolę specyficzności, w której ominięto pierwsze przeciwciało przeciwko antygenowi lub zastąpiono go normalną surowicą.

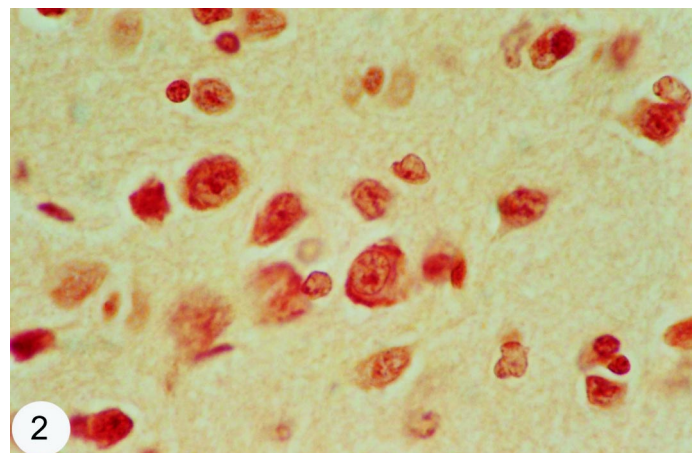
Neurony grzbietowej, grzbietowo-bocznej oraz brzuszno-bocznej SGC immunopozytywne dla kalretyniny obserwowano i fotografowano w mikroskopie świetlnym Axio-lab (Zeiss).

Wyniki i omówienie

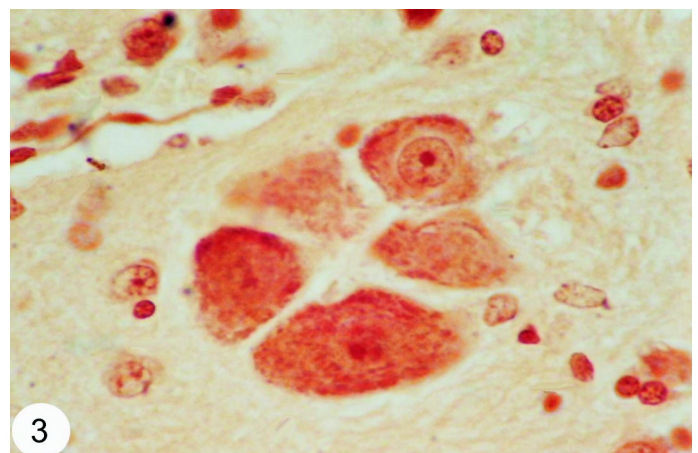
W grzbietowej, grzbietowo-bocznej i brzuszno-bocznej SGC u dorosłego samca szynszyli ujawniono neurony, z niewielką ilością neuroplazmy, małe i średnie, owalnego, okrągłego, wrzecionowatego, oraz piramidalnego kształtu. Intensywną immunoreaktywność dla kalretyniny obserwowano w postaci brązowych ziarnistości rozmieszczonych równomiernie w neuroplazmie wokół jądra komórkowego. We wszystkich badanych częściach SGC występowały nadto duże, owalne lub okrągłe neurony z dużą ilością neuroplazmy, w której podobnie jak w małych i średnich neuronach wykazano brązowe ziarnistości (ryc. 1, 2, 3). W skrawkach kontrolnych nie obserwowano immunoreaktywności dla kalretyniny.



Ryc. 1. Immunoreaktywność kalretyniny w neuronach grzbietowej istoty szarej środkowej. Pow. ok. 1000 ×



Ryc. 2. Immunoreaktywność kalretyniny w neuronach grzbietowo-bocznej istoty szarej środkowej. Pow. ok. 1000 ×



Ryc. 3. Immunoreaktywność kalretyniny w neuronach brzuszno-bocznej istoty szarej środkowej. Pow. ok. 1000 ×

Intensywną immunoreaktywność w SGC obserwowano u dorosłych szczurów, co koresponduje z wynikami badań własnych uzyskanych u dorosłego samca szynszyli. Nadto w SGC i podwzgórzu szczura opisano wspólne występowanie kalretyniny i kalbindyny D28k w tych samych neuronach (18). Kalretynina, podobnie jak inne białka wiążące wapń, lokalizuje się głównie w neuroplazmie. Obecność innego białka wią-

żącego wapń opisano w jądrze komórkowym, gdzie może regulować ekspresję genów kodujących białko (11).

W mózgowiu wielu gatunków zwierząt białka wiążące wapń rozmieszczone są specyficznie tylko w niektórych populacjach neuronów. Kalretynina może występować sama lub wspólnie z innymi białkami wiążącymi wapń. Istnieją także neurony pozbawione kalretyniny, a zawierające inne białka wiążące wapń (13, 17). Funkcje tego białka, podobnie jak kalbindyny, nie są w pełni wyjaśnione (20).

W korze mózgu np. neurony gruszkowate pozbawione są całkowicie kalretyniny, a zawierają kalbindynę i parwalbuminę, natomiast neurony warstwy ziarnistej wykazują ekspresję kalretyniny (17). Kalretynina i kalbindyna związane są głównie z pobudzającymi neuronami (13), natomiast parwalbumina lokalizuje się jedynie w neuronach zawierających kwas γ -aminomasłowy (GABA) (1, 13). Białka z rodziny „EF-hand” regulują aktywność neuronów przez buforowanie jonów wapnia i w ten sposób zabezpieczają je przed toksycznym działaniem nadmiaru wapnia. Uważa się, że białka te mogą być włączone w odpowiedzi na stres. Kalretynina, podobnie jak kalbindyna i parwalbumina, uczestniczy w plastyczności synaps oraz neuroprotekcji (18, 20).

Na szczególną uwagę zasługuje SGC, mimo że jej skomplikowana budowa jest poznana u wielu gatunków ssaków (5, 10, 11, 13, 14). Neurony SGC zawierają różne neuroprzekazniki, takie jak: noradrenalina, glutaminian, acetylocholina, histamina, serotonina, GABA oraz neuropeptydy, do których należą: substancja P, neurotensyna, enkefalina, dynorfina (2, 3). W ten sposób SGC wpływa na prawidłowe funkcjonowanie wielu ośrodków mózgowia przez wzajemne połączenia drogami wstępującymi i zstępującymi m.in.: z korą mózgu, ze wzgórzem i podwzgórzem, z obszarami przodomózgowia, z jądrami pnia mózgu, oraz rdzeniem kręgowym (6-8, 12). W ten sposób SGC włączona jest m.in. w hamowanie odczuwania bólu (analgezyj), reakcje emocjonalne i obronne (w tym agresję), zapamiętywanie, oddawanie moczu, w zachowanie płciowe, lordozę oraz wokalizację. SGC integruje odpowiedzi behawioralne na zagrożenie i stymulacje stresowe (4, 9, 12, 15, 19, 23). Obecność dużej ekspresji kalretyniny w neuronach SGC u dorosłego samca szynszyli, podobnie jak u szczura sugeruje, że jest ona włączona w znacznym stopniu w utrzymanie odpowiedniego poziomu jonów wapnia i w ten sposób moduluje aktywność neuronów oraz przewodnictwo synaptyczne. Kalretynina pełni zatem neuroprotektoryjną funkcję, chroniąc neurony SGC przed nadmiarem stężeniem jonów wapnia.

Fizjologiczne funkcje białek wiążących wapń, w tym kalretyniny w mózgowiu, nie są w pełni poznane (20). Dlatego niezbędne jest prześledzenie rozmieszczenia innych białek wiążących wapń – parwalbuminy i kalbindyny oraz wykazanie ich wspólnego występowania z neuroprzekaznikami w neuronach SGC dorosłego samca szynszyli.

Badania dostarczyły nowych informacji dotyczących morfologii neuronów i rozmieszczenia w nich kalretyniny w SGC szynszyli. Wskazuje to na podobieństwo zarówno morfologii, jak i immunoreaktywności kalretyniny, jaką zaobserwowano u szczura.

Piśmiennictwo

1. *Baimbridge K. G., Celio M. R., Rogers J. H.*: Calcium binding proteins in the nervous system. *Trends Neurosci.* 1992, 15, 303-308.
2. *Barbaresi P.*: GABA-immunoreactive neurons in the cat periaqueductal gray matter: a light and electron microscopic study. *J. Neurocytol.* 2006, 34, 471-487.
3. *Barbaresi P., Gazzanelli G., Malatesta M.*: Glutamate-positive neurons and terminals in the cat periaqueductal gray matter (PAG): a light and electron microscopic immunocytochemical study. *J. Comp. Neurol.* 1990, 383, 381-396.
4. *Behbehani M. M.*: Functional characterisation of the midbrain periaqueductal gray. *Prog. Neurobiol.* 1995, 46, 575-605.
5. *Billing-Marczak K., Kuznicki J.*: Calretinin-sensor or buffer – function still unclear. *Pol. J. Pharmacol.* 1999, 51, 173-178.
6. *Buma P., Veening J., Hafmans T., Joosten H., Nieuwenhuys R.*: Ultrastructure of the periaqueductal gray matter of the rat; an electronmicroscopical and horseradish peroxidase study. *J. Comp. Neurol.* 1992, 319, 519-535.
7. *Calka J., Juranek J., Wąsowicz K., Kaleczyc J., Łakomy M.*: Distribution and morphology of ChAT- and VACht-immunoreactive neurons in the tuberal hypothalamus of the pig. *Medycyna Wet.* 2007, 63, 377-496.
8. *Calka J., Załęcki M., Wąsowicz K., Łakomy M.*: Distribution and morphology of the NOS-immunoreactive neurons in the thoracolumbar and sacral spinal cord of the pig. *Medycyna Wet.* 2006, 62, 1089-1208.
9. *Carabrez A. P., Teixeira K. V., Graff F. G.*: Modulation of defensive behavior by periaqueductal NMDA/glycine-B receptor. *Neurosci. Behav. Rev.* 2001, 25, 697-709.
10. *Diáz-Regueira S., Anadón R.*: Calretinin expression in specific neuronal systems in the brain of an advanced teleost the grey mullet (*Chelon labrosus*). *J. Comp. Neurol.* 2000, 426, 81-105.
11. *German D. C., Ng M. C., Liang C. L., McMahon A., Iacopino A. M.*: Calbindin D28k in nerve cell nuclei. *Neuroscience* 1997, 81, 735-743.
12. *Gomoli E., Ribeiro-Barbosa E. R., Nagrano N., Goto M., Canteras N. S.*: Functional mapping of the prosencephalic systems involved in organizing predatory behavior in the rat. *Neuroscience* 2005, 130, 1055-1067.
13. *Gritti I., Manns I. D., Mainville L., Jones B. E.*: Parvalbumin, calbindin, or calretinin in cortically projecting and GABAergic, cholinergic, or glutamatergic basal forebrain neurons of the rat. *J. Comp. Neurol.* 2003, 458, 11-31.
14. *Hamilton B. L.*: Cytoarchitectural subdivisions of the periaqueductal gray matter in the cat. *J. Comp. Neurol.* 1973, 973, 149, 1-23.
15. *Klejbor I., Ludkiewicz B., Domaradzka-Pytel B., Spodnik J. H., Dziewiatkowski J., Moryś J.*: Influence of the „open field” exposure on calbindin D28k, calretinin, and parvalbumin containing cells in the rat midbrain – developmental study. *J. Physiol. Pharmacol.* 2006, 57, 149-164.
16. *Kreitsinger R. H., Nockolds C. E.*: Carp muscle calcium binding protein. II. Structure determination and general description. *J. Biol. Chem.* 1973, 248, 3313-3326.
17. *Resibois A., Rogers J. H.*: Calretinin in rat brain: an immunohistochemical study. *Neuroscience* 1992, 46, 101-134.
18. *Rogers J. H., Resibois A.*: Calretinin and calbindin D28k in rat brain: Patterns of partial co-localization. *Neuroscience* 1992, 51, 843-865.
19. *Sakuma Y., Pfaff D. W.*: Facilitation of female reproductive behavior from mesencephalic central gray in the rat. *Am. J. Physiol.* 1979, 237, 278-284.
20. *Schwaller B., Meyer M., Schiffman S.*: New functions for „old” proteins: the role of the calcium binding proteins calbindin D-28k, calretinin and parvalbumin, in cerebellar physiology. *Studies with knockout mice. Cerebellum* 2002, 1, 241-258.
21. *Seto-Oshima A.*: Calcium binding proteins in the central nervous system. *Acta Histochem. Cytochem.* 1994, 27, 93-106.
22. *Sternberger L. A.*: Immunocytochemistry, John Wiley and Sons, New York 1986.
23. *Sukikara M. H., Mota-Ortiz S. R., Baldo M. V., Felicio L. F., Canteras N. S.*: A role for the periaqueductal gray in switching adaptive behavioral responses. *J. Neurosci.* 2006, 26, 2583-2589.

Adres autora: dr hab. Jadwiga Jaworska-Adamu, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin; e-mail: jadwiga.jaworska@up.lublin.pl