

*Agnieszka Ciesielska, Ilona Joniec, Anna Członkowska*

## **Rola estrogenów w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych**

II Klinika Neurologii Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie

Katedra Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej Akademii Medycznej w Warszawie

### **Streszczenie**

Dane kliniczne wskazują, że estrogeny mogą stanowić jeden z czynników ochronnych przeciwdziałających rozwojowi wielu chorób neurologicznych, między innymi choroby Alzheimera. Wciąż jednak poddaje się w wątpliwość, czy zastosowanie estrogenów może łagodzić objawy neuropsychologiczne u kobiet ze zdiagnowaną chA. Jednak prowadzone intensywnie prace doświadczalne na różnych zwierzęcych modelach chorób neurodegeneracyjnych, jednoznacznie wskazują na właściwości neuroprotektoryjne estrogenów. Pomimo wykazania ochronnego działania estrogenów na neurony mechanizmy komórkowe leżące u jego podstaw wciąż wymagają wyjaśnienia. Niniejsza praca przeglądowa ma na celu przybliżenie istniejącej wiedzy na temat mechanizmów aktywności neuroprotektoryjnej estrogenów.

### **Summary**

Clinical observations indicate that estrogens exert a neuroprotection against neurodegenerative diseases such as Alzheimer disease. Although it is unclear whether estrogen may be effective in preventing further cognitive decline in women who already have Alzheimer's disease. Despite the existence somewhat controversial data from human studies experimental investigations in different animal models of neurodegenerative diseases have shown that estrogen is neuroprotective. Although estrogens are known to exert several direct effects on neurons, the cellular mechanisms involved in the neuroprotective effects of estrogen are still unclear. In this review we focus on the cellular mechanism of estrogen action in neuronal tissue.

### **1. Wstęp**

Wyniki badań klinicznych i epidemiologicznych pozwalają stwierdzić, że w przypadku wielu chorób neurologicznych ryzyko ich wystąpienia oraz przebieg różni się w zależności od płci. Różnice te dotyczą schorzeń układu nerwowego o różnej etiologii, między innymi związanej z zaburzeniami funkcjonowania systemu naczyniowego (udar), systemów neurotransmisyjnych (depresja), układu immunologicznego (stwardnienie rozsiane) oraz tych, o nieznanym patogenezie, jak w przypadku chorób neurodegeneracyjnych. Dotychczas nie udało się w pełni wyjaśnić przyczyn tego zjawiska, wydaje się jednak, iż w dużym stopniu można tłumaczyć je oddziaływaniem na układ nerwowy określonych hormonów płciowych, w szczególności estrogenów (E) oraz progestyn.

Do rodziny tych hormonów zalicza się  $17\beta$  estradiol ( $E_2$ ), wykazujący najsilniejsze działanie biologiczne oraz jego aktywne metabolity, charakteryzujące się

mniejszą aktywnością – estron ( $E_1$ ) oraz estriol ( $E_3$ ). Głównym miejscem syntezy E są gruczoły płciowe oraz w mniejszej mierze kora nadnerczy, skąd po związaniu się z białkami nośnikowymi we krwi, bądź też w postaci niezwiązanej, E docierają do organów docelowych, w tym i do mózgu. Ze względu na swój mały ciężar cząsteczkowy i właściwości lipofilne bez przeszkód przechodzą przez barierę krew–mózg (Samii i in. 1994, Pardridge i in. 1994). Obecność, w mózgach obu płci, aparatu enzymatycznego odpowiedzialnego za syntezę żeńskich hormonów steroidowych, pozwala na ich wytwarzanie *de novo* w obrębie ośrodkowego układu nerwowego (oun) (Carreau i in. 2002), co obserwuje się między innymi w okresie jego rozwoju. Wówczas E wraz z innymi czynnikami wzrostowymi, kontrolując procesy proliferacji, migracji i synaptogenezy, umożliwiają przeżycie oraz różnicowanie się wielu populacjom neuronów różnych struktur mózgowych (Beyer 1999, McEwen i in. 1999).

Badania eksperymentalne ostatnich lat pokazały również, iż E wykazują właściwości neuroprotektcyjne w stosunku do wielu grup neuronów, narażonych na działanie różnych czynników toksycznych, a także mają bezpośredni wpływ na uruchamianie złożonych procesów regeneracyjnych w uszkodzonym obszarze oun.

Pomimo prowadzenia licznych badań nad mechanizmami aktywności neuroprotektcyjnej E, wciąż wiele z jej aspektów pozostaje nieznanymi. Bliższe poznanie ról estrogenów w oun stwarza nadzieję na szerokie wprowadzanie tych hormonów do terapii wielu chorób układu nerwowego, zwiększając skuteczność ich leczenia. Niniejsza praca ma na celu przybliżenie istniejącej wiedzy na temat neuroprotektynnego działania E w kontekście chorób neurodegeneracyjnych.

## 2. Neurprotektyjne działanie estrogenów w chorobach neurodegeneracyjnych

### 2.1. *Badania kliniczne*

Badania epidemiologiczne pokazują, że choroba Alzheimera (chA) występuje nieco częściej u kobiet i że procentowy wzrost zachorowań w tej grupie zwiększa się wraz z wiekiem. Przy obecnym stanie wiedzy trudno jest jednoznacznie wskazać przyczyny obserwowanych różnic w zachorowaniu na chA. Stwierdza się jednak, iż znaczne obniżenie poziomu E u kobiet w okresie menopauzalnym może w istotny sposób przyczyniać się do nasilenia procesów zwyrodnieniowych w mózgu, prowadzących do rozwoju objawów chA. Wskazywałoby to, iż E stanowią jeden z ważniejszych czynników ochronnych przeciwdziałających rozwojowi tej choroby. W ciągu ostatnich lat przeprowadzono wiele badań klinicznych, w których próbowano określić skuteczność stosowania hormonalnej terapii zastępczej (HTZ) w obniżaniu ryzyka wystąpienia oraz łagodzenia objawów chA (Tang i in. 1996, Yaffe i in. 1998, Costa i in. 1999).

Badania prospektywne Hendersona wskazują, że zastosowanie HTZ u kobiet w okresie menopauzalnym, nie tylko obniża ryzyko wystąpienia, ale także prowadzi do podniesienia się wieku pojawienia się pierwszych objawów tej choroby. Wyniki tej pracy pokazały również, że zastosowanie HTZ u pacjentek ze

zdiagnozowaną chA, łagodzi objawy neuropsychologiczne obserwowane w przebiegu chA (Henderson i in. 1994).

Obserwacje epidemiologiczne wskazują na częstsze występowanie choroby Parkinsona (chP) u mężczyzn. Zauważono jednak monitorując dynamikę zmian chorobowych u kobiet z tzw. wczesną postacią choroby Parkinsona, że wejście tych chorych w okres menopauzy wiąże się z zaostrzeniem objawów wiodących chP. Zaburzenia te mogą być łagodzone przez zastosowanie u tych kobiet HTZ (Saunders-Pullman i in. 1999). Stosowanie HTZ, wydaje się być również pomocne w ograniczaniu niesprawności ruchowej u kobiet w zaawansowanym okresie tej choroby, w którym następuje zmniejszenie odpowiedzi na lewodopę i fluktuacje ruchowe (Sandyk i in. 1989). Sugeruje się, iż ryzyko wystąpienia chP wzrasta u kobiet, u których objawy menopauzy pojawiły się przed 46 rokiem życia, wymaga to jednak dalszych badań na większej grupie chorych.

Pozytywny efekt terapeutyczny HTZ uzyskano również u kobiet z chorobą Huntingtona (chH), polegał on na łagodzeniu różnych form zaburzeń ruchowych (Koller i in. 1982).

## 2.2. *Badania eksperymentalne in vitro*

Neuroprotektynny wpływ E wykazano wielokrotnie w licznych badaniach eksperymentalnych prowadzonych z zastosowaniem różnych systemów modelowych.

Wyniki badań prowadzonych w warunkach pierwotnych hodowli wielu populacji neuronów dowodzą, że E hamują mechanizmy neurodegeneracyjne wyzwalane przez dodane do podłoża hodowlanego, różne czynniki neurotoksyczne, indukujące między innymi zjawisko stresu oksydacyjnego, czy ekscytotoksyczności (Behl i in. 1995, Goodman i in. 1996).

Warto podkreślić, iż badania *in vitro* wykazały istnienie dużej elastyczności w doborze stężenia E, przy którym uzyskiwany jest istotny efekt neuroprotektynny. Skuteczność działania E wykazano przy bardzo niskich stężeniach w zakresie 0,1–30 nM, jak również stosując wysokie stężenia rzędu 50–100  $\mu$ M (Behl i in. 1997). Istotny wpływ na poziom zastosowanej dawki hormonu może mieć rodzaj populacji neuronów stosowanych w doświadczeniu. Okazuje się bowiem, że neurony cechuje różna wrażliwość na działanie E. Zjawisko to można tłumaczyć mechanizmami leżącymi u podstaw ochronnego działania E. Wykazano, że aktywność neuroprotektynna E zależy w dużej mierze od wiązania się ich z obecnymi w mózgu, jądrowymi receptorami estrogenowymi (ER). Zaobserwowano, że w różnych strukturach mózgu istnieje różnica w gęstości tych receptorów (Don Carlos i in. 1991), stąd neurony ubogie w ER mogą wymagać stosowania większych stężeń E.

Wpływ na efektywność działania E mogą mieć również warunki prowadzenia hodowli. Stwierdzono, iż obecność w podłożu hodowlanym czynników neurotroficznych, czy związków o silnych właściwościach antyoksydacyjnych, (np. zredukowanego glutationu) potęguje właściwości protekcyjne estrogenów (Gollapudi i in. 1999).

Istotny, w uzyskaniu skuteczności działania neuroprotektynnego E w warunkach *in vitro*, wydaje się również czas podania hormonów. Wykazano, że E wy-

kazują silne działanie neuroprotekcyjne wówczas, kiedy podawane są przed lub jednocześnie ze związkami indukującymi procesy neurotoksyczne. Aktywność neuroprotekcyjna E znacznie słabnie w stosunku do neuronów, w których doszło do rozwoju procesów prowadzących do degeneracji komórki. Dotychczas nie są znane przyczyny tego zjawiska.

### **2.3. Badania eksperymentalne *in vivo***

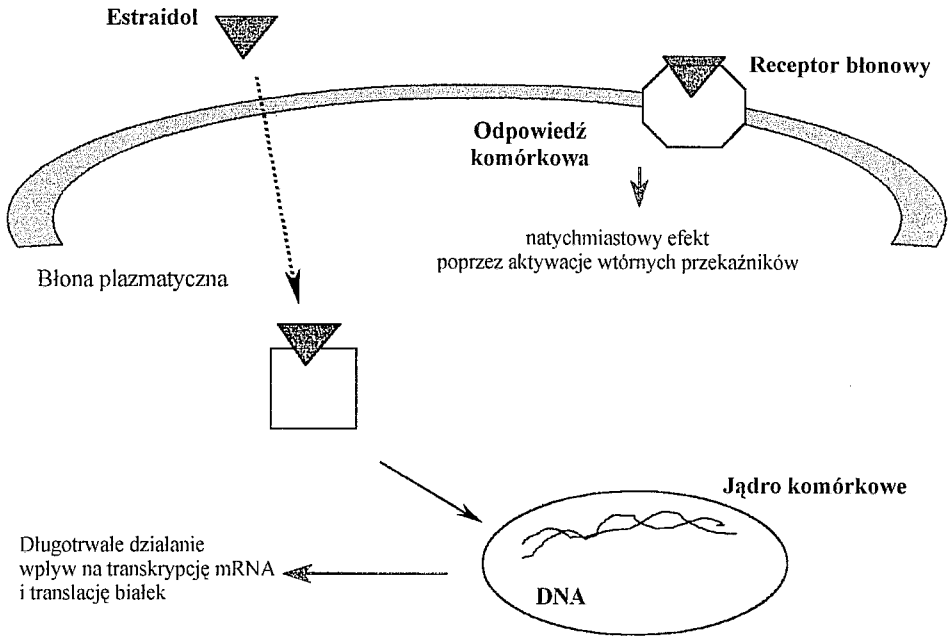
Opracowując zwierzęce modele chorób neurodegeneracyjnych zauważono, że istnieją, oprócz międzygatunkowych, różnice w skuteczności działania niektórych neurotoksyn w zależności od płci zwierzęcia poddanego intoksykacji. U samic zmiany zwyrodnieniowe, zachodzące w ośrodku po podaniu neurotoksyn, mają najczęściej znacznie łagodniejszy charakter niż u samców (Miller i in. 1998). Należy jednak dodać, że u samic obserwuje się zmienną wrażliwość na działanie neurotoksyn w zależności od fazy cyklu estralnego, w jakim znajduje się zwierzę w czasie intoksykacji. Stwierdzono między innymi u szczurów, iż wysoki poziom E2 w surowicy samic, obserwowany w fazie proestrus (200 pg/ml), powoduje znikomy ubytek neuronów w jądrze przegrody po podaniu kwasu kainowego, znacznie większy efekt neurotoksyczny wywierają iniekcje kwasu kainowego w fazie estrus (niski poziom E2 – 15 pg/ml) (Azcoitia i in. 1999).

Wyniki tych badań wskazują, iż E obecne w mózgu stanowią ważny czynnik ograniczający stopień degeneracji neuronów. W celu lepszego poznania mechanizmów neuroprotekcyjnego działania E, w ostatnich latach prowadzi się liczne badania na modelach chorób neurodegeneracyjnych, gdzie zwierzęta poddaje się działaniu egzogennych hormonów steroidowych. Prace Dłużena i wsp., prowadzone na modelu chP, wywołanym podaniem związku 1-metylo-4-fenilo-1,2,3,6-tetrahydropirydyny (MPTP), wykazały, iż podanie samicom po gonadotomii 17 $\beta$  estradiolu przed intoksykacją MPTP, powodowało zmniejszenie stopnia uszkodzenia neuronów dopaminergicznego szlaku nigro-striatalnego (Dłużen i in. 1996a, 1996b). Podanie E samicom małp prowadziło także do łagodzenia, wywoływanych iniekcją MPTP, zaburzeń behawioralnych występujących w formie różnych typów dyskinez (Gomez-Mancilla i Bedard 1992).

Neuroprotekcyjne działanie E w zwierzęcych modelach chorób neurodegeneracyjnych wykazano również u samców. Podanie wykastrowanym samcom E2 przed iniekcją MPTP powodowało znamiennej redukcję zmian zwyrodnieniowych w układzie nigro-striatalnym, wywołanych działaniem MPTP, czego nie obserwowano po podaniu tym zwierzętom hormonów androgenowych – testosteronu i dihydrotestosteronu (Dłużen i in. 1996, Grandbois i in. 1999).

### **3. Koncepcje neuroprotekcyjnego działania estrogenów**

Liczne badania prowadzone w celu określenia mechanizmów molekularnych neuroprotekcyjnego działania E, znacząco rozszerzyły wiedzę na ten temat, ciągle jednak jesteśmy daleko od stworzenia spójnego modelu opisującego kaskadę



Rysunek 1. Drogi działania estrogenów: klasyczny mechanizm poprzez receptory jądrowe, mechanizm związany z receptorami błonowymi

wielu procesów leżących u jego podłoża. Wiadomo, iż w niektórych przypadkach działanie to może być związane ze strukturą chemiczną E, która nadaje tym molekułom właściwości antyoksydacyjne. Efekt neuroprotekcynny, może być również wynikiem łączenia się E ze swoistymi jądrowymi receptorami estrogenowymi (ER), lub, jak pokazują najnowsze badania ze swoistymi receptorami błonowymi (rys. 1).

### 3.1. Klasyczne receptory estrogenowe

O funkcji ER w uruchamianiu mechanizmów, prowadzących do neuroprotekcji, świadczą wyniki badań *in vitro*, gdzie wykazano między innymi, iż zastosowanie antagonisty ER – ICI 182, 780, blokuje neuroprotekcynne działanie E2, wykazywane w stosunku do neuronów hipokampalnych, poddanych neurotoksycznemu działaniu kwasu kainowego (Azcotia i in. 1999).

Przez długi czas uważano, że E łączą się z jednym rodzajem receptora estrogenowego – nazwanego obecnie ER $\alpha$ , w odróżnieniu od odkrytego niedawno nowego typu receptora estrogenowego – ER $\beta$  (Mangelsdorf i in. 1995, Beato i in. 1996, Kuiper i in. 1996). Poznanie dokładnej budowy ER $\beta$ , pozwoliło stwierdzić, iż receptor ten nie jest izofomą ER $\alpha$ , lecz odmiennym białkiem kodowanym przez inny gen (Enmark i in. 1997, Chu i in. 1997). Oba typy ER zlokalizowano w wielu obszarach mózgu, między innymi: w strukturach układu limbicznego, obszarach korowych, głównie w warstwie V i VI płata skroniowego, a także w obrębie kory entorynalnej i układzie czarno – prążkowiowym (Li i in. 1997, Küppers i in. 1999).

Ekspresję ER wykazano również w obwodowym układzie nerwowym, mianowicie w zwojach rdzenia kręgowego (Taleghany i in. 1999).

Receptory estrogenowe należą do dużej grupy czynników transkrypcyjnych (Beato i Klug 2000). Naturalnymi ligandami dla ER są  $17\beta$  estradiol, estron i estriol. Nie związane z hormonem ER znajdują się w jądrze komórkowym (głównie  $ER\alpha$ ), a także w cytoplazmie (głównie  $ER\beta$ ). ER utrzymywane są w stanie nieaktywnym, poprzez połączenie z dużym kompleksem białek opiekuńczych z rodziny Hsp (Pratt i in. 1997). Uważa się, iż białka HSP stabilizują konformację ER i utrzymują ich zdolność do połączenia się z ligandem w czasie działania czynników uszkodzających komórkę (Marin i in. 2001).

Pobudzone ER przyłączają się do odpowiedniego fragmentu DNA, zwanego – elementem odpowiadającym na estrogen (ERE). Odcinki ERE zlokalizowano w regionach promotorowych wielu genów, niezbędnych do utrzymywania prawidłowego funkcjonowania mózgu, między innymi: acetylotransferazy choline (Miller i in. 1999), preproenkefalin (Zhu i in. 1995), receptora adrenergicznego (Lee i in. 1998), somatostatyny (Xu i in. 1998), mózgowo pochodnego czynnika neuroficznego (BDNF) (Sohrabij i in. 1995), kwaśnego włókninkowego białka gleju (GFAP) (Stone i in. 1998), białek z rodziny Bcl-2 (Teixeira i in. 1995). Dotychczas jednak, nie udało się określić grupy genów, których ekspresja zależałaby wyłącznie od aktywności receptora  $ER\beta$  lub  $ER\alpha$ . Odkrycie nowych syntetycznych agonistów lub antagonistów izoform ER, może znacząco poszerzyć wiedzę na temat spodziewanej odmiennej aktywności transkrypcyjnej  $ER\beta$  i  $ER\alpha$ . Aktywność ta może być wynikiem oddziaływania ER z innymi czynnikami i koaktywatorami transkrypcji obecnymi w jądrze komórkowym. Poznanie natury tych oddziaływań, powinno przyczynić się do lepszego poznania mechanizmów związanych z transdukcją sygnału inicjowaną dysocjacją steroidu do komórki. Co więcej, poznanie zależności pomiędzy ER, a innymi czynnikami transkrypcyjnymi dawałoby możliwość ingerencji w mechanizmy tych zależności, która mogłaby zaowocować zwiększeniem aktywności neuroprotektynowego działania E.

### 3.1.1. Rola klasycznych ER w procesach neuroprotektynowych

Estrogeny, poprzez oddziaływanie z ER, mogą selektywnie wpływać na różne populacje neuronów. Ingerencja E w wiele szlaków metabolicznych tych komórek, powoduje zmianę ich wrażliwości na działanie czynników indukujących degenerację, zwiększając przez to szansę przeżycia tych komórek, a w późniejszym okresie doprowadzając również do ich częściowej regeneracji.

Apoptoza, odgrywająca prawdopodobnie dominującą rolę w procesie neurodegeneracji, wymaga uruchomienia programu genetycznego prowadzącego do syntezy wielu białek, tworzących rodzinę białek Bcl-2, które kontrolują przebieg tego procesu. W skład tej rodziny wchodzi zarówno inhibitory procesu apoptozy – Bcl-2, Bcl-XL, jak i białka proapoptotyczne – Bax, Bad. Badania *in vitro* i *in vivo* pokazują, iż E2 powoduje wzrost ekspresji białek Bcl-2, jak i Bcl-XL, chroniąc w ten sposób neurony przed śmiercią przez apoptozę (Singer i in. 1998, Gollapudi i in. 1999, Stoltzner i in. 2001). Estrogeny wpływają na poziom ekspresji

tych białek w sposób bezpośredni, poprzez przyłączenia się zaktywowanego receptora estrogenowego a lub  $\beta$  do sekwencji ERE, obecnych w promotorze genu *bcl-2*, bądź też w sposób pośredni między innymi przez hamowanie ekspresji inhibitorów białek Bcl-2 i Bcl-XL, takich jak – białko Nip-2 (Garnier i in. 1997, Vegeto i in. 1999). Pojawienie się, między innymi w wyniku aktywności E2, zwiększonej puli białek Bcl-2 i Bcl-XL w degenerującym neuronie, wyzwala procesy, które promują przeżycie takiej komórki (Singer i in. 1999, Pike 1999). Wykazano, iż białko Bcl-2 powoduje redukcję stresu oksydacyjnego, jest ono również zaangażowane w proces neuroregeneracji (Chen i in. 1997, Bogdanov i in. 1999).

Estrogeny indukują również ekspresję innych substancji wzmagających procesy kompensacji morfologicznej w uszkodzonym neuronie. Jedną z nich jest białko GAP-43 sterujące procesem wydłużania i ukierunkowania aksonu, przyczyniając się w ten sposób do wytworzenia prawidłowych połączeń nerwowych. E2 powoduje wzrost ekspresji białka GAP-43, co wykazano między innymi u 24 miesięcznych szczurów, u których wraz z wiekiem dochodzi do obniżenia poziomu GAP-43 w mózgu (Singer i in. 1996).

Zasadniczym elementem, na który wywierają wpływ białka regulujące procesy wydłużania się aksonu, jest grupa białek cytoszkieletu neuronu. Zaobserwowano, iż E2 wpływa na ekspresję niektórych białek z tej grupy, między innymi powoduje wzrost poziomu białka tau, którego zadaniem jest ułatwianie tworzenia się i stabilizacja struktur cytoszkieletu (Lorenzo i in. 1992).

### ***3.2. Neuroprotektyny mechanizm działania estrogenów poprzez oddziaływanie z receptorami błonowymi***

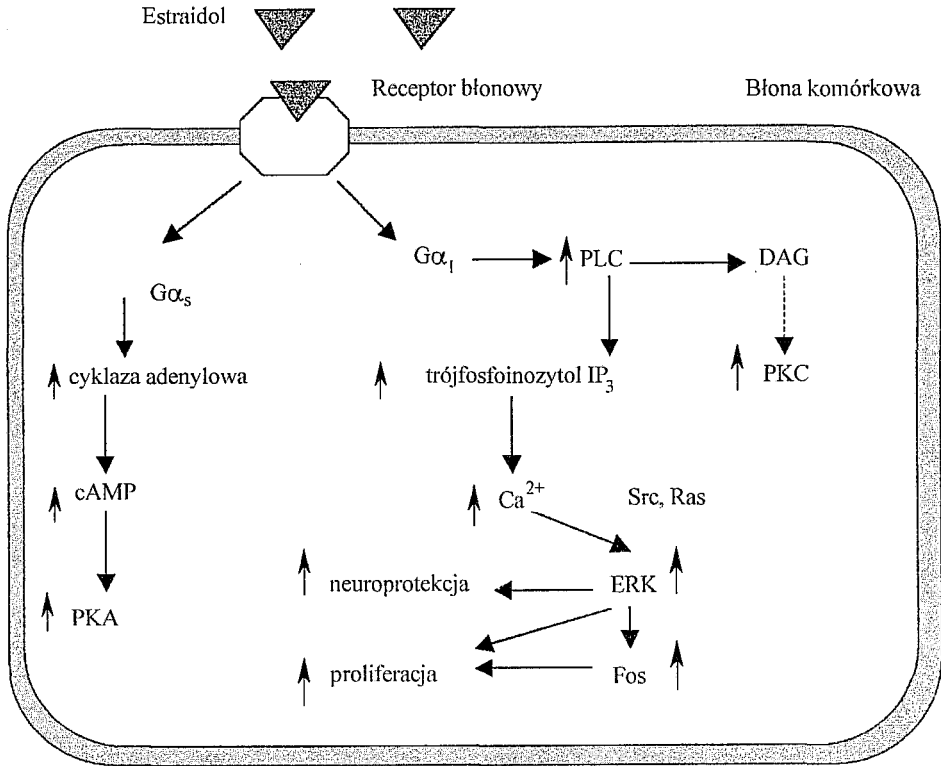
Pierwsze wzmianki na temat receptorów błonowych dla estrogenów (pmER) pojawiły się w 1977 r. (Pietras i Szego 1977). Od tamtej pory ukazało się wiele doniesień na temat pmER jako alternatywnego mechanizmu działania estrogenów (Pietras i Szego 1980, Bruce i in. 1999, Beato i Klug 2000, Kelly i Levin 2001). Istnieje wiele danych doświadczalnych potwierdzających obecność pmER (Green i in. 1997, Green i in. 1998, Razandi 1999, Powell 2001), jednakże próby izolacji tych receptorów nie zakończyły się powodzeniem.

#### **3.2.1. Mechanizm działania pmER**

Estrogeny działając w komórkach docelowych poprzez mechanizm związany z aktywacją receptorów błonowych, wywołują efekt w bardzo krótkim czasie – w ciągu kilku sekund czy minut. Inicjują aktywację białek G, mogących otwierać lub zamykać kanały jonowe, aktywują kaskadę wtórnych przekaźników, wpływają na fosforylację białek, modyfikują wewnątrzkomórkowy poziom wapnia, a także wykazują właściwości antyoksydacyjne (Watters i in. 1997, Kelly i Wagner 1999, Singh i in. 1999, Kelly i Levin 2001) (rys. 2).

#### **3.2.2. Wpływ estrogenów na ekscytotoksyczność**

Ekscytotoksyczność związana z nadmiernym uwolnieniem glutaminianu i aktywacją receptorów NMDA występuje m. in. w chorobie Parkinsona, Alzheimer,



Rysunek 2. Transdukcja sygnału w komórce wywołana przez aktywację receptora błonowego pmER

Gα – heterodimerskie białka G, cAMP – cykliczny monofosforan, PKA – kinaza białkowa A, PLC – fosfolipaza C, DAG – diacyloglicerol, PKC – kinaza białkowa C, IP<sub>3</sub> – trójfosfoinozytol, Ca<sup>2+</sup> – wapń, ERK – kinazy. Estrogeny wiążąc się z receptorem błonowym aktywują białka G. Hetotimerskie białka G składają się z podjednostek: α(39–46 kDa), β(37 kDa) γ(8 kDa). Podjednostki te są ze sobą połączone gdy białko G występuje w formie nieaktywnej. Estrogeny, działając na receptor błonowy dokonują zmiany konformacji białka G, co powoduje uwolnienie GDP, a przyłączenie GTP. Białko G przechodzi w postać aktywną. E2 wiążąc się z receptorem błonowym aktywuje białko Gs. Aktywacji ulega następnie cyklaza adenylowa (AC), która powoduje wytworzenie cAMP z ATP. cAMP pobudza kinazę białkową A (PKA) mającą zdolności fosforylowania białek komórkowych i zmianę ich funkcji.

Oprócz stymulacji AC po pobudzeniu białka Gs następuje otwarcie kanału wapniowego napięciowo zależnego. Aktywna PKA fosforylując białka kanału wapniowego pełni rolę czynnika przedłużającego otwarcie kanału.

E2 wiążąc się z pmER może również aktywować białko Gq. Białko to pobudza fosfolipazę C (PLC). Rozkłada ona jeden z fosfolipidów błony komórkowej – fosfatydyloinozytol-4,5-difosforan (PIP<sub>2</sub>) na DAG i IP<sub>3</sub>.

IP<sub>3</sub> uwalnia Ca<sup>2+</sup> z siateczki śródplazmatycznej (ER), która posiada specjalny receptor dla IP<sub>3</sub>. Ca<sup>2+</sup> jest uwalnianie pulsami z reticulum endoplazmatycznego. Wapń powoduje aktywację swoistych kinaz zależnych od kompleksu Ca<sup>2+</sup> – kalmodulina. Kinazy te również modyfikują substraty poprzez co zmieniają reakcje fizjologiczne. DAG aktywuje kinazę białkową C (PKC), która na zasadzie sprzężenia zwrotnego ujemnego kontroluje wytwarzanie IP<sub>3</sub> i DAG. Substratem dla PKC jest fosfataza IP<sub>3</sub> defosforylująca IP<sub>3</sub> do IP<sub>2</sub>. Nasilenie degradacji IP<sub>3</sub> prowadzi do skrócenia procesu uwalniania wapnia z siateczki wewnątrzplazmatycznej. PKC jest również związana z kanałami wapniowymi – powoduje ich zamykanie. W wyniku tego napływ Ca<sup>2+</sup> do komórki jest osłabiony.

Wapń i diacyloglicerol aktywujące PKC mogą stymulować syntezę białka Fos i Jun.



Huntingtona, udarze (Lipton S.A. i Rosenberg P.A., 1994). Mechanizm toksycznego działania glutamianu polega na otwarciu kanałów wapniowych, silnym dokomórkowym napływie wapnia (Choi 1985, Choi 1987) i aktywacji wapniozależnych enzymów (fosfolipazy, lipazy, endonukleazy, syntazy tlenu azotu (Dawson V.L. i in. 1993)) oraz rozwoju stresu oksydacyjnego i produkcji toksycznych wolnych rodników (Choi 1992).

Estrogeny mogą wywierać efekt neuroprotekcyny poprzez interakcje z receptorami NMDA czy (i) AMPA/kainowymi. E2 działa jako antagonist receptoru NMDA (Weaver i in. 1997) – nie dopuszczając do jego aktywacji blokuje napływ wapnia do komórki (Mermelstein i in. 1996). Efekt pojawia się szybko w ciągu kilku sekund po podaniu E2 i szybko zanika (Mermelstein i in. 1996).

Istnieją jednakże doniesienia na temat przeciwstawnych efektów E2, w których zwiększa on aktywację receptorów NMDA (Weiland 1992). Te rozbieżne wyniki zależą od stopnia glutaminergicznej aktywacji. W obecności fizjologicznych stężeń glutamianu E2 aktywuje receptory. W sytuacji nadmiernego uwolnienia i stężenia glutamianu E2 daje efekt odwrotny, działając protekcyjnie na neurony – osłabia aktywację receptorów glutaminergicznych i nie dopuszcza do napływu wapnia do komórki.

### 3.2.3. Wpływ estrogenów na stres oksydacyjny

Stres oksydacyjny związany jest z cytotoksycznym działaniem wolnych rodników tlenowych ( $O^-$ ), hydroksylovych ( $OH^-$ ) i peroksynitrowych (ONOO). Wysoka reaktywność tych związków wynika z obecności niesparowanego elektronu i wiąże się z silnymi właściwościami utleniającymi. Utlenieniu ulegają lipidy i białka błon komórkowych (degradacja błon) oraz dochodzi do uszkodzenia DNA, co prowadzi do śmierci komórki. Estrogeny są uznane jako antyoksydanty – hamują stres oksydacyjny (Mooradian 1993, Behl i in. 1995, Goodman i in. 1996, Behl i in. 1997, Keller i in. 1997) Antyoksydacyjne właściwości E dotyczą zarówno  $17\beta$ -estradiolu, jak i nie wykazującego działania fizjologicznego steroizomeru –  $17\alpha$ -estradiolu (Behl i in. 1995, Behl i in. 1997, Bonnefont i in. 1998). Wynikają one z obecności ugrupowania hydroksylovowego w pozycji C3 pierścienia A w steroidowej strukturze tego związku (Behl i in. 1995, Green i in. 1997, Behl i in. 1997, Grenn i in. 1998). Nie są one znoszone przez antagonistów receptorów jądrowych dla E – co świadczy o tym, iż antyoksydacyjne działanie E2 nie wynika z jego działania poprzez mechanizm związany z receptorami jądrowymi.

Właściwości antyoksydacyjne E2 są silnie wzmocnione poprzez obecność w komórce zredukowanej formy glutationu – odpowiedzialnej za unieczynnianie wolnych rodników. Niewielkie wówczas stężenia E2 rzędu 1 nM mają właściwości antyoksydacyjne (Gridley i in. 1998). Neurony dopaminergiczne są obficie zaopatrzone w glutation (Ambani LM, 1975) w porównaniu z pozostałymi neuronami, dlatego nawet w niskim fizjologicznym stężeniu E2 działa na nie protekcyjnie. Wykazano, iż w chorobie Parkinsona poziom zredukowanego glutationu jest obniżony, szczególnie w neuronach dopaminergicznych istoty czarnej (Kish i in. 1985). W tym wypadku antyoksydacyjne właściwości E2 są słabsze.

### 3.3. Interakcja pomiędzy estrogenami a czynnikami neurotroficznymi

Jak wynika z dotychczas przytoczonych wyników badań, E występujące w mózgu, jawią się jako związki o silnym działaniu neurobiologicznym ukierunkowanym między innymi na neuroprotekcję. Jednak funkcja i przeżycie neuronów zależy w równym, jeśli nie większym, stopniu od obecności w mózgu określonych czynników wzrostu – neurotrofin. Czynniki wzrostu podobnie, jak E, stwarzają warunki do prawidłowego rozwoju układu nerwowego w stanie fizjologicznym, jak i do regeneracji neuronów w stanie neuropatologicznym. Wydaje się iż, synergiczne działanie tych dwóch grup związków w oun, może kreować złożoną sieć interakcji między nimi.

Wyniki licznych badań pokazują, że w wielu rejonach mózgu E regulują poziom ekspresji czynników troficznycch oraz ich swoistych receptorów Trk (tyrosine kinase – containing receptor) (Singh i in. 1995, Gibbs i in. 1999). Neurotfiny również wykazują aktywność regulacyjną w stosunku do E i ER (Miranda i in. 1996). Proces koregulacyjny może odbywać się poprzez interakcję międzykomórkową lub zachodzi na poziomie jednej komórki, która posiada zarówno receptory dla E, jak i dla czynników troficznycch. Kolokalizacja ER i Trk jest zjawiskiem charakterystycznym dla wielu obszarów mózgu (Toran-Allerand i in. 1992, Toran-Allerand 1996).

Receptor Trk po związaniu się z ligandem wyzwała kaskadę procesów biochemicznych prowadzących do fosforylacji i aktywacji kinaz MAP (ang. mitogen-activated protein kinase), co prowadzi do indukcji ekspresji czynników transkrypcyjnych między innymi AP-1 i AP-2, biorących udział w regulacji ekspresji genów o istotnym znaczeniu dla prawidłowego funkcjonowania neuronów. Podobny system transdukcji sygnału wykorzystuje pobudzony błonowy ER. Współobecność obu typów receptorów w jednej komórce nerwowej może prowadzić do integracji procesów przekazywania informacji. Zaobserwowano *in vitro*, iż E2 posiada zdolność do aktywacji kinazy tyrozynowej i swoistych dla niej szlaków sygnalizacyjnych w neuronach korowych, aktywacja ta utrzymywała się również w obecności antagonisty receptora ER – związku ICI 182, 780, co wskazuje na bezpośrednie oddziaływanie E2 z receptorem Trk, bez pośrednictwa ER (Singer i in. 1999, Singh i in. 1999).

Kolokalizacja swoistych receptorów dla E i czynników wzrostowych, obserwowana w różnych populacjach neuronów, może mieć istotne znaczenie dla aktywności neuroprotekccyjnej tych związków. Wykazano, iż zastosowanie antagonisty receptora IGF-I – JB1 znosiło neuroprotekccyjny wpływ E2 w modelu degeneracji neuronów hipokampalnych. Podobnie zastosowanie w tym modelu, antagonisty ER – ICI 182, 780 blokowało ochronne działanie IGF-I. Doświadczenie to pokazało, iż aktywność neuroprotekccyjna E, jak i IGF-I, zależy od obecności w miejscu działania neurotoksyny, zdolnych do pobudzenia receptorów IGF I oraz E (Azcotia i in. 1999).

Poznanie molekularnych mechanizmów interakcji pomiędzy E a czynnikami troficznymi, stwarzałoby duże możliwości regulacyjne, zwłaszcza w postaci integracji informacji, pochodzącej zarówno od hormonów, jak i neurotrofin. Mogłoby

to umożliwić reorganizację funkcjonowania neuronu i zwiększenie jego potencjału regeneracyjnego.

### 3.4. *Oddziaływanie estrogenów na komórki glejowe*

Potencjalny mechanizm działania ochronnego E w przypadku chorób neurodegeneracyjnych dotyczy zarówno neuronów, jak i komórek glejowych.

Wiadomo, iż w toku rozwijającej się patologii, prowadzącej do degeneracji neuronów dochodzi do reakcji mikrogleju i astrocytów. Aktywacja komórek glejowych w miejscu uszkodzenia mózgu, wiąże się z ich restrukturyzacją morfologiczną oraz pobudzeniem ich aktywności wydzielniczej. Zmiany te prowadzą do indukcji, bądź znacznego wzmocnienia syntezy różnorodnych białek, między innymi chemokin i cytokin (Aisen i Davis 1994). Wynikiem działania tych białek jest nasilenie procesu reaktywnej glejozy, napływ leukocytów z krwi obwodowej i rozwój lokalnej reakcji zapalnej, która prawdopodobnie przyczynia się do wzrostu uszkodzenia mózgu (McGreer i in. 1996, Kurkowska-Jastrzębska i in. 1999).

Właściwości przeciwzapalne E, to kolejny element obrazu przedstawiającego złożone mechanizmy, leżące u podłoża neuroprotektoryjnego działania tych hormonów. Obecność ER, głównie ER $\beta$  w gleju, powoduje, iż E wpływają na funkcję tych komórek (Langub i in. 1992, Melcangii in. 1999). Badania *in vitro* Gantera pokazały, iż E2 może blokować aktywację i proliferację mikrogleju (Ganter i in. 1992). Estrogeny redukują również proces astroglejozy, inicjowany po uszkodzeniu mózgu, co wykazano w badaniach *in vivo* zarówno u samic, jak i samców. Zmniejszenie reaktywności komórek glejowych przez E może odbywać się między innymi poprzez hamujący wpływ tych hormonów na ekspresję czynników transkrypcyjnych, takich jak NF- $\kappa$ B, które indukują wytwarzanie wielu mediatorów odpowiedzi zapalnej, w tym cytokin pro-zapalnych odgrywających znaczącą rolę w utrzymywaniu odczynu glejowego (Dodel i in. 1999, Drew i Chavis 2000).

Poza obniżaniem poziomu czynników reakcji zapalnej w aktywowanym gleju, E mogą nasilać w tych komórkach ekspresję czynników wzrostu i neurotrofin, przyczyniając się w ten sposób do podjęcia przez glej czynności troficznej i regeneracyjnej w miejscu uszkodzenia mózgu.

Ostatnio przeprowadzone badania sugerują, iż tkanka glejowa nie tylko jest jednym z docelowych miejsc działania hormonów steroidowych, lecz dzięki ekspresji aromatazy sama może być ich źródłem w oun. Wykazano, że w miejscu uszkodzenia mózgu, astrocyty zaczynają syntetyzować aromatazę, powodując lokalny wzrost estrogenów (Garcia-Segura i in. 1999). Przypuszcza się, iż może być to jeden z ważniejszych mechanizmów wykorzystywanych, prawdopodobnie bez względu na płeć, przez mózg, w zmaganiu się z toczącymi się w jego obrębie procesami zwyrodnieniowymi.

### 3.5. *Związek między apolipoproteiną E a estrogenami*

Apolipoproteiny E (ApoE) stanowią główną frakcję białek Apo w mózgu, które pełnią ważną rolę między innymi w transporcie lipidów, procesie tworzenia wypustek aksonalnych i utrzymywaniu homeostazy synaptycznej, a także

ochronie komórek nerwowych przed stresem oksydacyjnym (Pitas i in. 1987, Fagan i in. 1996, Keller i in. 2000). Badania eksperymentalne pokazały, iż u zwierząt z brakiem zdolności ekspresji *apoE* obserwuje się większy stopień uszkodzeń mózgu po ischemii, w porównaniu do zwierząt z normalną ekspresją tego genu (Laskowitz i in. 1997). Co więcej, udowodniono, iż w następstwie uszkodzenia tkanki nerwowej (Le Blanck i in. 1990, Poirier 1994, Stone i in. 1998.). Wyniki tych badań wskazują na istotną rolę ApoE w przebiegu procesów neuroregeneracyjnych.

W momencie wykrycia obecności ApoE w płytkach starczych oraz w naczyniowych złogach amyloidowych powiązано zwiększone ryzyko zachorowania na chA z profilem występowania określonych alleli genu *apoE* w populacji (Strittmatter i Roses 1996, Welsh-Bohmer i in. 1997). U człowieka Apo E występuje w postaci 3 izoform: E2, E3, E4, kodowanych przez trzy allele genu *apoE*: e2, e3, e4. Stwierdzono, iż ryzyko wystąpienia późnej postaci chA wzrasta u nosicieli allelu e4. Prawdopodobnie obecność izoformy E4, może wiązać się z obniżeniem frakcji ApoE w mózgu (Bertrand i in. 1995), przez co może dochodzić do zwiększenia podatności neuronów cholinergiczných na toksyczne działanie b amyloidu.

Badania Tanga pokazały, iż u kobiet, które są nosicielkami allelu e4 w genie *apoE*, stosowanie HTZ w okresie menopauzalnym istotnie obniża ryzyko wystąpienia u nich objawów chA (Tang i in. 1996). Badania *in vivo* i *in vitro* wykazały, iż E2 zwiększa ekspresję ApoE w komórkach mikroglejowych i astrocytarných, co wskazuje, iż może być to jeden z mechanizmów wykorzystywanych przez E w ich aktywności neuroprotektcyjnej (Stone i in. 1997).

Badania nad podłożem genetycznym chA doprowadziły do ujawnienia efektu nałożenia się wpływu polimorfizmu genu *apo E* i polimorfizmu występującego w genie dla ER $\alpha$ , na ryzyko wystąpienia chA. Przeprowadzona analiza restrykcyjna pozwoliła na zidentyfikowanie w genie *er $\alpha$*  czterech alleli: P, p i X, x. Badania epidemiologiczne pokazują, iż ryzyko wystąpienia chA wzrasta siedmiokrotnie u osób homozygotycznych z genotypem ApoE: 4/4 oraz ER $\alpha$ : PP, XX (Brandi i in. 1999). Obecnie nie wiadomo, jaki wpływ wywiera posiadanie takiego genotypu, na procesy patofizjologiczne toczące się w mózgu osób z chA, odkrycie to zwiększa możliwości przewidywania ryzyka wystąpienia tej choroby.

### 3.6. Wpływ estrogenów na systemy neurotransmisyjne w mózgu

Wyniki licznych badań pokazały, iż E mogą kompensować deficyt specyficznych neurotransmiterów w mózgu, powstający na skutek postępującego zwyrodnienia grup neuronów, stanowiącego podstawowe podłoże patologiczne chorób neurodegeneracyjnych.

Obecność w neuronach dopaminergiczných układu czarno-prądkowatego ER $\alpha$  i ER $\beta$  (Küppers i Beyer 1999, Gundlach i in. 2000) powoduje, iż E mogą w bezpośredni sposób oddziaływać na ich funkcję, poprzez stymulację syntezy DA w neuronach dopaminergiczných, a także zwiększanie stopnia uwalniania DA z zakończeń presynaptycznych w prądkowiu. Dodatkowo E mogą modulować

transmisję dopaminergiczną, między innymi poprzez zmniejszenie aktywności autoreceptorów dopaminergicznych (głównie  $D_2$ ), co wiąże się z wzmocnieniem uwalniania DA do szczeliny synaptycznej (Di Paolo i in. 1982, Gordon i in. 1983, Becker i in. 1986, Pasqualini i in. 1995).

Estrogeny mogą regulować pracę innych systemów neurotransmisyjnych między innymi serotonergicznego i cholinergicznego, których uszkodzenia w przebiegu chP czy chA, powodują szeroko pojęte zaburzenia psychiczne obserwowane w trakcie trwania tych chorób (Sumner i in. 1998).

Oddziaływanie E na wymienione wyżej szlaki neuroprzekaźnikowe jest prawdopodobnie jedną z przyczyn poprawy sprawności neuropsychologicznej obserwowanej u kobiet ze zdiagnozowaną chP, czy chA, u których zastosowano HTZ.

### 3.7. Uwagi końcowe

Ostatnio opublikowane wyniki badań klinicznych, przeprowadzonych niezależnie przez zespoły Hendersona i Mulnarda pokazują, iż stosowanie terapii estrogenowej przez 4–16 tygodni (badanie Hendersona), bądź przez rok (badanie Mulnarda) u kobiet z chA, nie powoduje u nich zahamowania progresji procesów otępiennych (Henderson i in. 2000, Mulnard i in. 2000)

Brak jednoznacznych wyników badań klinicznych, prowadzonych nad zastosowaniem estrogenów w przebiegu chorób neurodegeneracyjnych, skłania do poszukiwania źródeł tych rozbieżności. Z pewnością do ich wskazania przyczyni się, prowadzenie eksperymentalnych badań nad złożoną strukturą oddziaływań E w procesach fizjologii, jak i patologii oun. Uzyskana wiedza powinna być pomocna przy wskazaniu terapeutycznej dawki hormonu, jak również optymalnego czasu i sposobu podawania E, co prawdopodobnie zwiększyłoby skuteczność neuroprotekcyjnego działania E w warunkach klinicznych.

## Piśmiennictwo

- Aisen PS, Davis KL (1994) Inflammatory mechanisms in Alzheimer disease: implications for therapy. *Am J Psychiatry*, 151: 1105–1013
- Ambani LM, Van Woert MH, Murphy S (1975) Brain peroxidase and catalase in Parkinson disease. *Arch Neurol*, 32:114–118
- Azcoitia I, Fernandez-Galaz MC, Sierra A i in. (1999) Gonadal hormones affect neuronal vulnerability to excitotoxin-induced degeneration. *J Neurocytol*, 28: 699–710
- Azcoitia I, Sierra A, Garcia-Segura LM (1999) Neuroprotective effects of estradiol in the adult rat hippocampus: interaction with insulin-like growth factor-I signaling. *J Neurosci Res*, 58: 815–822
- Beato M, Chavez S, Truss M (1996): Transcriptional regulation by steroid hormones. *Steroids*, 61: 240–251
- Beato M, Klug J (2000) Steroid hormone receptors: an update. *Hum. Reprod. Update*, 6: 225–236
- Becker JB, Beer ME (1986) The influence of estrogen on nigrostratal dopamine activity: Behavioral and neurochemical evidence for both pre- and postsynaptic components. *Behavioral Brain Research*, 19: 27–33
- Behl C, Skutella T, Lezoualc'h F i in. (1997) Neuroprotection against oxidative stress by estrogens: structure-activity relationship. *Mol Pharmacol*, 51: 535–541

- Behl C, Widmann M, Trapp T, Holsboer F (1995) 17-beta estradiol protects neurons from oxidative stress-induced cell death in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, 216: 473–482
- Behl C, Widmann M, Trapp T, Holsboer F (1995) 17 $\beta$ -Estradiol protects neurons from oxidative stress-induced cell death in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, 216:473–482
- Bertrand P, Poirier J, Oda T i in. (1995) Association of apolipoprotein E genotype with brain levels of apolipoprotein E and apolipoprotein J (clusterin) in Alzheimer's disease. *Brain Res Mol Brain Res*, 33: 174–178
- Beyer C (1999) Estrogen and the developing mammalian brain: *Anat Embryol (Berl)*, 199: 379–390
- Bogdanov MB, Ferrante RJ, Mueller G i in. (1999) Oxidative stress is attenuated in mice overexpressing BCL-2. *Neurosci Lett*, 262: 33–36
- Bonnefont AB, Munoz FJ, Inestrosa NC (1998) Estrogen protects neuronal cells from the cytotoxicity induced by acetylcholinesterase-amyloid complexes. *FEBS Lett*, 441:220–224
- Brandi ML, Becherini L, Gennari L i in. (1999) Association of the ER alfa gene polymorphisms with sporadic Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun*, 265: 335–338
- Bruce S, McEwen, Alves SE (1999) Estrogen action in the central nervous system, *Endocrine Reviews*, 20:279–307
- Carreau S, Bourguiba S, Lambard S i in. (2002) Reproductive system: aromatase and estrogens. *Mol Cell Endocrinol*, 193: 137
- Chen DF, Schneider GE, Martinou JC, Tonegawa S (1997) Bcl-2 promotes regeneration of severed axons in mammalian CNS. *Nature*, 385: 434–439
- Choi DW (1985) Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent. *Neurosci Lett*, 58:293–297
- Choi DW (1987) Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *Neurosci*, 7: 369–79
- Choi DW (1992) Excitotoxic cell death. *J Neurobiol*, 23:1261–1276
- Costa MM, Reus VI, Wolkowitz OM i in. (1999) Estrogen replacement therapy and cognitive decline in memory-impaired post-menopausal women. *Biol Psychiatry*, 46: 182–188
- Dawson VL, Dawson TM, Bartley DA i in. (1993) Mechanism of nitric oxide-mediated neurotoxicity in primary brain cultures. *J Neurosci*, 13:2651–61
- Di Paolo T, Bedard PJ, Dupont A, Poyet P (1982) Effects of estradiol on intact and denervated striatal dopamine receptors and on dopamine levels: a biochemical and behavioral study. *Can J Physiol Pharmacol*, 60: 350–357
- Dluzen D (1997) Estrogen decreases corpus striatal neurotoxicity in response to 6-hydroxydopamine. *Brain Res*, 767: 340–344
- Dluzen DE (1996) The effects of testosterone upon MPTP-induced neurotoxicity of the nigrostriatal dopaminergic system in male C57/B1 mice. *Brain Research*, 767: 340–344
- Dluzen DE, McDermott JL, Liu B (1996) Estrogen alters MPTP-induced neurotoxicity in female mice: effects on striatal dopamine concentrations and release. *J Neurochem*, 66: 658–666
- Dluzen DE, McDermott JL, Liu B (1996) Estrogen as a neuroprotectant against MPTP-induced neurotoxicity in C57/B1 mice. *Neurotoxicol Teratol*, 18: 603–606
- Dodel RC, Du Y, Bales KR i in. (1999) Sodium salicylate and 17beta estradiol attenuate nuclear transcription factor NF- $\kappa$ B translocation in cultured rat astroglia cultures following exposure to amyloid A beta (1–40) and lipopolisaccharide. *J. Neurochem*, 73: 1453–1460
- DonCarlos LL, Greene GL, Morrell JI (1991) Distribution of estrogen receptor-immunoreactive cells in the forebrain of the female guinea pig. *J Comp Neurol*, 305: 591–612
- Drew PD, Chavis JA (2000) Female sex steroids: effects upon microglial cell activation. *J. Neuroimmunol*, 111: 77–85
- Fagan AM, Bu G, Sun Y i in. (1996) Apolipoprotein E containing high density lipoprotein promotes neurite outgrowth and is a ligand for the low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem*, 23: 191–20
- Ganter S, Northoff H, Mannel D, Gebicke-Harter PJ (1992) Growth control of cultured microglia. *J Neurosci Res*, 33: 218–230

- Garcia-Segura LM, Wozniak A, Azcoitia I i in. (1999) Aromatase expression by astrocytes after brain injury: implications for local estrogen formation in brain repair. *Neuroscience*, 89: 567–578
- Garnier M, Di Lorenzo D, Albertini A, Maggi A (1997) Identification of estrogen-responsive genes in neuroblastoma SK-ER3 cells. *J Neurosci*, 17: 4591–4599
- Gibbs RB (1999) Treatment with estrogen and progesterone affects relative levels of brain derived neurotrophic factor mRNA and protein in different region of the adult rat brain. *Brain Research*, 844: 20–27
- Gollapudi L i Oblinger MM (1999) Estrogen and NGF synergistically protect terminally differentiated, ER alpha-transfected PC12 cells from apoptosis. *J Neurosci Res*, 56: 471–481
- Gollapudi L, Oblinger MM (1999) Stable transfection of PC12 cells with estrogen receptor (ERalpha): protective effects of estrogen on cell survival after serum deprivation. *J Neurosci Res*, 56: 99–108
- Gomez-Mancilla B i Bedard PJ (1992) effect of estrogen and progesterone on L-dopa induced dyskinesia in MPTP-treated monkeys. *Neurosci Letters*, 135: 129–132
- Goodman Y, Bruce AJ, Cheng B, Mattson MP (1996) Estrogens attenuate and corticosterone exacerbates excitotoxicity, oxidative injury, and amyloid-beta-peptide toxicity in hippocampal neurons. *J Neurochem*, 66:1836–1844
- Gordon JH, Perry KO (1983) Pre- and postsynaptic neurochemical alternation following estrogen-induced striatal dopamine hypo- and hypersensitivity. *Brain Research Bull*, 10: 425–428
- Grandbois M, Tanguay B i Di Paolo T (1999) Estradiol and dehydroepiandrosterone but not dihydrotestosterone protect against MPTP-induced dopamine depletion in mice. *Society for Neurosci. Abstracts*, 25: 1595
- Green PS, Bishop J, Simpkins JW (1997) 17 $\alpha$ -estradiol exerts neuroprotective effects on SK-N-SH cells. *J Neurosci*, 17:511–515
- Green PS, Gordon K, Simpkins JW (1997) Phenolic A ring requirement for the neuroprotective effects of steroids. *J Steroid Biochem Mol Biol*
- Green PS, Gridley KE, Simpkins JW (1998) Nuclear estrogen receptor-independent neuroprotection by estradienes: a novel interaction with glutathione. *Neurosci*, 84:7–10
- Gridley KE, Green PS, Simpkins JW (1998) A novel, synergistic interaction between 17 $\beta$ -estradiol and glutathione in the protection of neurons against  $\beta$ -amyloid 25–35 – induced toxicity in vitro. *Mol Pharmacol*, 54: 874–880
- Gundlach C, Kohama SG, Mirkes SJ i in. (2000) Distribution of estrogen receptor beta (ERbeta) mRNA in hypothalamus, midbrain and temporal lobe of spayed macaque: continued expression with hormone replacement. *Brain Res Mol Brain Res*, 76: 191–204
- Henderson VW, Paganini-Hill A, Emanuel CK i in. (1994) Estrogen replacement therapy in older women. Comparisons between Alzheimer's disease cases and nondemented control subjects. *Arch Neurol*, 51:896–900
- Henderson VW, Paganini-Hill A, Miller BL i in. (2000) Estrogen for Alzheimer's disease in women: randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Neurology*, 2000; 54: 295–301
- Keller JN, Germeyer A, Begley JG, Mattson MP (1997) 17 $\beta$ -estradiol attenuates oxidative impairment of synaptic Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity, glucose transport and glutamate transport induced by amyloid  $\beta$ -peptide and iron. *J Neurosci Res*, 50: 522–530
- Keller JN, Lauderback ChM, Butterfield DA i in. (2000) Amyloid beta-peptide effects on synaptosomes from apolipoprotein E-deficient mice. *J Neurochem*, 74: 1579–1586
- Kelly MJ, Levin ER (2001) Rapid action of plasma membrane estrogen receptors. *Trends Endocrinol Metabolism*, 12:152–156
- Kelly MJ, Wagner EJ (1999) Estrogen modulation of G-protein-coupled receptor. *TEM*, 10: 369–374
- Kish SJ, Morito C, Hornykiewicz O (1985) Glutathione peroxidase activity in Parkinson's disease brain. *Neurosci Lett*, 58:343–346
- Koller WC, Barr A i Biary N (1982) Estrogen treatment of dyskinesic disorders. *Neurology*, 32: 547–549

- Kuiper GG, Enmark E, Pelto-Huikko M i in. (1996). Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 5925–5930
- Küppers E, Beyer C (1999): Expression of estrogen receptor alpha and beta mRNA in the developing and adult mouse striatum. *Neurosci Letters*, 276: 95–98
- Kurkowska-Jastrzębska I, Wrońska A, Kohutnicka M i in. (1999) The inflammatory reaction following 1-methyl-4-phenyl-2,3,6-tetrahydropyridine intoxication in mouse. *Exp Neurol*, 156: 50–61
- Langub MC, Watson RE (1992) Estrogen receptor – immunoreactive glia, endothelia and ependyma in guinea pig preoptic area and median eminence: electron microscopy. *Endocrinology*, 130: 364–372
- Laskowitz DT, Sheng H, Bart RD i in. (1997) Apolipoprotein E-deficient mice have increased susceptibility to focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 17: 753–758
- LeBlanc AC, Poduslo JF (1990) Regulation of apolipoprotein E gene expression after injury of the rat sciatic nerve. *J Neurosci Res*, 25: 162–171
- Lee K, Richardson CD, Razik MA i in. (1998) Multiple potential regulatory elements in the 5' flanking region of the human alpha 1a-adrenergic receptor. *DNA Seq*, 8: 271–276
- Li X, Schwartz PE, Rissman EF (1997) Distribution of estrogen receptor-beta-like immunoreactivity in rat forebrain. *Neuroendocrinology*, 66: 63–67
- Lipton SA, Rosenberg PA (1994) Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *New Eng J Med*, 330: 613–622
- Lorenzo A, Diaz H, Carrer H, Caceres A (1992) Amygdala neurons in vitro: neurite growth and effects of estradiol. *J Neurosci Res*, 33: 418–435
- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M i in. (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*, 83: 835–839
- Marin R, Guerra B, Alonso R (2001) The amount of estrogen receptor-alpha increases after heat shock in a cholinergic cell line from the basal forebrain. *Neuroscience*, 107: 447–454
- McEwen BS, Alves SE (1999) Estrogen actions in the central nervous system. *Endoc Rev*, 20: 279–307
- McGeer PL, Schulzer M, McGeer EG (1996) Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease: a review of 17 epidemiological studies. *Neurology*, 21: 195–218
- Melcangi RC, Magnaghi V, Martini L (1999) Steroid metabolism and effects in central and peripheral glial cells. *J Neurobiol*, 40: 471–483
- Mermelstein PG, Becker JB, Surmeier DJ (1996) Estradiol reduces calcium currents in rat neostriatal neurons via a membrane receptor. *J Neurosci Res*, 16: 595–604
- Miller DB, Ali SF, O'Callaghan JP i in. (1998) The impact of gender and estrogen on striatal dopaminergic neurotoxicity. *Ann N Y Acad Sci*, 844: 153–165
- Miller MM, Hyder SM, Assayag R i in. (1999) Estrogen modulates spontaneous alternation and the cholinergic phenotype in the basal forebrain. *Neuroscience*, 91: 1143–1153
- Miranda R, Sohrabij F, Singh M, Toran-Allerand CD (1996) Nerve growth factor (NGF) regulation of estrogen receptors in explant cultures of the developing forebrain. *J Neurobiol*, 31: 77–87
- Mooradian AD (1993) Antioxidant properties of steroids. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 45: 509–511
- Mulnard RA, Cotman CW, Kawas C, i in. (2000) Estrogen replacement therapy for treatment of mild to moderate Alzheimer disease: a randomized controlled trial. *Alzheimer's Disease Cooperative Study*. *JAMA*, 283: 1007–1015
- Pardridge WM, Yoshikawa T, Kang YS, Miller LP (1994) Blood-brain barrier transport and brain metabolism of adenosine and adenosine analogs. *J Pharmacol Exp Ther*, 268: 14–18
- Pasqualini C, Olivier V, Guibert B, Frain O (1995) Acute stimulatory effect of estradiol on striatal dopamine synthesis. *J Neurochem*, 65: 1651–7
- Pietras R, Szego CM (1977) Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells. *Nature*, 265: 69–72
- Pietras RJ, Szego CM (1980) Partial purification and characterization of oestrogen receptors in subfractions of hepatocyte plasma membranes. *Biochem J*, 191: 743–760



- Pike CJ (1999) Estrogen modulates neuronal Bcl-xL expression and beta-amyloid-induced apoptosis: relevance to Alzheimer's disease. *J Neurochem*, 72: 1552–1563
- Pitas R E, Boyles JK, Lee SH i in. (1987) Lipoproteins and their receptors in the central nervous system. Characterization of the lipoproteins in cerebrospinal fluid and identification of apolipoprotein B, E (LDL) receptors in the brain. *J Biol Chem*, 262: 14352–14360
- Poirier J (1994) Apolipoprotein E in animal models of CNS injury and in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci*, 17: 525–553
- Powell i in. (2001) Identification and characterization of membrane estrogen receptor from MCF7 estrogen target cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 77:97–108
- Pratt WB, Toft DO (1997) Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev*, 18: 306–360
- Razandi M i in. (1999) Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) Originate from a single transcript: studies of ER $\alpha$  and ER $\beta$  expressed in Chinese hamster ovary cells. *Mol Endocrinol*, 13:307–319
- Samii A, Bickel U, Stroth U, Pardridge WM (1994) Blood-brain barrier transport of neuropeptides: analysis with a metabolically stable dermorphin analogue. *Am J Physiol*, 267: E124–131
- Sandyk R (1989) Estrogens and the pathophysiology of Parkinson's disease. *Int J Neurosci*, 45: 119–122
- Saunders-Pullman R, Gordon-Elliott J, Parides M i in. (1999) The effect of estrogen replacement on early Parkinson's disease. *Neurology*, 52: 1417–1421
- Singer CA, Figueroa-Masot XA, Batchelor RH, Dorsa DM (1999) The mitogen-activated protein kinase pathway mediates estrogen neuroprotection after glutamate toxicity in primary cortical neurons. *J Neurosci*, 19: 2455–2463
- Singer CA, Pang PA, Dobie DJ, Dorsa DM (1996) Estrogen increases GAP-43 (neuromodulin) mRNA in the preoptic area of aged rats. *Neurobiol Aging*, 17: 661–663
- Singer CA, Rogers KL, Dorsa DM (1998) Modulation of Bcl-2 expression: a potential component of estrogen protection in NT2 neurons. *Neuroreport*, 9: 2565–2568
- Singh M, Meyer EM, Simpkins JW (1995) The effect of ovariectomy and estradiol replacement on brain-derived neurotrophic factor messenger ribonucleic acid expression in cortical and hippocampal brain regions of female sprague dawley rats. *Endocrinology*, 136: 2320–2324
- Singh M, Setalo G, Guan X, Warren M, Toran-Allerand D (1999) Estrogen-induced activation of mitogen-activated protein kinase in cerebral cortical explants: convergence of estrogen and neurotrophin signaling pathways. *J Neurosci*, 19: 1179–1188
- Singh M, Setalo G, Guan X, Warren M, Toran-Allerand D (1999) Estrogen-induced activation of mitogen-activated protein kinase in cerebral cortical explants: convergence of estrogen and neurotrophin signaling pathways. *J Neurosci*, 19: 1179–1188
- Singh M, Setalo G, Guan X, Warren M, Toran-Allerand D (1999) Estrogen-induced activation of mitogen-activated protein kinase in cerebral cortical explants: convergence of estrogen and neurotrophin signaling pathways. *J Neurosci*, 19:1179–1188
- Sohrabij F, Miranda RC, Toran-Allerand CD (1995) Identification of putative estrogen response element in the gene encoding brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad. Sci USA*, 92: 11110–11114
- Stoltzner SE, Berchtold NC, Cotman CW, Pike CJ (2001) Estrogen regulates bcl-x expression in rat hippocampus. *Neuroreport*, 12: 2797–2800
- Stone DJ, Rozovsky I, Morgan TE i in. (1997) Astrocytes and microglia respond to estrogen with increased ApoE mRNA in vivo and in vitro. *Exp Neurol*, 143: 313–318
- Stone DJ, Rozovsky I, Morgan TE i in. (1998) Increased synaptic sprouting in response to estrogen via an apolipoprotein E-dependent mechanism: implications for Alzheimer disease. *J Neurosci*, 18: 3180–3185
- Stone DJ, Song Y, Anderson CP i in. (1998) Bidirectional transcription regulation of glial fibrillary acidic protein by estradiol in vivo and in vitro. *Endocrinology*, 139: 3202–3209

- Strittmatter WJ, Roses AD (1996) Apolipoprotein E and Alzheimer's disease. *Annu Rev Neurosci*, 19: 53–77
- Sumner BE, Fink G (1998) Testosterone as well as estrogen increases serotonin<sub>2A</sub> receptor mRNA and binding site densities in the male rat brain. *Brain Res Mol Brain Res*, 59: 205–214
- Taleghany N, Sarajari S, DonCarlos LL i in. (1999) Differential expression of estrogen receptor alpha and beta in rat dorsal root ganglion. *J Neurosci Res*, 57: 603–615
- Tang MX, Jacobs D, Stern Y i in. (1996) Schofield P, Gurland B, Andrews H, Mayeux R: Effect of oestrogen during menopause on risk and age at onset of Alzheimer disease. *Lancet*, 348: 429–432
- Teixeira C, Reed JC, Pratt MA (1995) Estrogen promotes chemotherapeutic drug resistance by a mechanism involving Bcl-2 proto-oncogene expression in human breast cancer cells. *Cancer Res*, 55: 3902–3907
- Toran-Allerand CD (1996) Mechanisms of estrogen action during neuronal development: mediation by interactions with the neurotrophins and their receptors? *J Steroid Biochem Mol Biol*, 56: 169–178
- Toran-Allerand CD, Miranda RC, Bentham WD i in. (1992) Estrogen receptors colocalize with low-affinity nerve growth factor receptors in cholinergic neurons of the basal forebrain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89: 4668–4672
- Vegeto E, Pollio G, Pellicciari C, Maggi A (1999) Estrogen and progesterone induction of survival of monoblastoid cells undergoing TNF-alpha-induced apoptosis. *FASEB J*, 13: 793–803
- Watters JJ, Campbell JS, Cunningham MJ, Krebs EG, Dorsa DM (1997) Rapid membrane effects of steroids in neuroblastoma cells: effects of estrogen on mitogen activated protein kinase signalling cascade and c-fos immediate early gene transcription. *Endocrinology*, 138: 4030–4033
- Weaver CE, Park-Chung M, Gibbs TT, Farb DH (1997) 17 $\beta$ -Estradiol protects against NMDA-induced excitotoxicity by direct inhibition of NMDA receptors. *Brain Res*, 761: 338–341
- Weiland NG (1992) Glutamic acid decarboxylase messenger ribonucleic acid is regulated by estradiol and progesterone in the hippocampus. *Endocrinology*, 131: 2697–2702
- Welsh-Bohmer KA, Gearing M, Saunders AM, Roses AD i in. (1997) Apolipoprotein E genotypes in a neuropathological series from the Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease. *Ann. Neurol*, 42: 319–325
- Xu Y, Berelowitz M, Bruno JF (1998) Characterization of the promoter region of the human somatostatin receptor subtype 2 gene and localization of sequences required for estrogen-responsiveness. *Mol Cell Endocrinol*, 139: 71–77
- Yaffe K, Sawaya G, Lieberburg I, Grady D (1998) Estrogen therapy in postmenopausal women: effects on cognitive function and dementia. *JAMA*, 279: 688–695
- Zhu YS, Pfaff DW (1995) DNA binding of hypothalamic nuclear proteins on estrogen response element and preproenkephalin promoter: modification by estrogen. *Neuroendocrinology*, 62: 454–466