

Edyta Spodnik

***Korowo-przedmurzowo-korowa pętla neuronalna  
a neurony wstawkowe przedmurza szczura -  
- badania immunohistochemiczne***

Praca na stopień doktora nauk medycznych

Promotor: prof. dr hab. Janusz Moryś

Zakład Anatomii i Neurobiologii Akademii Medycznej w Gdańsku

Gdańsk 2005r.



*Składam serdeczne podziękowania:*

*Panu Profesorowi **Januszowi Morysiowi** za  
cierpliwość oraz cenne wskazówki i rady udzielane  
w trakcie przygotowywania pracy*

***Koleżankom i Kolegom** z Zakładu Anatomii i  
Neurobiologii za życzliwość i wsparcie*

*Pani Magister **Sylwii Scisłowskiej** za pomoc w  
przygotowaniu szaty graficznej*

*Pani **Eugonii Świątek** za pomoc w  
przygotowaniu preparatów histologicznych*

*Dedykuję:*

**Mojej Rodzinie**





<b>1</b>	<b>WSTĘP .....</b>	<b>9</b>
1.1	NEURONY WSTAWKOWE .....	10
1.2	BIAŁKA WIĄŻĄCE WAPŃ .....	11
1.2.1	<i>Ogólna charakterystyka białek wiążących wapń .....</i>	<i>11</i>
1.2.2	<i>Białka wiążące wapń a ośrodkowy układ nerwowy .....</i>	<i>12</i>
1.2.3	<i>Znaczenie czynnościowe białek wiążących wapń .....</i>	<i>14</i>
1.2.3.1	Białka wiążące wapń a zmiany patologiczne w obrębie OUN .....	15
1.2.3.2	Białka wiążące wapń a rozwój mózgowia .....	17
1.3	PRZEDMURZE I JĄDRÓ ŚRÓDGRUSZKOWE .....	18
1.3.1	<i>Położenie i podział przedmurza i jądra śródgruszkowego grzbietowego. ....</i>	<i>18</i>
1.3.2	<i>Budowa komórkowa przedmurza i jądra śródgruszkowego grzbietowego .....</i>	<i>20</i>
1.3.3	<i>Połączenia przedmurza i jądra śródgruszkowego grzbietowego .....</i>	<i>23</i>
1.3.4	<i>Dotychczasowe badania immunohistochemiczne przedmurza i jądra śródgruszkowego grzbietowego .....</i>	<i>24</i>
1.3.5	<i>Rola i znaczenie przedmurza oraz jądra śródgruszkowego grzbietowego .....</i>	<i>25</i>
<b>2</b>	<b>CELE PRACY .....</b>	<b>27</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAŁ I METODY .....</b>	<b>28</b>
3.1	MATERIAŁ .....	28
3.2	METODY .....	28
3.2.1	<i>Perfuzja .....</i>	<i>28</i>
3.2.2	<i>Procedura stereotaktycznego podania znacznika aksonalnego .....</i>	<i>30</i>
3.2.3	<i>Barwienia immunohistochemiczne .....</i>	<i>33</i>
3.2.3.1	Barwienia pojedyncze .....	33
3.2.3.2	Barwienia podwójne .....	34
3.3	SPRZĘT UŻYTY DO DALSZYCH ANALIZ .....	38
3.4	ANALIZA MORFOLOGICZNA .....	39
3.5	ANALIZA ILOŚCIOWA .....	39
3.5.1	<i>Przygotowanie danych .....</i>	<i>39</i>
3.5.2	<i>Obróbka danych i analiza statystyczna .....</i>	<i>41</i>
<b>4</b>	<b>WYNIKI .....</b>	<b>42</b>
4.1	BADANIA GĘSTOŚCI NEURONÓW W PRZEDMURZU I JĄDRZE ŚRÓDGRUSZKOWYM GRZBIETOWYM NA PREPARATACH BARWIONYCH FIOLETEM KREZYLU .....	42
4.2	CHARAKTERYSTYKA IMMUNOREAKTYWNYCH ELEMENTÓW ZAWIERAJĄCYCH CABPS .....	44
4.2.1	<i>Charakterystyka PV-immunoreaktywnych elementów w przedmurzu i jądrze śródgruszkowym grzbietowym .....</i>	<i>48</i>
4.2.1.1	Badania jakościowe .....	48
4.2.1.2	Badania ilościowe .....	51
4.2.2	<i>Charakterystyka CB-immunoreaktywnych elementów w przedmurzu i jądrze śródgruszkowym grzbietowym .....</i>	<i>54</i>
4.2.2.1	Badania jakościowe .....	54
4.2.2.2	Badania ilościowe .....	57
4.2.3	<i>Charakterystyka CR-immunoreaktywnych elementów w przedmurzu i jądrze śródgruszkowym grzbietowym .....</i>	<i>59</i>
4.2.3.1	Badania jakościowe .....	59
4.2.3.2	Badania ilościowe .....	61
4.3	OCENA WZAJEMNYCH ZALEŻNOŚCI MIĘDZY SUBPOPULACJAMI NEURONÓW ZAWIERAJĄCYCH CABPS W PRZEDMURZU I JĄDRZE ŚRÓDGRUSZKOWYM GRZBIETOWYM .....	63
4.3.1	<i>Analiza wzajemnych zależności między neuronami zawierającymi PV i CR .....</i>	<i>63</i>
4.3.2	<i>Analiza wzajemnych zależności między neuronami zawierającymi CB i CR .....</i>	<i>66</i>
4.4	CHARAKTERYSTYKA WYZNAKOWANYCH ELEMENTÓW GABA-IMMUNOREAKTYWNYCH W PRZEDMURZU I JĄDRZE ŚRÓDGRUSZKOWYM GRZBIETOWYM .....	67
4.5	OCENA WZAJEMNYCH ZALEŻNOŚCI MIĘDZY NEURONAMI ZAWIERAJĄCYMI BIAŁKA WIĄŻĄCE WAPŃ, A NEURONAMI GABA-POZYTYWNYMI W PRZEDMURZU I JĄDRZE ŚRÓDGRUSZKOWYM GRZBIETOWYM .....	73
4.5.1	<i>Współwystępowanie parwalbuminy i kwasu <math>\gamma</math>-aminomasłowego w neuronach przedmurza i jądra śródgruszkowego grzbietowego .....</i>	<i>74</i>
4.5.2	<i>Współwystępowanie kalbindyny D-28k i kwasu <math>\gamma</math>-aminomasłowego w neuronach przedmurza i jądra śródgruszkowego grzbietowego .....</i>	<i>79</i>

4.5.3	<i>Współwystępowanie kalretyniny i kwasu <math>\gamma</math>-aminomasłowego w neuronach przedmurza i jądra śródgruszkowego grzbietowego</i>	84
4.6	ANALIZA WZAJEMNYCH RELACJI NEURONÓW PROJEKCYJNYCH I NEURONÓW ZAWIERAJĄCYCH CABPS PRZY UŻYCIU METOD WSTECZNEGO TRANSPORTU AKSONALNEGO I TECHNIK IMMUNOHISTOCHEMICZNYCH	89
4.6.1	<i>Rozkład neuronów przedmurza, wyznakowanych znacznikiem FG, projektujących do kory ruchowej</i>	89
4.6.2	<i>Analiza wzajemnych relacji między neuronami FG-pozytywnymi i neuronami zawierającymi PV w części przedniej przedmurza</i>	90
4.6.3	<i>Analiza wzajemnych relacji między neuronami FG-pozytywnymi i neuronami zawierającymi CB w przedniej części przedmurza</i>	90
4.6.4	<i>Analiza wzajemnych relacji między neuronami FG-pozytywnymi i neuronami zawierającymi CR w przedniej części przedmurza</i>	91
<b>5</b>	<b>DYSKUSJA</b>	<b>93</b>
5.1	MORFOLOGIA NEURONÓW ZAWIERAJĄCYCH CABPS	93
5.1.1	<i>Porównanie ekspresji parwalbuminy, kalbindyny oraz kalretyniny w przedmurzu i jądrze śródgruszkowym grzbietowym</i>	96
5.1.1.1	<i>Neurony zawierające parwalbuminę</i>	96
5.1.1.2	<i>Neurony zawierające kalbindynę D-28k</i>	97
5.1.1.3	<i>Neurony zawierające kalretyninę</i>	100
5.1.2	<i>Zmiany ewolucyjne rozmieszczenia białek wiążących wapń w obrębie przedmurza i jądra śródgruszkowego grzbietowego</i>	101
5.1.3	<i>Neuropil</i>	102
5.1.4	<i>Badania współwystępowania białek wiążących wapń</i>	104
5.2	NEURONY GABAERGICZNE	105
5.3	BADANIA WSPÓLWYSTĘPOWANIA CABPS I GABA	107
5.4	NEURONY PROJEKCYJNE, A BIAŁKA WIĄŻĄCE WAPŃ W PRZEDMURZU	110
5.5	NEURONY ZAWIERAJĄCE CABPS ORAZ NEURONY GABAERGICZNE, A FUNKCJA PRZEDMURZA I JĄDRA ŚRÓDGRUSZKOWEGO GRZBIETOWEGO	111
<b>6</b>	<b>GŁÓWNE WYNIKI I WNIOSKI</b>	<b>114</b>
<b>7</b>	<b>STRESZCZENIE</b>	<b>115</b>
<b>8</b>	<b>PIŚMIENNICTWO</b>	<b>116</b>

## **Lista użytych w pracy skrótów i oznaczeń**

- CaBPs – białka wiążące wapń
- Cl – przedmurze (claustrum)
- Cl<sub>a</sub> – część przednia przedmurza
- Cl<sub>c</sub> – część środkowa przedmurza
- Cl<sub>p</sub> – część tylna przedmurza
- CB – kalbindyna D-28k
- CR – kalretynina
- D<sub>En</sub> – jądro śródgruszkowe grzbietowe (ang. dorsal endopiriform nucleus)
- D<sub>Ena</sub> – część przednia jądra śródgruszkowego grzbietowego
- D<sub>Enp</sub> – część tylna jądra śródgruszkowego grzbietowego
- FG – Fluoro-Gold
- GABA – kwas  $\gamma$ -aminomasłowy
- IC – kora wyspowa
- ir – immunoreaktywne
- O<sub>UN</sub> – ośrodkowy układ nerwowy
- Pir – kora gruszkowa
- PV – parwalbumina
- V<sub>En</sub> – jądro śródgruszkowe brzuszne



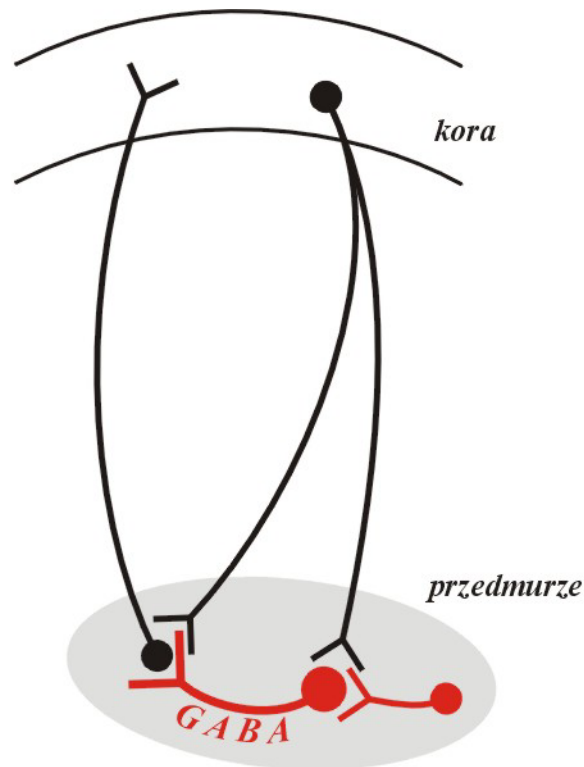
# 1 WSTĘP

Neurony ośrodkowego układu nerwowego (OUN) można zasadniczo podzielić na dwie grupy: neurony projekcyjne i neurony wstawkowe zwane inaczej interneuronami [168,170,171].

Neurony wstawkowe zlokalizowane w korze nowej [40] jak i w innych strukturach np. w przedmurzu [138,140] tworzą liczne synapsy z komórkami projekcyjnymi, dzięki czemu stanowią istotny czynnik wpływający zarówno na aktywność neuronów projekcyjnych jak i innych neuronów wstawkowych (ryc. 1). Ze względu na dużą ilość wytwarzanych przez nie połączeń, neurony wstawkowe są uważane za metabolicznie i elektrycznie bardziej aktywne od towarzyszących im neuronów projekcyjnych [86]. Obecnie na podstawie występujących w nich substancji chemicznych, różnic w budowie morfologicznej oraz różnic elektrofizjologicznych wyróżnia się kilka typów neuronów wstawkowych. Różnicowanie czynnościowe poszczególnych typów neuronów wstawkowych wydaje się być istotne dla regulacji aktywności lokalnych sieci neuronalnych, szczególnie w strukturach pełniących funkcje integracyjne w obrębie OUN, do których zalicza się przedmurze wraz z jądrem śródgruszkowym grzbietowym [24,26,76,185].

Organizacja neuronów wstawkowych przedmurza oraz jądra śródgruszkowego szczura była badana z zastosowaniem metod immunohistochemicznych na obecność GABA [170,171] oraz białek wiążących wapń (parwalbuminy, kalbindyny-D28k i kalretyniny) [54,113], somatostatyny i syntazy tlenu azotu [113,114]. Uzyskane przez powyższych autorów wyniki sugerują istotne zróżnicowanie neuronów wstawkowych pod względem zawartości badanych substancji w przedmurzu i jądrze śródgruszkowym grzbietowym, podobnie jak ma to miejsce w korze nowej [40]. Dotychczasowe badania nie przedstawiają jednak dokładnej analizy dotyczącej procentowego udziału poszczególnych subpopulacji neuronów wstawkowych jak i określenia ich typów morfologicznych czy ich rozmieszczenia w obrębie tej okolicy. Ocena tych parametrów w populacji komórek zawierających białka wiążące wapń jak i całkowitej populacji komórek GABA-pozytywnych dostarczy informacji, które w

sposób istotny zwiększą naszą wiedzę o przedmurzu i jądrze śródgruszkowym. Pozwoli to być może wyjaśnić rolę tych struktur w zakresie integracyjnej funkcji w obrębie OUN.



**Ryc. 1** . Schemat pętli korowo-przedmurzowo-korowej i neuronów wstawkowych.

### 1.1 Neurony wstawkowe

Kwas  $\gamma$ -aminomasłowy (GABA) powstaje z glutaminianu pod wpływem dekarboksylazy glutaminianowej (GAD). Uwolnione do szczeliny synaptycznej GABA może działać za pośrednictwem receptorów jonotropowych  $GABA_A$ , lub metabotropowych  $GABA_B$ . Aktywacja receptora  $GABA_A$  powoduje hiperpolaryzację i obniżenie pobudliwości błony komórkowej, dlatego GABA jest neuroprzebieźnikiem hamującym. Z kolei aktywacja receptora  $GABA_B$  redukuje uwalnianie innych neurotransmiterów z presynaptycznych zakończeń nerwowych. GABA może być również wychwycony zwrótnie lub przetransportowany do komórek gleju, gdzie jest rozkładany pod wpływem transaminazy kwasu  $\gamma$ -aminomasłowego.

Początkowo uważano, że GABA występuje tylko w neuronach wstawkowych. Obecnie wiadomo, że aminokwas ten przeważnie występuje w tych neuronach. Jedynie nieliczne struktury OUN posiadają GABAergiczne neurony projekcyjne. Najbardziej rozbudowany układ połączeń (zestawy długich projekcji) GABAergicznych odkryto w jądrach podstawy np. w prążkowiu, które wysyła aksony GABAergiczne do gałki bladej, jądra śródkonarowego i do istoty czarnej (części siatkowatej) [75].

Bazując na mapowaniu – GAD [165] lub GABA [178] wykazano, że neurony wstawkowe tworzące sieci lokalne są rozmieszczone niemal w całym OUN. Tylko w kilku strukturach mózgu szczura nie stwierdzono występowania neuronów GABAergicznych (jest to między innymi: zespół brzuszno-tylny wzgórza) [189] aczkolwiek liczne połączenia tej okolicy z jądrem siatkowatym wzgórza wskazują, że neurony tego zespołu są pod istotnym wpływem GABAergicznego układu hamującego.

Wydaje się, że nie ma wspólnej cechy morfologicznej wyróżniającej GABAergiczne neurony wstawkowe spośród innych neuronów. Uważa się, że neurony GABAergiczne modulują i kontrolują przepływ informacji o różnym charakterze wspomagając kształtowanie sieci neuronalnych [10].

Liczne badania wykazały obecność różnych kotransmitterów oraz innych neuropeptydów występujących w komórkach GABAergicznych. Niektóre z tych neuropeptydów uważane są za swoiste znaczniki neuronów wstawkowych. Można do nich zaliczyć białka wiążące wapń: PV, CB, CR, które stanowią znaczniki subpopulacji tych komórek w niektórych okolicach mózgowia [2].

## **1.2 Białka wiążące wapń**

### **1.2.1 Ogólna charakterystyka białek wiążących wapń**

Metabolizm wapnia jest niezwykle istotny dla prawidłowego funkcjonowania organizmu. Jon ten tworzy nierozpuszczalne sole z fosforanami obecnymi wewnątrz komórki. W wyniku tego w komórce powstaje duży gradient błonowy. Należy również pamiętać o istotnym udziale wapnia w sygnalizacji

wewnątrzkomórkowej [63]. Poziom jonów wapnia jest niezwykle istotny dla czynności komórki i musi podlegać stałej kontroli, którą sprawują zewnątrz- i wewnątrzkomórkowe białka wiążące wapń. Do białek zlokalizowanych zewnątrz błonowo w przestrzeni międzykomórkowej zaliczamy: kadheryny, integryny i białka z domeną EGF [9]. Natomiast białka zlokalizowane w cytoplazmie komórek możemy podzielić na dwie grupy: (1) zawierające motyw dłoni EF (domena EF) oraz (2) aneksyny.

Aneksyny charakteryzują się zdolnością przyłączania jonów wapnia w obecności błon fosfolipidowych [203].

Natomiast domena EF jest charakterystyczna dla bardzo licznej grupy białek [2], które mogą funkcjonować jako „wyzwalacze” rozpoczynające łańcuch reakcji lub jako „bufory” wapnia, obniżające poziom wolnych jonów  $\text{Ca}^{2+}$  w cytoplazmie. Przedstawicielem „wyzwalaczy” może być powszechnie występująca kalmodulina. Po przyłączeniu jonów wapnia zmianie ulega konformacja przestrzenna kalmoduliny, co wyzwala aktywność wielu (znanych obecnie jest około 20) skojarzonych z nią enzymów. Z kolei białka „buforowe” takie jak parwalbumina są składnikami bardziej biernego układu, odpowiedzialnego za obniżenie amplitudy sygnalizacji jonów  $\text{Ca}^{2+}$  [173].

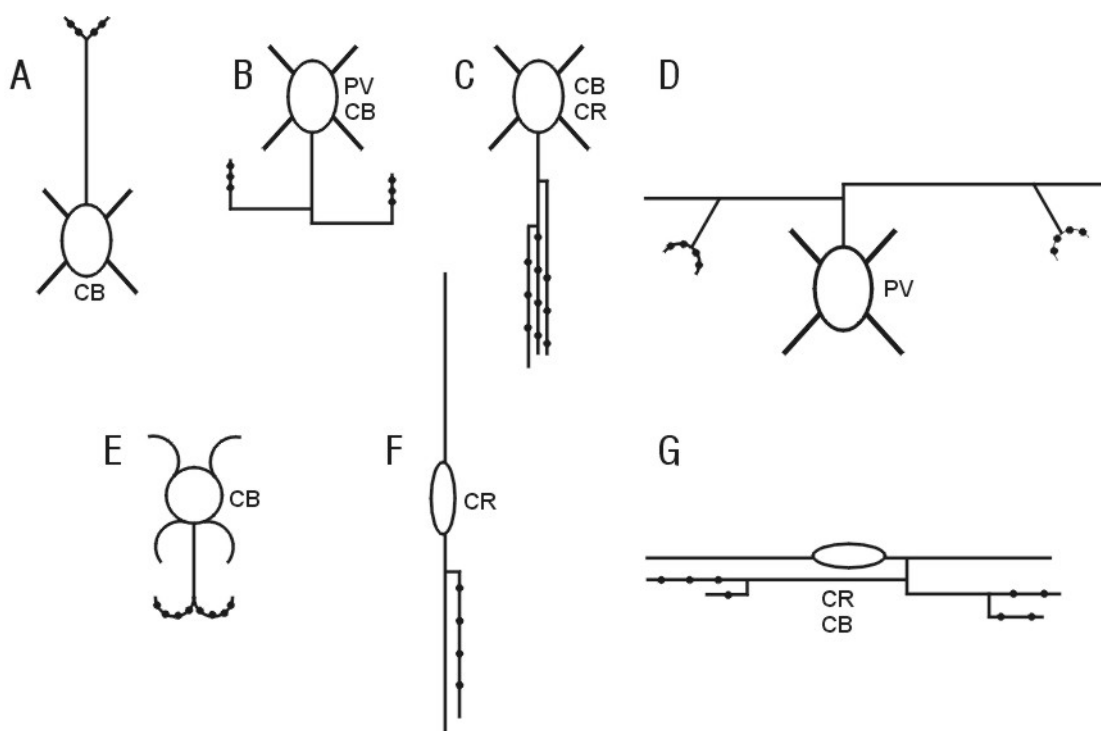
### **1.2.2 Białka wiążące wapń a ośrodkowy układ nerwowy**

Spośród CaBPs zawierających motyw dłoni EF najbardziej swoiste dla OUN wydają się być dwie podrodziny: parwalbuminowa (do której należy parwalbumina) i kalbindynowa (do której należą kalbindyna D-28k i kalretynina) [2].

Uważa się, że neurony wstawkowe kory nowej zawierające parwalbuminę, kalbindynę D-28k i kalretyninę należą, poza pewnymi wyjątkami, do oddzielnych subpopulacji komórek GABAergiczych.

Szczegółowa analiza komórek zawierających CaBPs w korze nowej wykazała obecność kilku typów morfologicznych charakterystycznych dla poszczególnych białek [40], (ryc. 2). Podobną analizę przeprowadzono dla ciała migdałowatego [103].





**Ryc. 2.** Główne typy bezkolcowych, niepiramidowych neuronów zawierających CaBPs w korze nowej, wzorowane na De Felipe [8463]: A-komórka Marinottiego, B-komórka kandelabrowa, C-komórka typu „podwójny bukiet”, D-duża komórka koszyczkowa, E-komórka dwubiegunowa, F-komórka glejopodobna, G-komórka Cajala-Retziusa.

Z drugiej jednak strony niektóre komórki wykazujące obecność parwalbuminy, kalbindyny D-28k, a szczególnie kalretyniny nie są komórkami GABAergicznymi [86]. Tak prostych zależności nie obserwowano w przypadku struktur podkorowych [118].

Parwalbumina (PV) uzyskana po raz pierwszy w 1934 r. z mięśni karpia obecna jest głównie w OUN, gdzie występuje w dużej liczbie neuronów tworzących różne układy czynnościowe [31,78]. Parwalbumina była pierwszym białkiem, w którym wykryto motyw dłoni EF [115]. Jako, że PV posiada domeny EF typu mieszanego  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  [179] przed związaniem jonów wapnia musi początkowo dojść do oddzielenia jonów magnezowych, a dopiero potem PV może wpływać na zdolność i szybkość obniżania stężenia jonów wapnia [29].

Kalbindyna D-28k (CB) jest białkiem zależnym od witaminy D. CB zlokalizowano pierwotnie w jelitach (dwunastnica kurczaka) i uważano ją za ważny

czynnik transportu wapnia przez śluzówkę [230], dopiero później opisano jej znaczące występowanie w OUN [2].

Karletyninę (CR) opisano stosunkowo niedawno jako białko swoiste dla OUN, posiadające liczne homologie w sekwencji aminokwasów do CB (58%) [98,190,191].

Obecnie przeważa opinia, że PV, CB, CR odgrywają znacznie bardziej istotną rolę w buforowaniu poziomu wapnia w cytoplazmie i utrzymaniu homeostazy wewnątrzkomórkowej niż jako białka regulatorowe [2]. Taka funkcja wydaje się być szczególnie istotna dla komórek GABAergicznymi, które cechuje wysoki stopień aktywności [86].

Nie mniej jednak w piśmiennictwie pojawiają się doniesienia sugerujące również inną rolę tych białek w OUN. Dotyczy to zwłaszcza CB i CR, które mogą działać jako białka sensorowe. W przypadku CR zaobserwowano, że znaczna jej ilość przyczepia się do błony komórkowej [89,235], w przypadku CB wykazano obecność zmian w strukturze białka, zmieniających charakter CB na hydrofobowy [13].

Doniesienia te potwierdzają obserwacje, dotyczące wpływu wapnia na rozpoznawalność tych białek przez przeciwciała [234]. Charakterystyka krzywej wysycenia PV, CB i kalmoduliny również wskazywałaby na to, że CB wykazuje właściwości bliższe kalmodulinie niż PV uważanej za typowy bufor, w pełni wysycany w spoczynkowym stężeniu  $Ca^{2+}$  [13].

Wydaje się też realne, że niektóre białka z domeną EF mogą być wydzielane i mogą działać zewnątrzkomórkowo jak inne białka wykazujące właściwości wiązania wapnia, jak np.  $\beta$ -parvalbumina, która stymuluje dojrzewanie immunologiczne komórek szpiku kostnego kurczaka, czy też białko 100 $\beta$ , które działa jako czynnik wzrostu neuronu [20,121].

### **1.2.3 Znaczenie czynnościowe białek wiążących wapń**

Dzięki zdolności wiązania wapnia, białka te biorą udział we wszystkich procesach, na które wpływa poziom tego jonu. Zdecydowana większość

proponowanych dotychczas funkcji wskazuje na specyficzne właściwości wiązania wapnia, które nie wymagają zmian konformacyjnych struktury białka.

W rozwoju, białka te biorą udział w podziałach komórkowych – mitozie [2,232]. Uważa się, że PV wpływa na dojrzewanie sieci hamującej (ang. *inhibitory circuitry*), CB na tworzenie, stabilizację i porządkowanie układu cytoszkieletu, natomiast CR jest zaangażowana w synaptogenezę, wydłużanie aksonów i przebudowę drzewa dendrytycznego. CB i CR współdziałając jednocześnie wpływają na migrację neuronów [11,27,36,57,65,79,199,215,238]. Wywierają także wpływ na różnicowanie neuronów poprzez kształtowanie kanałów jonowych, ekspresję receptorów i wspomniany wzrost aksonu [70,220].

Zakończenia komórek CR-pozytywnych tworzą lokalne synapsy hamujące (typu symetrycznego) z neuronami wstawkowymi zawierającymi CB [217]. Prawdopodobnie biorą one udział w modulowaniu działania piramidowych komórek projekcyjnych przez hamowanie aktywności wewnętrznego systemu hamującego.

### **1.2.3.1 Białka wiążące wapń a zmiany patologiczne w obrębie OUN**

Nadmiar jonów wapniowych nagromadzony w komórce jest odpowiedzialny za uruchomienie procesów prowadzących ostatecznie do jej śmierci [129,197].

Eksperymentalnie wykazano, że podanie chelatorów wapnia do komórek hipokampa *in vitro* po nieodwracalnej elektrycznej depolaryzacji uważanej za wczesny wskaźnik uszkodzenia neuronu, może odwrócić proces zwyrodnienia neuronu, prawdopodobnie przez wzrost pojemności buforowej [198]. Dlatego też uważa się, że komórki zawierające CaBPs posiadają większą zdolność buforowania wapnia, przez co mogą być bardziej odporne na uszkodzenia.

Jednakże przeprowadzone badania dostarczyły sprzecznych danych. Część autorów wykazała, że komórki zawierające CB [93] CR [47,132] oraz PV [67,228,231] są bardziej odporne niż te niezawierające CaBPs. Badania te opierały się jednak wyłącznie na obserwacjach ocalałych neuronów zawierających CaBPs w różnych stanach patologicznych lub przy ustalonych warunkach eksperymentalnych [62,68,92,107,186,213].

Z drugiej strony podobna ilość doniesień wskazuje na brak efektu ochronnego [1,15,96] lub wręcz na zwiększoną podatność komórek z endogenną ekspresją CaBPs [105,154,208,216] czy też z ich nadekspresją [77] w różnych stanach chorobowych. Również zwierzęta transgeniczne pozbawione aktywności poszczególnych białek wykazują niejednorodny efekt na działanie zewnętrznych czynników patologicznych [15,202].

Obserwowano również zmiany w budowie komórek zawierających CaBPs w chorobach zwyrodnieniowych OUN. W części badań wykazano zmniejszenie się liczby komórek zawierających CaBPs, jednakże wyniki te nie wykazały związku tych białek z patogenezą tych chorób. Najwięcej danych dostarczyły badania mózgowi od osób z rozpoznaną chorobą Alzheimera (AD). W korze mózgu stwierdzono, w niektórych badaniach zmniejszanie się liczby neuronów PV-pozytywnych [3,196,216], jednak inni badacze nie potwierdzili tych obserwacji [60,85]. W mózgowiach u pacjentów z rozpoznaną chorobą Alzheimera obserwowano również wzrost udziału procentowego występowania neuronów CR-pozytywnych w hipokampie i korze śródwęchowej [21] w stosunku do mózgowi kontrolnych. Podobnie jednak jak i w poprzednich przypadkach część autorów nie potwierdziła tych danych [64,88].

Spośród neuronów zawierających białka wiążące wapń jedynie CB-pozytywne neurony wydawały się być zawsze uszkodzane w chorobach zwyrodnieniowych mózgowia, jakkolwiek i w przypadku tego białka nie wykazano jego powiązań z etiopatogenezą tych chorób [69,87,94].

Tak sprzeczne obserwacje w przypadku PV- i CR-pozytywnych neuronów należy wiązać przede wszystkim z różnorodnością metod ilościowych użytych przez różnych autorów jak i ze stopniem zaawansowania choroby w różnych obszarach korowych. Dla przykładu w korze wzrokowej, która najpóźniej ulega zajęciu przez zmiany patologiczne w AD [18] obserwuje się niewielkie zmiany w liczbie neuronów PV-, CB-, CR-pozytywnych [122]. Analizując zmiany liczby neuronów zawierających białka wiążące wapń w zależności od stopnia zaawansowania choroby zwyrodnieniowej część autorów uważa, że neurony kory zawierające te białka są bardziej odporne na zmiany zwyrodnieniowe przynajmniej do momentu osiągnięcia tzw. krytycznego poziomu zmian patologicznych. Istnienie

takiego progu wykazano dla neuronów wstawkowych kory skroniowej oraz limbicznej [216]. Zgodnie z tymi obserwacjami po przekroczeniu tego progu, proces chorobowy zajmuje również neurony wstawkowe, przy czym autorzy sugerują, że do rozpoczęcia zmian patologicznych w tych komórkach niezbędne jest pojawienie się zaburzeń metabolizmu  $\text{Ca}^{2+}$ , które osłabiają odporność neuronów wstawkowych na uszkodzenie w AD [91,240]. Podobny schemat sekwencji zmian patologicznych występuje prawdopodobnie również w chorobie Huntingtona [34,59] oraz chorobie Parkinsona [33].

Uzyskanie zwierząt transgenicznych, pozbawionych genów kodujących CaBPs stworzyło nowe możliwości analizy funkcji tych białek zwłaszcza w czasie rozwoju. Bardzo interesujące obserwacje wykonano na mutantach pozbawionych jednocześnie zdolności syntezy CB [1], CR [200] i PV [201] wykazując, iż brak tych białek nie wpływa na rozwój układu nerwowego na poziomie mikroskopii świetlnej. Oczywiście nie można wykluczyć, iż w związku ze złożonym i nakładającym się wzorcem ekspresji CaBPs w czasie rozwoju OUN jest możliwe, iż dochodzi do całkowitej lub częściowej kompensacji brakujących białek przez inne białka wiążące wapń.

Z drugiej jednak strony należy pamiętać o licznych doniesieniach wskazujących na rolę neuronów wstawkowych w wywoływaniu napadów padaczkowych. Wykazano bowiem, że zmniejszenie liczby neuronów GABAergicznych lub zahamowanie ich działania może prowadzić do wystąpienia napadów padaczkowych lub chorobowych stanów lękowych w związku z brakiem efektu hamującego w obrębie mózgowia [39,182]. A duże powinowactwo tych neuronów do białek wiążących wapń może przemawiać za istotną rolę w wywoływaniu napadów padaczkowych.

### **1.2.3.2 Białka wiążące wapń a rozwój mózgowia**

W rozwoju ontogenetycznym mózgowia ekspresja CR pojawia się najwcześniej, następnie CB, najpóźniej zaś pojawia się ekspresja PV. W rozwoju OUN szczura zauważono, że ekspresja CB jak i CR pojawia się stosunkowo wcześnie bowiem ok. 14-16 dnia życia płodowego, natomiast obecność komórek

PV-pozytywnych była obserwowana w zależności od okolic mózgowia dopiero od 8-14 dnia po urodzeniu [11,86]. Wydaje się to potwierdzać analiza częstości skorygowanych zmian aminokwasów tych białek u różnych gatunków [2]. CB i CR wykazują bardziej konserwatywną sekwencję aminokwasów niż PV co sugeruje wcześniejsze powstanie w rozwoju ewolucyjnym, (najbardziej konserwatywną sekwencję spośród białek wiążących wapń wykazuje kalmodulina [2,90]). Obie rodziny: kalbindyny i parwalbuminy pojawiają się dopiero u kręgowców natomiast kalmodulina występuje zarówno u kręgowców jak i bezkręgowców [48].

### **1.3 Przedmurze i jądro śródgruszkowe**

#### **1.3.1 Położenie i podział przedmurza i jądra śródgruszkowego grzbietowego.**

Przedmurze (*claustrum*) stanowi zgrupowanie istoty szarej w postaci dużego jądra podkorowego występującego u wszystkich ssaków.

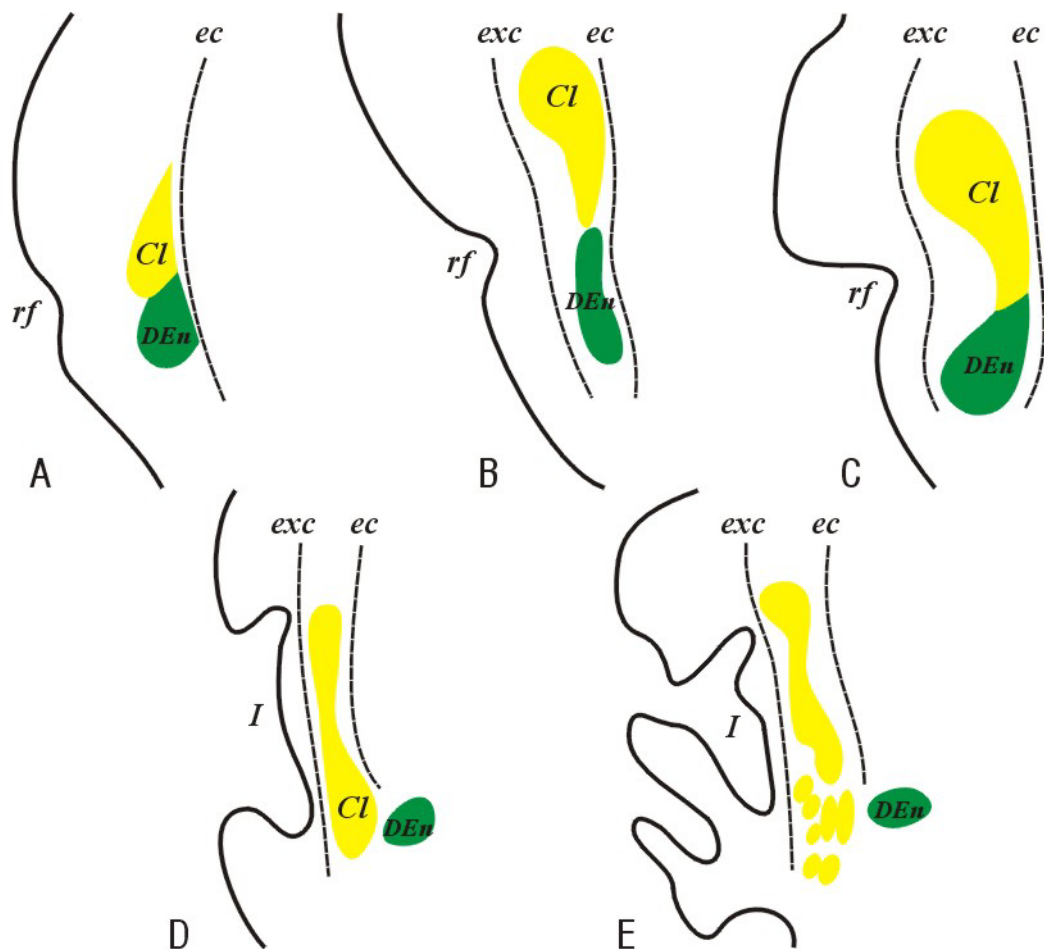
U królika, kota, psa, owcy oraz u naczelnych i u człowieka przedmurze oddzielone jest od głębokich warstw kory torebką ostatnią (*capsula extrema*), podczas gdy u szczura sąsiaduje ono bezpośrednio z neuronami głębokich warstw kory (ryc.3).

Na podstawie stosunku do bruzdy węchowej (*sulcus rhinalis*), odmiennego systemu połączeń z korą mózgu oraz różnic w budowie komórkowej przedmurze podzielono na dwie części: położone powyżej bruzdy węchowej i sąsiadujące z korą wyspą przedmurze wyspowe (*claustrum insulare*), bądź grzbietowe oraz przedmurze przedgruszkowe (*claustrum prepiriforme*) lub brzuszne, które leży poniżej bruzdy węchowej i sąsiaduje z korą gruszkową [41,52,54,71,166,168,169]. Przyśrodkowo, włókna torebki zewnętrznej (*capsula externa*) oddzielają przedmurze wyspowe od skorupy (*putamen*), a przedmurze przedgruszkowe od ciała migdałowatego (*corpus amygdaloideum*).

Nieco inny podział zaproponowali Krettek i Price [116], którzy przedmurze grzbietowe uznają za właściwe przedmurze, natomiast dla części brzusznej wprowadzili nazwę zaproponowaną wcześniej przez Loo [130] jądro

śródmurze (*nucleus endopiriformis*). Krettek i Price [116] rozszerzyli ponadto nazewnictwo jądra śródmurzeowego. Właściwy obszar jądra śródmurzeowego nazwali częścią grzbietową (DEn), natomiast obszar znajdujący się poniżej - częścią brzuszną jądra śródmurzeowego (VEn).

Ze względu na różnice morfologiczne i czynnościowe w tej pracy badaniu poddane zostanie przedmurze (Cl) i jądro śródmurzeowe grzbietowe (DEn) zgodnie z mianownictwem zaproponowanym przez Krettek i Price [116].



**Ryc. 3.** Przekroje czołowe przez mózgowia: (A) szczura, (B) królika, (C) kota, (D) małpy, (E) człowieka. Użyte skróty: Cl-przedmurze, DEn-jądro śródmurzeowe grzbietowe, ec-torebka zewnętrzna, exc-torebka ostatnia, I-wyspa, rf-bruzda wężowa.

Kształt i wielkość przedmurza wykazują istotne różnice między poszczególnymi gatunkami ssaków, co w swoich badaniach wykazała Kowiańska [108] oraz Kowiański i wsp. [110]. U owadożernych i niektórych gryzoni (szczur, mysz) przedmurze przylega bezpośrednio do głębokich warstw kory (ryc. 3A) i

można je wyróżnić jedynie na podstawie większej gęstości i intensywniejszej barwności tworzących je neuronów [7,12,46,108,134,138,139,169]. Jądro śródgruszkowe jest u tych zwierząt zdecydowanie większe. U pozostałych gryzoni (świnka morska), a także ssaków większych takich jak królik (ryc. 3B), kot (ryc. 3C), pies – przedmurze powiększyło się znacznie i stało się już strukturą dobrze oddzieloną od kory przez torebkę ostatnią [14,49,135,140,151]. Natomiast jądro śródgruszkowe stało się u tych zwierząt zdecydowanie mniejsze od przedmurza [49,140,166,175]. U naczelnych obserwuje się dalsze zmniejszenie jądra śródgruszkowego (ryc. 3D), a u człowieka (ryc. 3E) stanowi ono już tylko nieliczną grupę komórek [17,22,155,158]. Uwzględniając różnice w topografii oraz cytoarchitektonice i lokalizacji połączeń korowych przedmurze człowieka zostało podzielone przez Morysia i wsp. [155,158,161] na cztery części: grzbietową, oczodołową, skroniową i przymigdałową. Analiza połączeń przedmurza człowieka z korą pozwoliła na wysunięcie przypuszczeń, że trzy pierwsze części odpowiadają przedmurzu natomiast część przymigdałowa odpowiada jądro śródgruszkowemu u pozostałych ssaków [157,159].

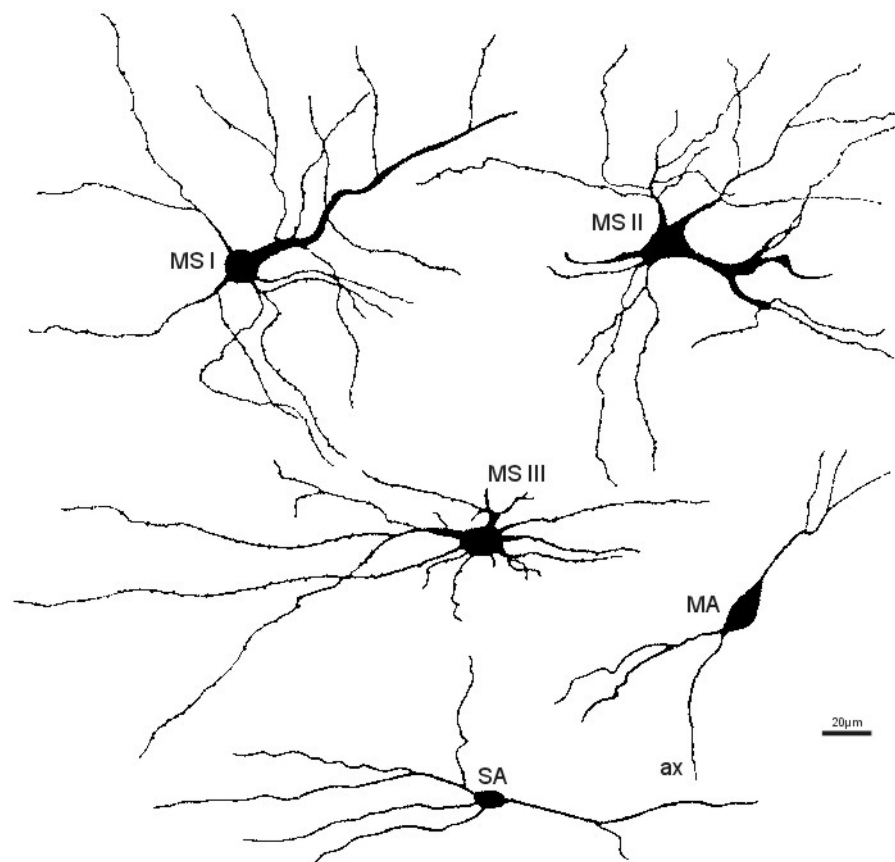
### **1.3.2 Budowa komórkowa przedmurza i jądra śródgruszkowego grzbietowego**

Mamos badając przedmurze szczura [138] wyróżniła trzy zasadnicze typy komórek nerwowych: MS, MA i SA (ryc. 4). Typ pierwszy MS stanowiły najliczniej występujące neurony średniej wielkości (średnica 16-23  $\mu\text{m}$ ) z licznymi kolcami dendrytycznymi. W obrębie tego typu wyróżniono trzy podtypy: MS I – trójkątne lub owalne neurony z długim, pojedynczym dendrytem głównym, MS II – owalne lub okrągłe neurony z krótkim, pojedynczym dendrytem głównym, MS III – owalne lub okrągłe neurony bez dendrytu głównego. Typ drugi MA stanowiły wrzecionowate, bezkolcowe, średniej wielkości komórki nerwowe (średnica 19–25  $\mu\text{m}$ ) z dwoma dendrytami głównymi. Neurony typu trzeciego SA to małe, bezkolcowe komórki (średnica 12-15  $\mu\text{m}$ ) o owalnym lub okrągłym kształcie.

Morfologię komórek w przedmurzu królika opisali Wasilewska i Najdzion [229]. Wyróżnili oni cztery typy komórek. Typ I stanowiły neurony



wielobiegunowe o okrągłych lub wielokątnych ciałach z kilkoma grubymi kolcowymi lub bezkolcowymi wypustkami. Te komórki występowały najliczniej. Do typu II zaliczyli neurony dwubiegunowe o wrzecionowatym lub owalnym ciele. Wypustki tych komórek także posiadały kolce. Trzeci typ stanowiły neurony trójkątne z licznymi kolcami na wypustkach. Neurony gruszkopodobne z cienkim aksonem z jednej i jedną lub dwoma grubymi wypustkami z drugiej strony zaliczyli do typu czwartego.



**Ryc. 4.** Typy neuronów występujących w przedmurzu i jądrze śródgruszkowym szczura wzorowane na Mamos{2655} (opis w tekście).

W przedmurzu kota LeVay i Sherk [125] opisali dwa główne typy neuronów: średniej wielkości z licznymi kolcami dendrytycznymi oraz małe bezkolcowe. Natomiast Mamos i wsp. [140] wyróżnili w przedmurzu kota (uwzględniając różnice w budowie drzewa dendrytycznego) trzy typy neuronów piramidopodobnych z licznymi kolcami dendrytycznymi oraz dwa typy neuronów

bezkolcowych. Badania przeprowadzone z użyciem mikroskopu elektronowego wykazały istnienie w przedmurzu kota synaps o charakterze asymetrycznym (90%) [101]. Występują one głównie między aksonem, a kolcami dendrytycznymi (synapsy akso-kolcowe) lub małymi dendrytami (synapsy akso-dendrytyczne) [83,95,99,101,119]. Budowa morfologiczna tych połączeń może sugerować, że mają one charakter pobudzający, natomiast pozostałe 10% stanowią symetryczne synapsy hamujące.

Brand [19] badając przedmurze małp (*Macaca mulata*, *Saimiri sciureus*), wyróżnił liczną grupę dużych neuronów posiadających kolce dendrytyczne oraz stosunkowo rzadko występujące dwa typy mniejszych neuronów bezkolcowych. Wykazał on, że aksony komórek bezkolcowych kończą się w pobliżu macierzystych perikarionów, natomiast aksony komórek posiadających kolce dendrytyczne opuszczają przedmurze i wnikają do torebki zewnętrznej lub ostatniej.

Braak i Braak [16,17] stosując metodę Golgi'ego wyróżnili w przedmurzu człowieka pięć typów neuronów. Neurony typu I występowały najliczniej i były to duże neurony piramidopodobne posiadające liczne kolce dendrytyczne. Typy II-V to bezkolcowe neurony, które różniły się między sobą wielkością ziaren lipofuscyny. Ponieważ dendryty i aksony neuronów typu II-V kończą się w pobliżu perikarionu, uznane zostały za neurony wstawkowe. Akson neuronów typu I opuszcza przedmurze, co pozwala przypuszczać, że są to komórki projekcyjne. Spahn i Braak [219] szacuje, że komórki typu I stanowią około 93% wszystkich neuronów przedmurza, a typu II-V zaledwie 7% [219]. Oceniając preparaty barwione fioletem krezyłu Moryś i wsp. [158] wyróżnili w przedmurzu człowieka trzy typy neuronów. Typ pierwszy to średnie neurony, o ciele wrzecionowatym i trójkątnym oraz ciemno barwiącej się cytoplazmie, które występowały głównie w jego części grzbietowej i skroniowej. Do typu drugiego zaliczyli neurony duże i średnie, wielobiegunowe lub piramidopodobne o jasnej cytoplazmie, które zlokalizowane były głównie w części oczodołowej i przymigdałowej przedmurza. Typ trzeci stanowiły neurony małe, wielobiegunowe i owalne o ciemno barwiącej się cytoplazmie. Te neurony były rozmieszczone równomiernie we wszystkich częściach przedmurza.

Zastosowanie innych metod badawczych zwłaszcza technik uwidaczniających transport aksonalny jak i metod immunohistochemicznych

pozwoiliło na potwierdzenie istnienia w przedmurzu dwóch zasadniczych grup neuronów: projekcyjnych i wstawkowych.

### **1.3.3 Połączenia przedmurza i jądra śródgruszkowego grzbietowego**

Występowanie rozległych połączeń przedmurza z korą mózgu jako pierwszy opisał Narkiewicz [166,167]. Usunięcie wybranych obszarów kory u kota prowadziło do zwyrodnienia (rozplemu tkanki glejowej i zmniejszenia liczby neuronów), w korespondującym z tą korą obszarze przedmurza. Po usunięciu kory ruchowej i somatosensorycznej w/w zmiany zachodziły w przedniej i środkowej części struktury, po usunięciu kory wzrokowej - w tylnej części, a usunięcie kory słuchowej powodowało zmiany zlokalizowane poniżej strefy wzrokowej. Na podstawie przeprowadzonych badań Narkiewicz postawił hipotezę istnienia dwukierunkowych (wstępujących i zstępujących) połączeń przedmurza z korą o swoistej topografii, które tworzyły specyficzną neuronalną pętlę korowo-przedmurzowo-korową (ryc. 1) [32,166].

Pętla ta była następnie badana za pomocą metod transportu aksonalnego peroksydazy chrzanowej, znaczników fluorescencyjnych i znakowanych aminokwasów, które potwierdziły istnienie połączeń przedmurzowo-korowych [100,125,162,175,211] oraz korowo-przedmurzowych [28,225]. Badania prowadzone głównie na małpach i kotach wykazały, że przednia część przedmurza posiada połączenia z korą ruchową [37], część środkowa z korą somatosensoryczną [133], natomiast część tylna z korą wzrokową [53,206]. Strefa słuchowa znajduje się brzusznie, poniżej strefy wzrokowej [84]. W obrębie poszczególnych stref projekcyjnych wykazano istnienie specyficznej organizacji połączeń. Istnienie mapy somatotopowej w strefie somatosensorycznej [177], ruchowej [35], oraz retinotopowy układ połączeń przedmurza z korą wzrokową [205] został opisany przez wielu autorów. W ostatnich latach udowodniono także istnienie połączeń przedmurza z układem limbicznym [136,137]. Połączenia te zlokalizowane są w brzusznej części przedmurza, strefie pośredniej między przedmurzem i jądrem śródgruszkowym oraz w samym jądrze śródgruszkowym. Obecność połączeń

przedmurzowo-korowych została potwierdzona również na materiale ludzkim [155,161].

Aksony neuronów przedmurza kończą się głównie w warstwie IV kory wzrokowej i somatosensorycznej [28,177] oraz w znacznie mniejszym stopniu w warstwie VI i V kory czuciowej (somatosensorycznej) [221], oraz I, IIIb i VI kory wzrokowej [28,177]. Projekcja do kory ruchowej kończy się na neuronach warstwy III i VI [35].

W odróżnieniu od przedmurza, które łączy się głównie z korą nową, jądro śródgruszkowe posiada połączenia z korą starą: śródwęchową, hipokampem, a także z korą przedgruszkową [50,168,233]. Zarówno przedmurze jak i jądro śródgruszkowe posiadają połączenia z ośrodkami podkorowymi np. z ciałem migdałowatym [116,117,176], ze wzgórzem [46,95,116,172,212], z prążkowiem [51], ze śródmózgiem i z wieloma innymi regionami podkorowymi.

#### **1.3.4 Dotychczasowe badania immunohistochemiczne przedmurza i jądra śródgruszkowego grzbietowego**

W badaniach histochemicznych wykryto obecność neurotransmitera GABA w obrębie przedmurza i jądra śródgruszkowego grzbietowego [170,171].

Kolejnym krokiem było połączenie badań immunohistochemicznych z wstecznym transportem aksonalnym w przedmurzu i w jądrze śródgruszkowym grzbietowym szczura [54]. Badania te wykazały obecność charakterystycznych dla neuronów GABAergicznym białek wiążących wapń: parwalbuminy i kalbindyny-D28k [54] oraz kalretyniny (obserwacje własne, dotychczas nie publikowane) w neuronach niewysyłających aksonów do kory. Pozwala to sądzić, że kwas  $\gamma$ -aminomasłowy (GABA) jest neuroprzekaznikiem przedmurzowych neuronów wstawkowych, które wywierają hamujący wpływ na pętlę korowo-przedmurzowo-korową [54,170,171,187]. Neurony zawierające GABA należą głównie do populacji komórek małych i zlokalizowane są zarówno w przedmurzu, jak i w jądrze śródgruszkowym. Obraz morfologiczny tych komórek odpowiada małym neuronom bezkolcowym, widocznym w preparatach barwionych metodą Golgi'ego [138,140]. W przedmurzowych neuronach wstawkowych wykazano również obecność

NADPH diaforazy [82,223], NPY [114], NOS [114], somatostatyny [55,114], VIP [55,114], cholecystokininy [55] i hydroksylazy tyrozyny [223]. Neurony wstawkowe w przedmurzu stanowią od 6-12% w zależności od badanego gatunku zwierząt [71,111,138]. Natomiast dominującą populacją w przedmurzu są neurony projekcyjne, których głównym neurotransmiterem wydaje się być glutaminian. Zgodnie z badaniami Kowiańskiego i wsp. [113,114] niewielka ilość tych neuronów projekcyjnych zawiera syntazę tlenu azotu (NOS).

Z kolei w neuronach wstawkowych jądra śródgruszkowego znaleziono białka wiążące wapń [54,113,187], neuropeptydy: somatostatynę [113], neurotensynę, cholecystokininę [188], NPY [113], VIP [113,209], a także NOS [113].

### **1.3.5 Rola i znaczenie przedmurza oraz jądra śródgruszkowego grzbietowego**

Badania połączeń przedmurza wykazały istnienie charakterystycznego układu połączeń. Topograficznie i czynnościowo wyróżniono strefy: wzrokową, słuchową, somatosensoryczną, ruchową i limbiczną [109,112]. Strefa wzrokowa przedmurza, podobnie jak kora wzrokowa, posiada organizację retinotopową [125], potwierdzoną badaniami fizjologicznymi [28,124]. W układzie ruchowym obserwowano aktywność neuronów przedmurza w ruchach złożonych [207]. Istnieją doniesienia potwierdzające rolę przedmurza w przekazywaniu i analizie informacji czuciowych do kory mózgu szczura [210] i człowieka [163,164]. Dochodzenie do przedmurza licznych informacji o różnym charakterze pozwala przypuszczać, że w przedmurzu dochodzi do scalania informacji z wielu okolic kory nowej [24]. Proces scalania ułatwia istnienie w przedmurzu nakładania się stref projekcyjnych dla poszczególnych obszarów korowych [109,112]. Ponadto stwierdzono obecność w tej strukturze neuronów wysyłających projekcję do dwóch lub trzech obszarów korowych [108]. Uwzględniając te dane można przypuszczać, że przedmurze stanowi ośrodek pełniący funkcję przekaźnika informacji między różnymi polami korowymi. Hipotezę tę zdają się potwierdzać najnowsze badania wykorzystujące pozytronową tomografię emisyjną. Hadjighani i Roland [76] wykazali, że interpretacja informacji czuciowych i wzrokowych zachodzi w

specyficznych rejonach korowych, przy czym komunikacja między tymi obszarami zachodzi przez przedmurze.

Część limbiczna przedmurza posiada połączenia z podkłądką, korą śródwęchową i hipokampem, tworząc swoisty system przedmurzowo-śródwęchowo-hipokampowy, który związany jest najprawdopodobniej z procesami uczenia się i zapamiętywania [233]. Obserwacje doświadczalne znalazły potwierdzenie w lokalizacji zmian patologicznych w tej części przedmurza w chorobie Alzheimera oraz w fizjologicznym starzeniu, w przebiegu których dochodzi do zaburzeń pamięci [157,160].

Badania przy użyciu rezonansu magnetycznego pozwoliły na ocenę struktur mózgowia dotychczas niemożliwych do zbadania ze względu na ich niewielkie rozmiary. Do nich także zalicza się przedmurze. U pacjentów z rozpoznaną chorobą Wilsona, z objawami neurologicznymi w przebiegu tego schorzenia, stwierdzono zmniejszenie się wymiarów oraz większą „przezierność” przedmurza [104]. Podobne zmiany występują w jądrach podstawy [183].

Doniesienia ostatniego okresu wskazują na kluczową rolę przedmurza [152,204] i jądra śródgruszkowego grzbietowego [131] w procesach padaczkowych. Czynność ta możliwa jest dzięki obecności wielokierunkowych połączeń przedmurza z niemal wszystkimi obszarami korowymi [46,125,127,133,194] i stosunkowo szybko osiąganą dojrzałością. Może ono zdaniem autorów odrywać rolę w kontroli czynności napadów padaczkowych [239]. Niektórzy autorzy sugerują więc, iż stanowi ono dla organizmu swoistego rodzaju zabezpieczenie przed wystąpieniem uogólnionych napadów padaczkowych [204].

Nasza wiedza o czynności przedmurza jakkolwiek coraz obszerniejsza, pozostaje nadal fragmentaryczna, co nie pozwala na jednoznaczne wypowiedzenie się co do roli, jaką pełni ono w ośrodkowym układzie nerwowym.

## 2 CELE PRACY

Liczne doniesienia charakteryzujące organizację połączeń przedmurzowo-korowo-przedmurzowych oraz neurokonfigurację komórek przedmurza, nie wyjaśniają do końca jego funkcji. Za jedną z przyczyn tego faktu można uznać stosowanie pojedynczej metody badawczej.

Wykorzystując technikę transportu aksonalnego znaczników fluorescencyjnych w połączeniu z badaniami immunohistochemicznymi, można określić wzajemne relacje subpopulacji neuronów projekcyjnych i wstawkowych w obrębie struktur ośrodkowego układu nerwowego. Ustalenie tych zależności pozwala na przybliżenie roli, jaką neurony te pełnią w funkcjonowaniu struktury i roli jaką pełni dana struktura w ośrodkowym układzie nerwowym.

Biorąc pod uwagę powyższe informacje za cel mojej pracy postawiłam sobie udzielenie odpowiedzi na pytania:

1. Czy przedmurze i jądro śródgruszkowe grzbietowe szczura różnią się pod względem ekspresji białek wiążących wapń?
2. Jaka jest lokalizacja i morfologia neuronów GABAergiczných w obu strukturach?
3. Czy przedmurze i jądro śródgruszkowe grzbietowe szczura różnią się pod względem zależności występujących między populacjami neuronów zawierających CaBPs, a neuronami GABAergicznymi?
4. Jakie zależności występują między populacjami neuronów zawierających CaBPs, a neuronami projekcyjnymi w przedmurzu?

## 3 MATERIAŁ I METODY

### 3.1 *Materiał*

Badania zostały przeprowadzone na mózgowiach 18-tu dorosłych szczurów rasy Wistar (o ciężarze od 300 do 350 gramów). Wszystkie zwierzęta pochodziły ze zwierzętarni Zakładu Anatomii i Neurobiologii Akademii Medycznej w Gdańsku. Procedura postępowania ze zwierzętami była zgodna z zaleceniami Międzynarodowej Rady do Spraw Wiedzy o Zwierzętach Laboratoryjnych (ICLAS) z 1974 roku oraz zaleceniami Rady Europy nr 123 z 1986 roku (patrz Zwierzęta Laboratoryjne. Metody hodowli i doświadczeń, red. J. Brylińska, J. Kwiatkowska; Universitas, Kraków, 1996). Na badania uzyskano zgodę Terenowej Komisji ds. Etyki przy Akademii Medycznej w Gdańsku.

Zwierzęta podzielono na trzy grupy doświadczalne w celu:

- I. uwidocznienia neuronów Cl i DEn przy zastosowaniu barwienia fioletem krezyłu oraz wyznakowania metodami immunohistochemicznymi komórek zawierających białka wiążące wapń (10 zwierząt).
- II. wyznakowania metodami immunohistochemicznymi neuronów GABAergicznymi w Cl i DEn oraz zbadania ich relacji z neuronami zawierającymi białka wiążące wapń (4 zwierzęta).
- III. zbadania wzajemnych relacji między neuronami projekcyjnymi Cl, a neuronami zawierającymi CaBPs (4 zwierzęta).

### 3.2 *Metody*

#### 3.2.1 *Perfuzja*

Zwierzęta z grupy I i II usypiano głęboko podając dootrzewnowo letalną dawkę Thiopentalu (80 mg/kg ciężaru ciała) i po otwarciu klatki piersiowej wykonywano perfuzję przezsercową. Zwierzęta z grupy III najpierw poddawano zabiegowi operacyjnemu, a potem usypiano jak pozostałe i poddawano perfuzji.

Iglę perfuzyjną wprowadzano przez lewą komorę serca do aorty wstępującej, następnie po rozpoczęciu perfuzji otwierano prawe uszko serca i zamykano



kleszczykami naczyniowymi aortę brzuszną powyżej przepony. W trakcie perfuzji podawano najpierw 0,9% roztwór NaCl, a następnie właściwy płyn perfuzyjny, którego skład był uzależniony od rodzaju barwienia, któremu w dalszym etapie było poddawane mózgowie. Skład oraz ilość płynów potrzebną dla utrwalenia mózgowia przedstawia tabela I.

*Tabela I. Skład i charakterystyka płynów perfuzyjnych*

Rodzaj płynu	Temperatura	Ilość ml płynu dla szczura
0,9% NaCl z dodatkiem 5000j. heparyny	4°C	150
utrwalacz standardowy: 4% roztwór paraformaldehydu w 0,1M buforze fosforanowym (pH = 7,4)	4°C	500
utrwalacz zastosowany do barwień z użyciem p-ciała anty-GABA: 1,5% roztwór glutaraldehydu 2% roztwór paraformaldehydu w 0,1M buforze fosforanowym (pH = 7,4)	4°C	200

Po zakończeniu perfuzji mózgowia wyjmowano z czaszek. Dalsze postępowanie było zależne od procedury immunohistochemicznej. Mózgowia nie barwione z użyciem p-ciała anty-GABA odwadniano kolejno w 15% (przez dobę), a następnie w 30% (przez trzy doby) roztworze sacharozy w 0,1M buforze fosforanowym (pH = 7,4) w temperaturze 4°C.

Następnie, mózgowia krojono seryjnie na kriostacie Jung 1800 (Leica, Niemcy) w płaszczyźnie czołowej na skrawki o grubości 40 µm. Preparaty obejmujące badane struktury wybierano w oparciu o atlas stereotaktyczny mózgowia szczura [180,181].

W przypadku przedmurza wydzielono trzy okolice (ryc. 5). Część przednia (Cla) była barwiona i oceniana na przekrojach +2,7 mm względem Bregmy, gdzie widoczne były kleszcze mniejsze ciała modelowatego oraz na przekrojach +1,2 mm, gdzie występowała część przednia spoidła przedniego (aca). Część środkowa

(Clc) analizowana była na przekrojach gdzie obecne było spoidło przednie (ac), - 0,26 mm względem Bregmy. Część tylna (Clp) analizowana była na przekrojach gdzie obecna była część grzbietowa hipokampa (Bregma-1,3 mm).

W obrębie jądra śródgruszkowego grzbietowego wyróżniono dwie części: przednią i tylną (ryc. 5). Część przednia (DEna) była barwiona i oceniana na przekrojach gdzie obecne było przedmurze (+1,2 mm, -0,26 mm, -1,3 mm względem Bregmy). Część tylna (DEnp) była analizowana na przekrojach gdzie obecny był kompleks podstawno-boczny ciała migdałowatego (-2,12 mm od Bregmy).

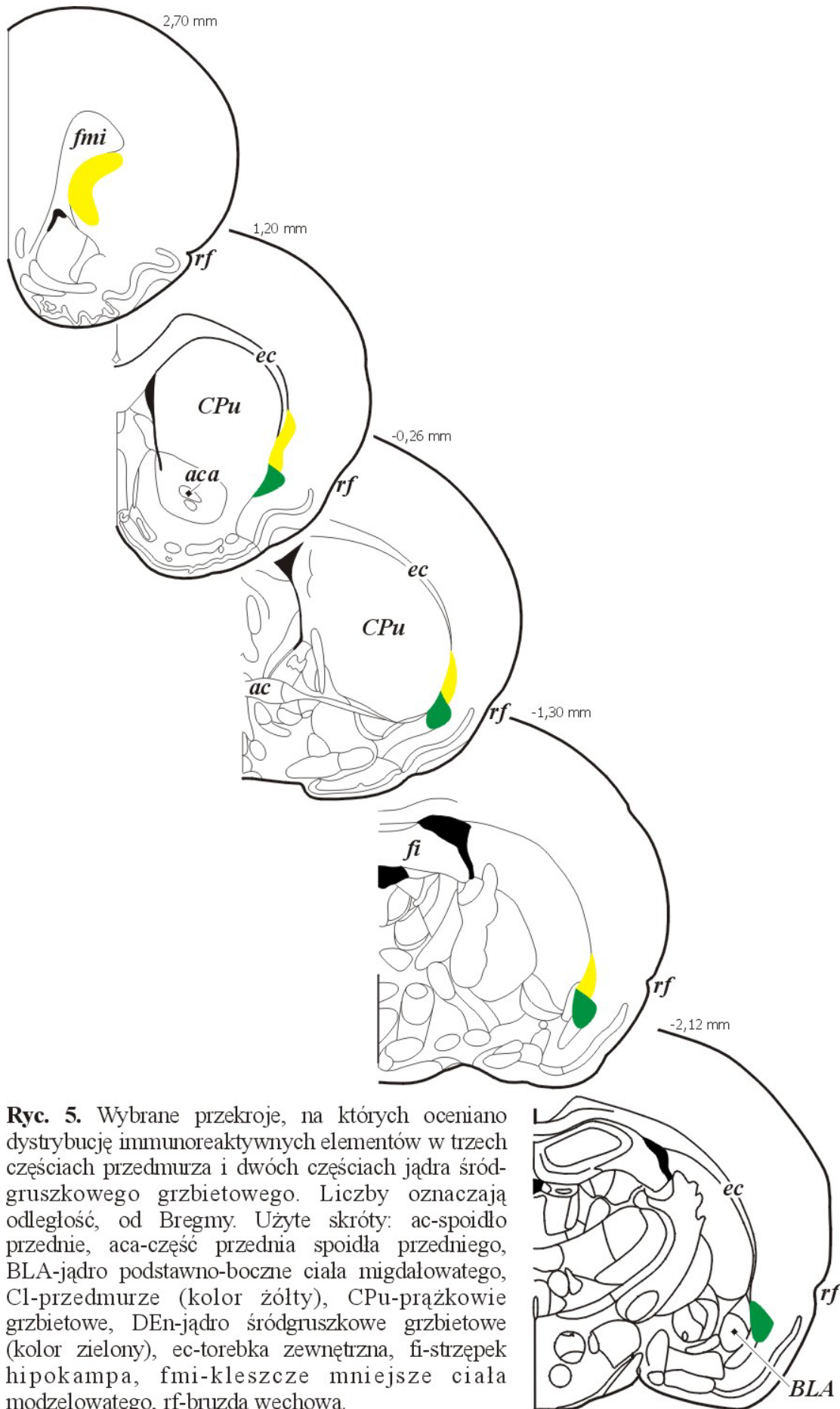
Wybrane z określonych poziomów preparaty poddawano dalszym barwieniom immunohistochemicznym oraz fioletem krezyłu.

Barwienia fioletem krezyłu przeprowadzono w celu określenia położenia struktur mózgowych oraz oceny gęstości i rozmieszczenia neuronów (ryc. 6).

W przypadku barwień z użyciem p-ciała anty-GABA, po zakończeniu perfuzji, mózgowia były wyjmowane z czaszek i dotrwalały przez 2,5 godziny w utrwalaczu. Następnie umieszczono je w wibratomie Pelco 101 (Ted Pella Inc, USA) i cięto w płaszczyźnie czołowej na skrawki o grubości 40  $\mu\text{m}$ . Preparaty z opisanych powyżej poziomów umieszczano w dołkach wypełnionych 0,01M PBS o pH 7,4 i poddawano dalszym barwieniom immunohistochemicznym.

### **3.2.2 Procedura stereotaktycznego podania znacznika aksonalnego**

Zabiegowi operacyjnemu poddano cztery dorosłe szczury rasy Wistar. Zwierzęta znieczulono podając domięśniowo Ketaminę (50 mg/kg m.c.) i Ksylazynę (10 mg/kg m.c.), a następnie umieszczono w aparacie stereotaktycznym i z zachowaniem zasad aseptyki chirurgicznej, wykonywano kraniektomię w miejscu wyznaczonym na podstawie atlasu stereotaktycznego szczura [180,181]. Po przecięciu opony twardej i odsłonięciu kory ruchowej podano znacznik fluorescencyjny Fluoro-Gold (FG) (Fluorochrome Inc., USA). Do podań jontoforetycznych przygotowano 2% roztwór FG w 0,9% NaCl. Znacznik ten, stosowany w badaniach ośrodkowego jak i obwodowego układu nerwowego, przenoszony jest drogą wstecznego transportu aksonalnego. W postaci ziarnistości,



**Ryc. 5.** Wybrane przekroje, na których oceniano dystrybucję immunoreaktywnych elementów w trzech częściach przedmurza i dwóch częściach jądra śródgruszkowego grzbietowego. Liczby oznaczają odległość, od Bregmy. Użyte skróty: ac-spojidło przednie, aca-część przednia spoidła przedniego, BLA-jądro podstawno-boczne ciała migdałowatego, CI-przedmurze (kolor żółty), CPu-prążkowie grzbietowe, DEN-jądro śródgruszkowe grzbietowe (kolor zielony), ec-torebka zewnętrzna, fi-strzępek hipokampa, fmi-kleszcze mniejsze ciała modzelowatego, rf-bruzda węchowa.

lokalizuje się głównie w cytoplazmie ciała komórkowego i w początkowych odcinkach wypustek, dzięki czemu uwidacznia on ciało komórki nerwowej wraz z początkowymi odcinkami dendrytów.

Jako metodę podania zastosowano jontoforezę. W odróżnieniu od metody tradycyjnej – ciśnieniowej – można uzyskać w niej dużo precyzyjniejsze podania oraz uniknąć znacznego zniszczenia mózgowia w okolicy podania.

Do podań wykorzystano kapilary (średnica zewnętrzna 1,2 mm, Word Precision Instruments, USA), które wyciągano na wyciągarce APP -1 (Stoelting Co., USA) uzyskując ostatecznie kapilary o średnicy wewnętrznej 20 – 25  $\mu\text{m}$ . Kapilary napełniały się samoistnie siłami włosowatości, po umieszczeniu ich końcówek w elektrolitowym roztworze znacznika. Całość umieszczono w temp. 4°C na okres ~2h. Po napełnieniu kapilara była umieszczona w aparacie sterotaktycznym. Podania dokonano aparatem Midgard (Stoelting Co., USA) przez okres 5-7 min przy zastosowaniu prądu stałego (7s włączony/7s przerwa) o natężeniu 5  $\mu\text{A}$ , biegun dodatni przyłączony był do srebrnego drucika zanurzonego w elektrolicie kapilary, biegun ujemny był podłączony do najbliższego dogodnego fragmentu skóry blisko wejścia kapilary, aparat stereotaktyczny był w pełni izolowany elektrycznie od otoczenia.

Użyty w badaniach transportu znacznik fluorescencyjny Fluoro-Gold był pobudzony do fluorescencji, promieniowaniem ultrafioletowym przy długości fali wzbudzenia 323 – 365 nm.

Po zakończeniu procedury podania znacznika i kontroli hemostazy, ranę operacyjną zszyto warstwowo, zabezpieczono antybiotykiem oraz opatrunkiem.

Po 5-7 dniowym okresie przeżycia pooperacyjnego, zwierzęta uśmiercono letalną dawką środków nasennych, następnie poddawano procedurze standardowego utrwalania uprzednio opisanej. Kolejnym krokiem było wyjęcie z czaszek mózgowi, odwodnienie i cięcie w płaszczyźnie czołowej przy użyciu kryostatu Jung 1800 (Leica, Niemcy) na skrawki grubości 40  $\mu\text{m}$ .

Przed przystąpieniem do procedury immunohistochemicznej podania do kory ruchowej były weryfikowane obecnością wyznakowanych wstecznie komórek w odpowiednich jądrach: brzuszny boczny wzgórze i brzuszny przyśrodkowy wzgórze (VL, VM). Objętość podania znacznika wynosiła średnio  $0,64 \pm 0,21 \text{ mm}^3$ .

### 3.2.3 Barwienia immunohistochemiczne

#### 3.2.3.1 Barwienia pojedyncze

W przypadku barwień na obecność PV, CB i CR wolnopływające skrawki mrożeniowe, płukano w 0,01M PBS (pH 7,4), a następnie, aby zablokować niespecyficzne antygeny poddawano je działaniu 3% roztworu surowicy koziej z dodatkiem 0,3% Tritonu X-100 w 0,01M PBS (60 min. w temperaturze pokojowej).

W kolejnym etapie preparaty były inkubowane z przeciwciałami pierwotnymi, rozpuszczonymi w 3% roztworze surowicy koziej z dodatkiem 0,1% Tritonu X-100 w 0,01M PBS (3 doby w temperaturze 4°C). Triton X-100 zastosowano, aby zwiększyć penetrację przeciwciał.

*Tabela II. Przeciwciała pierwotne i odpowiadające im przeciwciała wtórne zastosowane w badaniach pojedynczych.*

Przeciwciała pierwotne			Przeciwciała wtórne		
Nazwa	Producent	Stężenie	Nazwa	Producent	Stężenie
monoklonalne mysie anty-PV	Sigma P3088	1:1000	kozye anty-mysie Cy <sup>3</sup>	Jackson Imm. 115-165-146	1:800
monoklonalne mysie anty-CB D-28k	Sigma C-9848	1:2000			
poliklonalne królicze anty-CR	Chemicon AB 149	1:1000	kozye anty-królicze Cy <sup>3</sup>	Jackson Imm. 111-165-144	1:800
poliklonalne królicze anty-GABA	Chemicon AB 131	1:800			

Po inkubacji preparaty zostały trzykrotnie wypłukane w 0,01M PBS, a następnie inkubowane w 3% roztworze surowicy koziej zawierającym przeciwciała wtórne sprzężone z indokarbocjaniną – Cy<sup>3</sup> (2 godziny w temperaturze pokojowej).

W przypadku barwień na obecność GABA wolnopływające skrawki płukano kolejno w 0,01M PBS (pH 7,4), 1% roztworze borowodoru sodu i ponownie w

0,01M PBS. Następnie poddawano je działaniu 10% roztworu surowicy koziej w 0,01M PBS z dodatkiem 0,2% Tritonu X-100 (60 min. w temperaturze pokojowej).

W kolejnym etapie preparaty były inkubowane z przeciwciałem pierwotnym, rozpuszczonym w 10% roztworze surowicy koziej w 0,01M PBS (2 doby w temperaturze 4°C).

Następnie po kilkakrotnym płukaniu w 0,01M PBS skrawki inkubowano w 10% roztworze surowicy koziej z przeciwciałem wtórnym sprzężonym z Cy3. Specyfikacje i stężenia użytych przeciwciał przedstawia tabela II.

Następnie po kilkakrotnym płukaniu w 0,01M PBS wybarwione skrawki umieszczano na szkiełkach podstawowych i po całkowitym wysuszeniu w temperaturze pokojowej zatapiano w żelatynie Keisera (Merck, Niemcy) i skrywano szkiełkami nakrywkowymi.

### **3.2.3.2 Barwienia podwójne**

#### **Metodyka barwień podwójnych: PV z CR oraz CB z CR**

Wolnopływające preparaty kilkakrotnie płukano w 0,01M PBS (pH 7,4) a następnie poddawano działaniu 3% roztworu surowicy koziej z dodatkiem 0,3% Tritonu X-100 w 0,01M PBS (60 min. w temperaturze pokojowej).

W kolejnym etapie preparaty były inkubowane z mieszaniną przeciwciał pierwotnych, rozpuszczonych w 3% roztworze surowicy koziej z dodatkiem 0,1% Tritonu X-100 w 0,01M PBS (3 doby w temperaturze 4°C). Po kilkakrotnym płukaniu w 0,01M PBS skrawki były inkubowane w 3% roztworze surowicy koziej z mieszaniną odpowiednich przeciwciał wtórnych sprzężonych z różnymi fluorochromami (2 godziny w temperaturze pokojowej).

Wykonano szereg prób krzyżowych z zastosowaniem różnych kombinacji przeciwciał. Dobór dwóch przeciwciał pierwotnych odbywał się zgodnie z zasadą, że muszą one pochodzić od innego gospodarza (tzn. muszą być immunizowane na różnych gatunkach zwierząt). Dobór dwóch przeciwciał wtórnych odbywał się zgodnie z zasadami, że oba przeciwciała musiały pochodzić od tego samego gospodarza, (tzn. musiały być immunizowane na tym samym gatunku, różnym od gospodarzy przeciwciał pierwotnych) i każde z przeciwciał musiało być

wyznakowane innym fluorochromem. Najlepsze efekty otrzymano po inkubacji skrawków w mieszaninie przeciwciał, które zostały scharakteryzowane w tabeli III.

*Tabela III. Przeciwciała pierwotne i odpowiednie przeciwciała wtórne zastosowane w badaniach.*

Przeciwciała pierwotne			Przeciwciała wtórne		
Nazwa	Producent	Stężenie	Nazwa	Producent	Stężenie
monoklonalne mysie anty- PV	Sigma P3088	1:500	kozy anty-mysie Cy <sup>3</sup>	Jackson Imm. 115-165-146	1:800
poliklonalne królicze anty- CR	Chemicon AB 149	1:500	kozy anty-królicze Alexa 488	Molecular Probs A-11008	1:200
monoklonalne mysie anty- CB D-28k	Sigma C-9848	1:1000	kozy anty-mysie Cy <sup>3</sup>	Jackson Imm. 115-165-146	1:800
poliklonalne królicze anty- CR	Chemicon AB 149	1:500	kozy anty-królicze Alexa 488	Molecular Probs A-11008	1:200

Wybarwione skrawki po kilkakrotnym płukaniu w 0,01M PBS umieszczano na szkiełkach podstawowych i po całkowitym wysuszeniu w temperaturze pokojowej zatapiano w żelatynie Keisera (Merck, Niemcy) i skrywano szkiełkiem nakrywkowym.

#### **Metodyka barwień podwójnych: GABA z PV, GABA z CB, GABA z CR**

Wolnopływające skrawki płukano kolejno w 0,01M PBS (pH 7,4), 1% roztworze borowodorku sodu i ponownie w 0,01M PBS. Następnie poddawano je działaniu 10% roztworu surowicy koziej (w przypadku barwień: GABA z PV oraz GABA z CB) lub 10% roztworu surowicy oślej (w przypadku barwień GABA z CR) w 0,01M PBS z dodatkiem 0,2% Tritonu X-100 (60 min. w temperaturze pokojowej).

W kolejnym etapie preparaty były inkubowane z mieszaniną przeciwciał pierwotnych, rozpuszczonych odpowiednio w 10% roztworze surowicy koziej lub oślej w 0,01M PBS (2 doby w temperaturze 4°C).

Następnie po kilkakrotnym płukaniu w 0,01M PBS skrawki inkubowano w 10% roztworze surowicy koziej lub oślej z mieszaniną odpowiednich przeciwciał wtórnych sprzężonych z różnymi fluorochromami. Dobór przeciwciał odbywał się zgodnie z opisanymi wcześniej zasadami doboru przeciwciał w badaniach podwójnych. Najlepsze efekty uzyskano po zastosowaniu mieszanin p-ciał opisanych w tabeli IV.

*Tabela IV. Przeciwciała pierwotne i odpowiednie przeciwciała wtórne zastosowane w badaniach z użyciem przeciwciała anty-GABA.*

Przeciwciała pierwotne			Przeciwciała wtórne		
Nazwa	Producent	Stężenie	Nazwa	Producent	Stężenie
poliklonalne królicze anty- GABA	Chemicon AB 131	1:500	kozy anty-królicze Cy <sup>3</sup>	Jackson Imm. 111-165-144	1:800
monoklonalne mysie anty- PV	Sigma P3088	1:500	kozy anty-mysie Alexa 488	Molecular Probs A-11001	1:200
poliklonalne królicze anty- GABA	Chemicon AB 131	1:500	kozy anty-królicze Cy <sup>3</sup>	Jackson Imm. 111-165-144	1:800
monoklonalne mysie anty- CB D-28k	Sigma C-9848	1:1000	kozy anty-mysie Alexa 488	Molecular Probs A-11001	1:200
poliklonalne królicze anty- GABA	Chemicon AB 131	1:500	ośle anty-królicze Cy <sup>3</sup>	Jackson Imm. 711-165-152	1:800
poliklonalne kozie anty- CR	Chemicon AB 149	1:500	ośle anty-kozy Alexa 488	Molecular Probes A-11055	1:200



Wybarwione preparaty po kilkukrotnym płukaniu w 0,01M PBS umieszczano na szkiełkach podstawowych i po całkowitym wysuszeniu w temperaturze pokojowej zatapiano w żelatynie Keisera (Merck, Niemcy) i skrywano szkiełkiem nakrywkowym.

### **Metodyka barwień podwójnych: FG z PV, FG z CB, FG z CR**

Wolnopływające skrawki mrożeniowe trzykrotnie płukano w 0,01M PBS (pH 7,4), następnie były poddawane działaniu 3% roztworu surowicy koziej (w przypadku barwień FG z PV oraz FG z CB) lub 3% roztworu surowicy ośle (w przypadku barwień FG z CR) z dodatkiem 0,3% Tritonu X-100 w 0,01M PBS (60min. w temperaturze pokojowej).

W kolejnym etapie preparaty były inkubowane z mieszaniną przeciwciał pierwotnych, rozpuszczonych odpowiednio w 3% roztworze surowicy koziej lub ośle z dodatkiem 0,1% Tritonu X-100 w 0,01M PBS (3 doby w temperaturze 4°C).

Po kilkukrotnym płukaniu w 0,01M PBS skrawki były inkubowane w 3% roztworze surowicy koziej lub ośle z mieszaniną odpowiednich przeciwciał wtórnych związanych z różnymi fluorochromami (2 godziny w temperaturze pokojowej). Specyfikacje i stężenia użytych przeciwciał zawiera tabela V.

Wybarwione preparaty histologiczne po kilkukrotnym płukaniu w 0,01M PBS umieszczano na szkiełkach podstawowych i po całkowitym wysuszeniu w temperaturze pokojowej zatapiano w żelatynie Keisera (Merck, Niemcy) i skrywano szkiełkiem nakrywkowym.

*Tabela V. Przeciwciała pierwotne i odpowiednie przeciwciała wtórne zastosowane w badaniach z użyciem znacznika FG.*

Przeciwciała pierwotne			Przeciwciała wtórne		
Nazwa	Producent	Stężenie	Nazwa	Producent	Stężenie
poliklonalne królicze anty-FG	Chemicon AB 153	1:5000	kozy anty-królicze Cy <sup>3</sup>	Jackson Imm. 111-165-144	1:800
monoklonalne mysie anty-PV	Sigma P3088	1:500	kozy anty-mysie Alexa 488	Molecular Probs A-11001	1:200
poliklonalne królicze anty-FG	Chemicon AB 153	1:5000	kozy anty-królicze Cy <sup>3</sup>	Jackson Imm. 111-165-144	1:800
monoklonalne mysie anty-CB D-28k	Sigma C-9848	1:1000	kozy anty-mysie Alexa 488	Molecular Probs A-11001	1:200
poliklonalne królicze anty-FG	Chemicon AB 153	1:5000	ośle anty-królicze Cy <sup>3</sup>	Jackson Imm. 711-165-152	1:800
poliklonalne kozie anty-CR	Chemicon AB 149	1:500	ośle anty-kozy Alexa 488	Molecular Probes A-11055	1:200

### **3.3 Sprzęt użyty do dalszych analiz**

#### **Barwienia pojedyncze**

Uzyskane według powyższych procedur preparaty histologiczne oglądano i oceniano przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego Leica DMLB (Leica, Niemcy) oraz mikroskopu fluorescencyjnego BX51 TF (Olympus, Japonia) sprzężonego z systemem C.A.S.T.Grid (Olympus, Dania).

## **Barwienia podwójne**

Analizę wszystkich wybarwionych podwójnie preparatów (PV z CR oraz CB z CR jak również GABA z PV, GABA z CB, GABA z CR oraz FG z PV, FG z CB, FG z CR) wykonano przy użyciu systemu mikroskopii konfokalnej składającego się z mikroskopu Eclipse E600 (Nikon, Japonia), głowicy Radiance 2100 (Bio-Rad, Wielka Brytania). Źródłem światła był laser kryptonowo-argonowy, który przy zastosowaniu odpowiednich filtrów emitował monochromatyczną wiązkę światła o długości fali 488 lub 564 nm wzbudzającą świecenie odpowiednio fluorochromem Alexa 488 lub Cy<sup>3</sup>. Użycie mikroskopii konfokalnej pozwoliło na wiarygodną i rzetelną ocenę stopnia współwystępowania (kolokalizacji) badanych znaczników w tych samych komórkach jak i ocenę immunoreaktywnych włókien i zakończeń.

### **3.4 Analiza morfologiczna**

Na preparatach oceniano rozmieszczenie i morfologię neuronów PV-, CB-, CR- i GABA-pozytywnych oraz immunoreaktywnego neuropilu (punkty oraz włókna) w badanych strukturach, oraz w przypadku barwień podwójnych wzajemny stosunek immunoreaktywnych elementów.

### **3.5 Analiza ilościowa**

#### **3.5.1 Przygotowanie danych**

##### **Barwienia pojedyncze**

W przypadku barwień na obecność PV, CB i CR oraz barwień fioletem krezyłu obliczono ilość wyznakowanych w poszczególnych barwieniach profili komórkowych przypadających na jednostkę pola testowego badanej struktury. Pod obiektywem x 20 ustalono wielkość pola testowego. Zarówno dla preparatów barwionych fioletem krezyłu jak i metodą immunohistochemiczną – wynosiło ono 6294,7  $\mu\text{m}^2$ .

Przy zastosowaniu obiektywu 4x (N.A. 1,3) obrysowywano granice struktur w każdym barwieniu na każdym z pięciu ustalonych poziomów w stosunku do Bregmy (+2,70mm, +1,20mm, -0,26mm, -1,30mm, -2,12mm).

U każdego zwierzęcia liczone wybarwione profile komórkowe w co najmniej dziesięciu polach testowych wybranych w sposób systematycznie losowy, znajdujących się na kolejnych poziomach przechodzących przez badane struktury. Podczas liczenia profili komórkowych wybarwionych metodą immunohistochemiczną na podstawie kryteriów morfologicznych, klasyfikowano je do poszczególnych typów.

Otrzymane dane pozwoliły na przeprowadzenie dokładnej analizy różnic między poszczególnymi poziomami badanych struktur (przedniej, środkowej i tylnej części przedmurza, oraz przedniej i tylnej części jądra śródgruszkowego grzbietowego). Różnice te dotyczyły liczby neuronów przypadających na jednostkę pola testowego jak również typów morfologicznych neuronów.

W poszczególnych częściach CI i DEn określono następujące parametry: gęstość neuronów (na podstawie barwienia fioletem krezyłu) oraz gęstość wyznakowanych neuronów PV-, CB- i CR-pozytywnych (na podstawie pojedynczych barwień).

W kolejnym etapie pracy na podstawie otrzymanych wyników dotyczących ilości wyznakowanych pojedynczo neuronów w polu testowym oraz ilości wszystkich neuronów w barwieniu fioletem krezyłu dokonano oszacowania procentowych udziałów badanych subpopulacji neuronalnych zawierających białka wiążące wapń.

### **Barwienia podwójne**

Do powyższej analizy wzięto pod uwagę pola testowe zawierające możliwie największą liczbę komórek, ze zwróceniem uwagi na ich dokładną lokalizację w obrębie badanych struktur. W tych samych polach testowych po uprzednim sprawdzeniu stopnia penetracji skrawka przez oba przeciwciała liczone komórki każdej z pojedynczo wyznakowanych subpopulacji oraz komórki wyznakowane podwójnie.

Dodatkowo w badanych polach testowych na ekranie monitora przy zastosowaniu trybu wysokiej rozdzielczości karty graficznej obrysowywano, przy użyciu myszy, wyznakowane na obecność PV, CB, CR i GABA komórki. Użycie programu do analizy obrazu z mikroskopu konfokalnego (LaserPix v. 4.1., BioRad,

Wielka Brytania) umożliwiło oszacowanie parametrów morfometrycznych charakteryzujących wyznakowane komórki (pole przekroju, długości osi). Równocześnie z obrysowywaniem wyznakowanych komórek klasyfikowano komórki GABA-ir pod względem cech na przynależące do określonego typu morfologicznego.

### **3.5.2 Obróbka danych i analiza statystyczna**

Otrzymane dane morfometryczne poddano analizie statystycznej – wykonując odpowiednie testy. W oparciu o dane źródłowe wykonano, za pomocą arkusza kalkulacyjnego Excel (Microsoft, Polska), obliczenia wartości średnich oraz odchyłeń standardowych ( $\pm$  SD). Różnice w gęstościach neuronów między poszczególnymi częściami struktur, lub między zwierzętami oceniono wykonując analizę wariancji (ANOVA). Różnice w rozkładach typów komórek jak również ich wielkości między strukturami lub ich częściami zbadano testem  $\chi^2$ . Do oceny istotności różnic stopnia współwystępowania badanych substancji użyto testu dla istotności różnic wskaźników struktury.

Wszystkie testy statystyczne wykonane zostały przy pomocy programu Statistica for Windows v. 5.0 (Statsoft, USA) oraz arkusza kalkulacyjnego Excel (Microsoft, Polska). Wnioskowanie statystyczne przeprowadzono na poziomie istotności  $p=0,05$ .

## 4 WYNIKI

### 4.1 *Badania gęstości neuronów w przedmurzu i jądrze śródgruszkowym grzbietowym na preparatach barwionych fioletem krezyłu*

W celu określenia jaki procent neuronów przedmurza i jądra śródgruszkowego grzbietowego stanowią komórki PV-, CB-, CR-pozytywne obliczono gęstość neuronów u czterech badanych zwierząt w wyróżnionych częściach CI i DEn na preparatach barwionych fioletem krezyłu (ryc. 6). Wyniki zamieszczono w tabelach VI i VII.

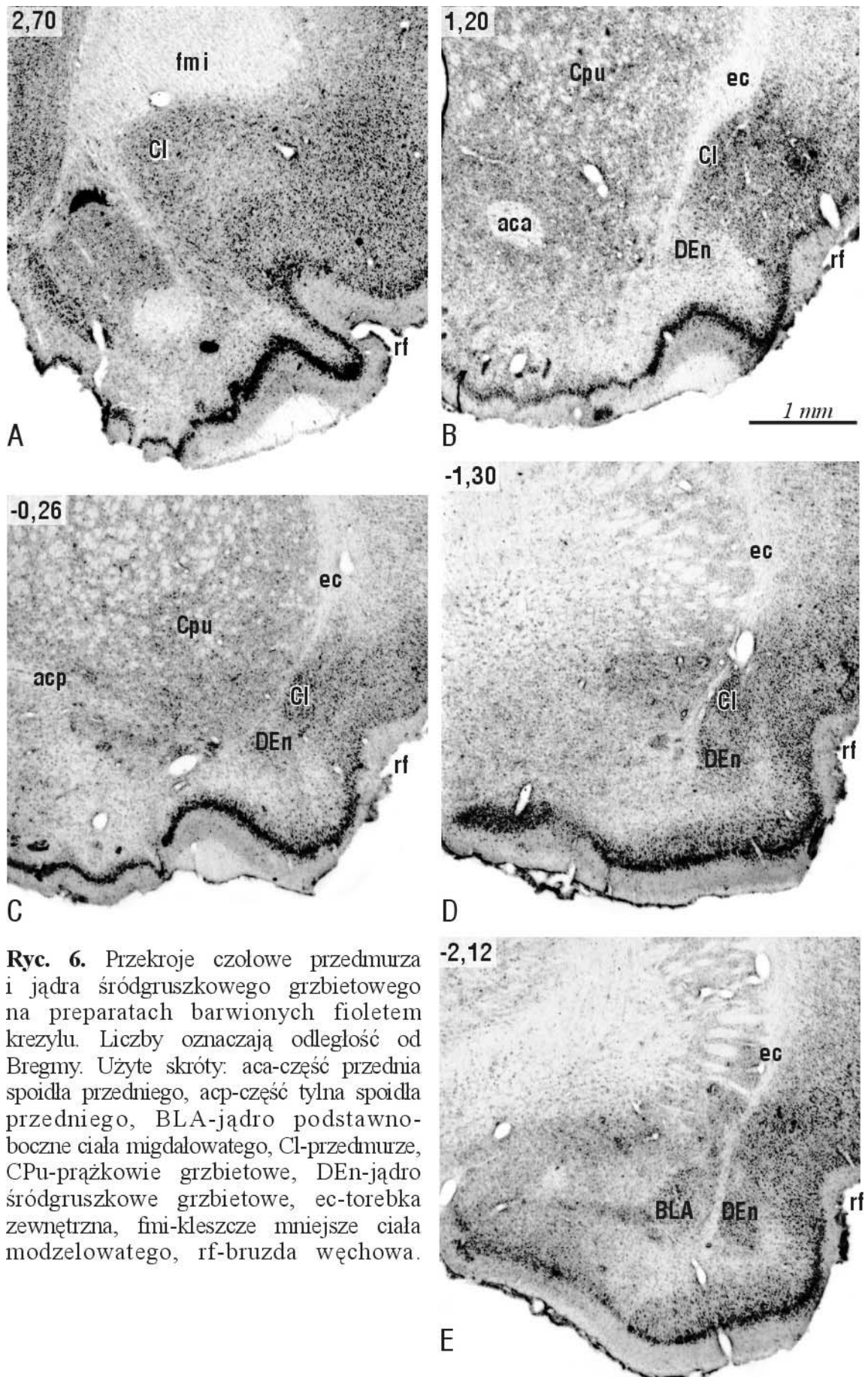
*Tabela VI. Gęstości neuronów w przedmurzu i jądrze śródgruszkowym grzbietowym u badanych zwierząt*

Zwierzę	Gęstość neuronów na mm <sup>2</sup> (±SD)	
	Przedmurze	Jądro śródgruszkowe grzbietowe
R2	2158 ± 166	1815 ± 169
R3	2125 ± 394	1776 ± 257
R4	2330 ± 327	1802 ± 115

Porównanie uzyskanych wyników między zwierzętami wykazało, że badane zwierzęta nie różniły się statystycznie istotnie ilością komórek przypadających na jednostkę pola testowego zarówno w przypadku przedmurza jak i jądra śródgruszkowego grzbietowego.

Analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic gęstości neuronów między poszczególnymi częściami zarówno w jądrze śródgruszkowym grzbietowym jak i w przedmurzu.

Wobec braku istotnych różnic oszacowano średnią gęstość neuronów w obu strukturach na wynoszącą: **2205 ± 338 /mm<sup>2</sup>** w przedmurzu i **1793 ± 190 /mm<sup>2</sup>** w jądrze śródgruszkowym grzbietowym. Porównanie gęstości w obu strukturach wykazało różnice istotne statystycznie.



**Ryc. 6.** Przekroje czołowe przedmurza i jądra śródgruszkowego grzbietowego na preparatach barwionych fioletem krezylu. Liczby oznaczają odległość od Bregmy. Użyte skróty: aca-część przednia spoidła przedniego, acp-część tylna spoidła przedniego, BLA-jądro podstawno-boczne ciała migdałowatego, Cl-przedmurze, Cpu-prążkowie grzbietowe, DEn-jądro śródgruszkowe grzbietowe, ec-torebka zewnętrzna, fmi-kleszcze mniejsze ciała modzelowatego, rf-bruzda węchowa.

*Tabela VII. Rozkład gęstości neuronów w poszczególnych częściach przedmurza i jądra śródgruszkowego grzbietowego*

Struktura/część	Gęstość neuronów na mm <sup>2</sup> (±SD)
Przedmurze	
część przednia	2057 ± 316
część środkowa	2243 ± 341
część tylna	2357 ± 323
Jądro śródgruszkowe grzbietowe	
część przednia	1830 ± 177
część tylna	1756 ± 207

#### **4.2 Charakterystyka immunoreaktywnych elementów zawierających CaBPs**

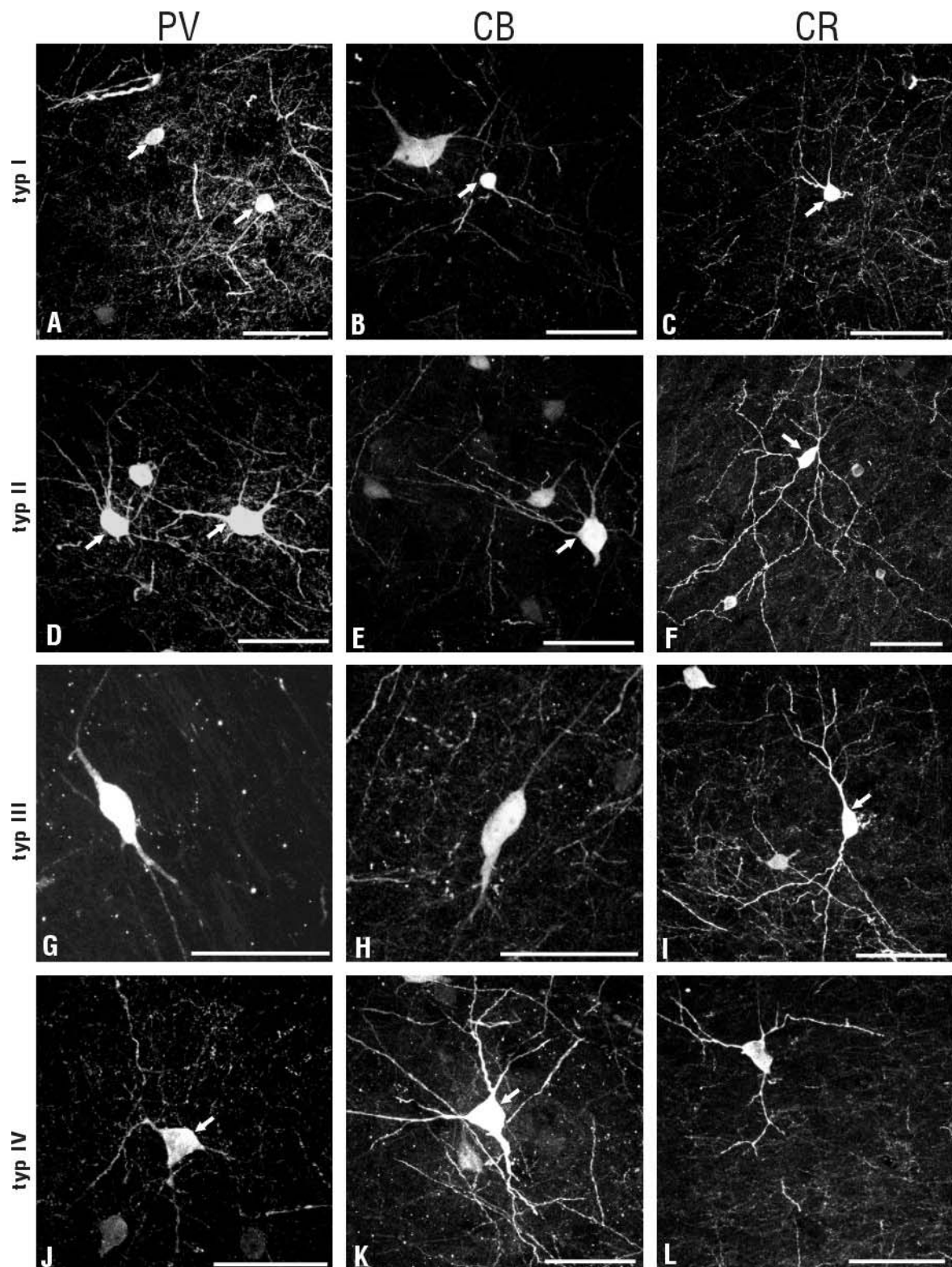
Po zastosowaniu technik immunohistochemicznych znakujących elementy zawierające CaBPs, w obu badanych strukturach uwidoczniły się: komórki, włókna i immunoreaktywne punkty odpowiadające zakończeniom synaptycznym.

Dokładna analiza komórek, w obu badanych strukturach, pozwoliła na wyodrębnienie czterech typów morfologicznych w każdej z badanych subpopulacji neuronów zawierających CaBPs: parwalbuminę, kalbindynę D-28k i kalretyninę (ryc. 7). Podział ten uwzględnia zarówno charakterystykę ciała komórki – jego kształt i wielkość, jak i drzewa dendrytycznego – sposób odejścia, liczbę i grubość wypustek. Nawiązuje on do podziału przyjętego przez Kemppainen i Pitkänen [103].

Do **typu I** (ryc. 7A-C) zakwalifikowano neurony małe z okrągłym lub owalnym ciałem komórki i z odchodzącymi wielobiegunowo 3–5 cienkimi wypustkami. Wypustki były równej grubości, a ich średnica nie zmieniała się na przebiegu.

**Typ II** (ryc. 7D-F) stanowiły średnie i duże neurony wieloboczne. Komórki te były również wielobiegunowe, posiadały od 3 do 5 wypustek, które w przeciwieństwie do wypustek komórek typu I były różnej grubości. Najgrubsza część wypustki znajdowała się przy ciele komórki zaś w miarę oddalania stawała się ona coraz cieńsza.





**Ryc. 7.** Typy morfologiczne komórek zawierających CaBPs, występujące w CI i DEn. Opis typów w tekście. Strzałki wskazują komórki przyporządkowane do danego typu. Odcinek podziałki = 50  $\mu\text{m}$ .

Do **typu III** (ryc. 7G-I) zaliczono małe i duże neurony z wypustkami odchodzącymi z dwóch przeciwległych biegunów. W obrębie typu III rozróżniono dwa podtypy komórek. IIIa o wrzecionowatym ciele komórkowym, obserwowane głównie wśród neuronów PV- i CB-ir (ryc. 7G,H) oraz IIIb neurony o owalnym ciele komórkowym, które były charakterystyczne jedynie dla CR-pozytywnych komórek (ryc. 7I).

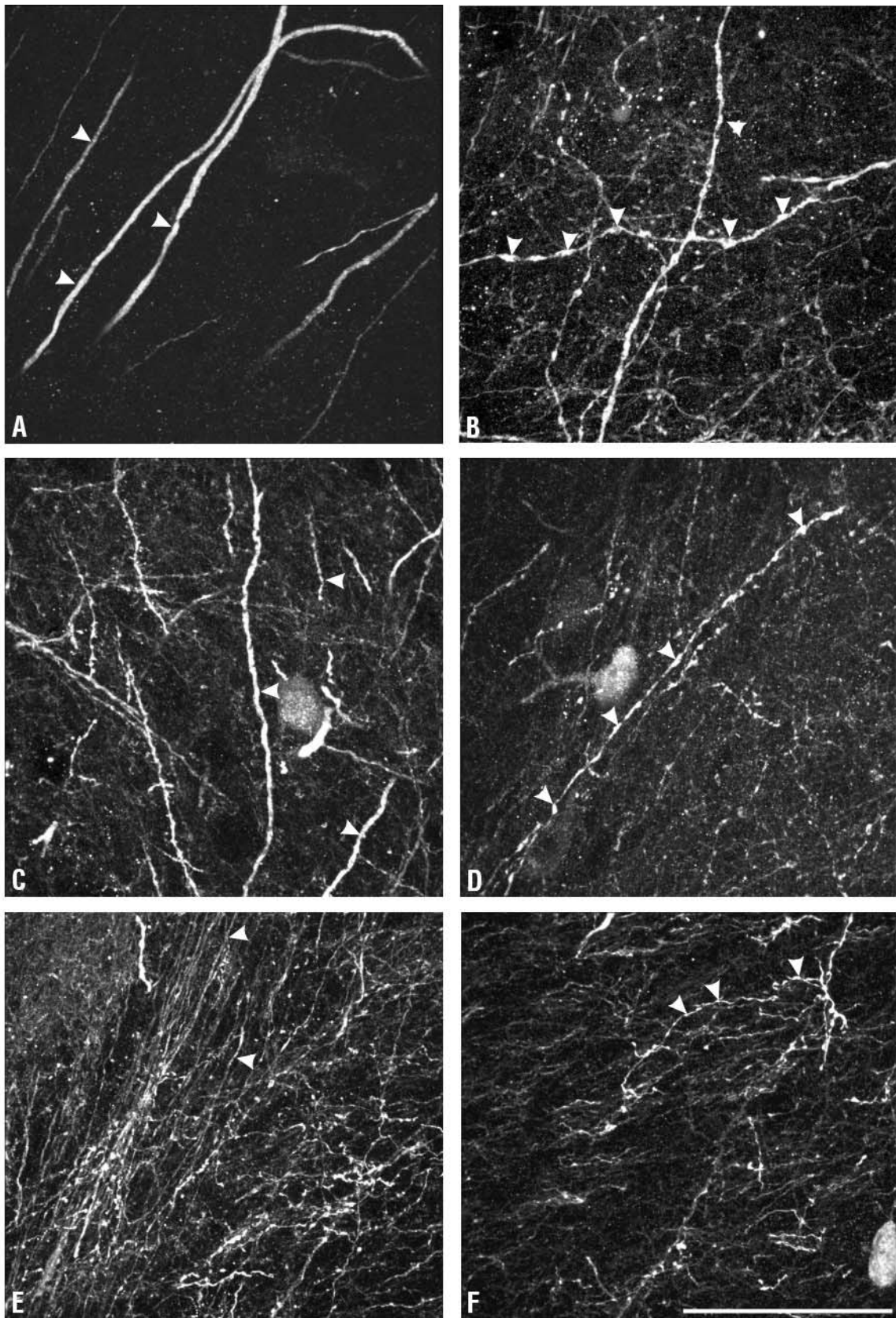
**Typ IV** (ryc. 7J-L) stanowiły duże, piramidopodobne neurony. Z trzech biegunów komórki odchodziły grube wypustki, które w miarę oddalania stawały się coraz cieńsze.

Analiza parametrów morfometrycznych rozróżnionych typów komórkowych pozwoliła na ustalenie pewnych prawidłowości. Wyniki zawarto w tabeli VIII.

*Tabela VIII. Parametry morfometryczne rozróżnionych typów komórkowych neuronów zawierających białka wiążące wapń*

Typ	Stosunek osi długiej do krótkiej ( $\pm$ SD)	Pole przekroju w $\mu\text{m}^2$ ( $\pm$ SD)
Typ I	1,33 $\pm$ 0,20	97 $\pm$ 32
Typ II	1,54 $\pm$ 0,33	152 $\pm$ 68
Typ III	1,88 $\pm$ 0,39	145 $\pm$ 37
Typ IV	1,38 $\pm$ 0,28	205 $\pm$ 79

Analiza statystyczna wykazała istotną różnicę w wielkości wyróżnionych typów neuronów (test  $\text{Chi}^2$ ,  $p < 0,05$ ). W największym stopniu dotyczyło to typu I, obejmującego znaczny odsetek neuronów małych, natomiast udział neuronów większych w tym typie był zdecydowanie najmniejszy. Średnia wielkość pola przekroju komórki tego typu wynosiła  $97 \pm 32 \mu\text{m}^2$ . Z kolei wśród neuronów typu IV dominowały neurony największe, a neurony małe stanowiły znikomą część. Średnia wielkość pola komórki tego typu wynosiła  $205 \pm 79 \mu\text{m}^2$ . Komórki typu II należały do najbardziej zróżnicowanych pod względem wielkości, współczynnik zmienności pola przekroju wynosił około 45%.



**Ryc. 8.** Morfologia włókien PV-ir (A, B), CB-ir(C, D), CR-ir (E, F), występujących w CI i DEN. Groty wskazują włókna gładkie (A, C, E) oraz włókna z żylakowatościami (B, D, F). Odcinek podziałki = 50  $\mu\text{m}$ .

Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała również istotne różnice stosunku osi długiej do krótkiej wśród wyróżnionych typów neuronów (test  $\chi^2$ ,  $p < 0,05$ ). Średnia wartość tego stosunku dla komórek typu I wyniosła  $1,33 \pm 0,20$  co wskazuje na podobieństwo przekroju komórek tego typu do koła. Zupełnie odmiennie prezentuje się powyższy wskaźnik dla neuronów typu III, gdzie jego dość wysoka wartość  $1,88 \pm 0,39$  wskazuje na bardziej wydłużony, wrzecionowaty kształt ciała komórki.

W obrębie wyznakowanych włókien zawierających CaBPs można było rozróżnić dwie subpopulacje (ryc. 8). Liczniejszą stanowiły włókna gładkie, których średnica nie zmieniała się na przebiegu (ryc. 8A, C, E). Drugą subpopulację stanowiły włókna z żyłakowatymi rozszerzeniami (ryc. 8B, D, F). Żyłakowate rozszerzenia występowały najczęściej na przebiegu pojedynczego włókna. Znacznie rzadziej obserwowano je w miejscu podziału włókna na gałęzie.

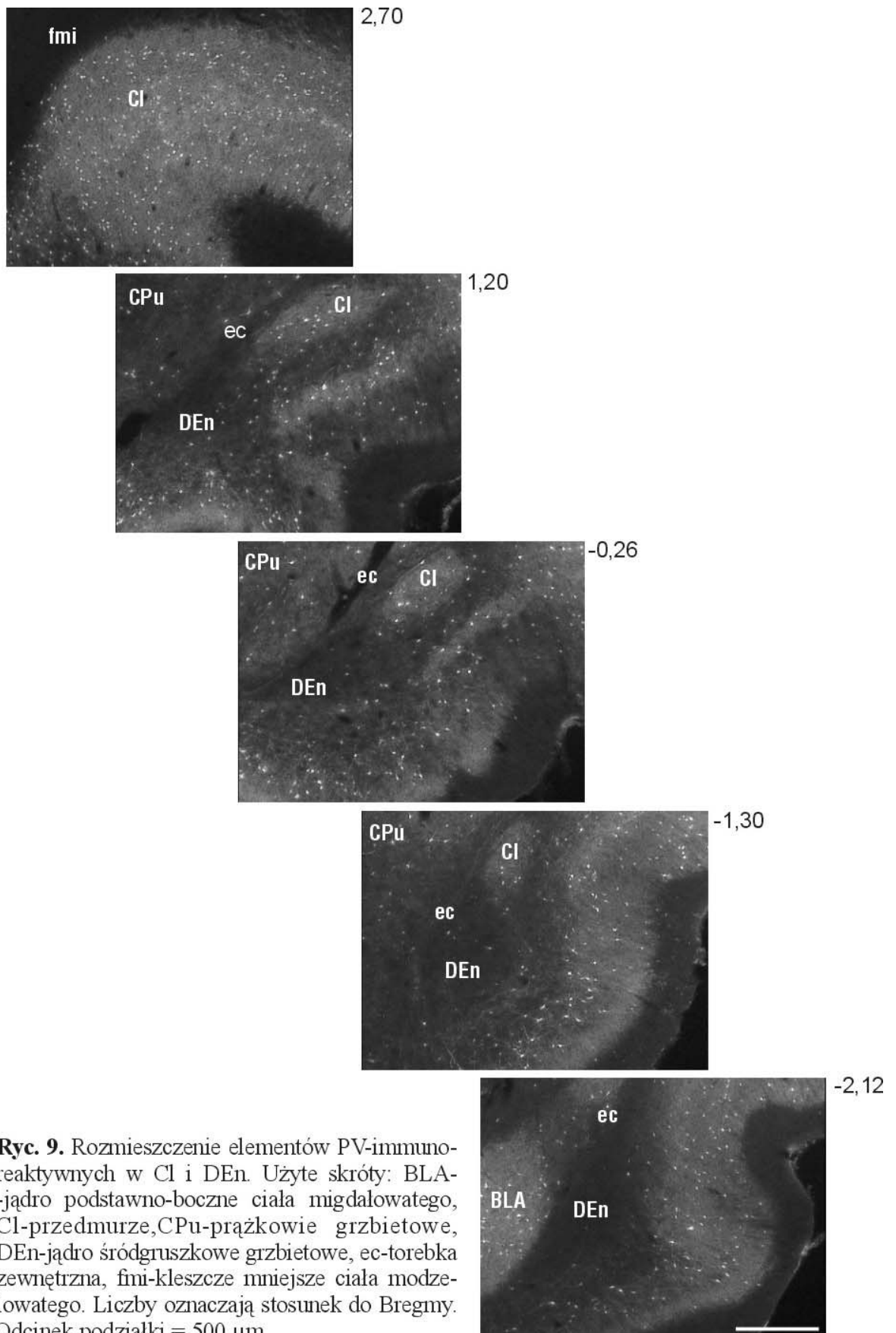
Zarówno grubość włókien, jak i ich przebieg były bardzo zróżnicowane. W wielu przypadkach zależały od typu białka i od badanej struktury. Włókna zawierające PV i CB charakteryzowały się zbliżoną grubością i przebiegiem, natomiast włókna zawierające CR były zdecydowanie cieńsze i miały odmienny przebieg.

Niektóre włókna układały się w sieci i wspólnie z zakończeniami otaczały ciała niewyznakowanych komórek, biorąc udział w tworzeniu tzw. koszyczków.

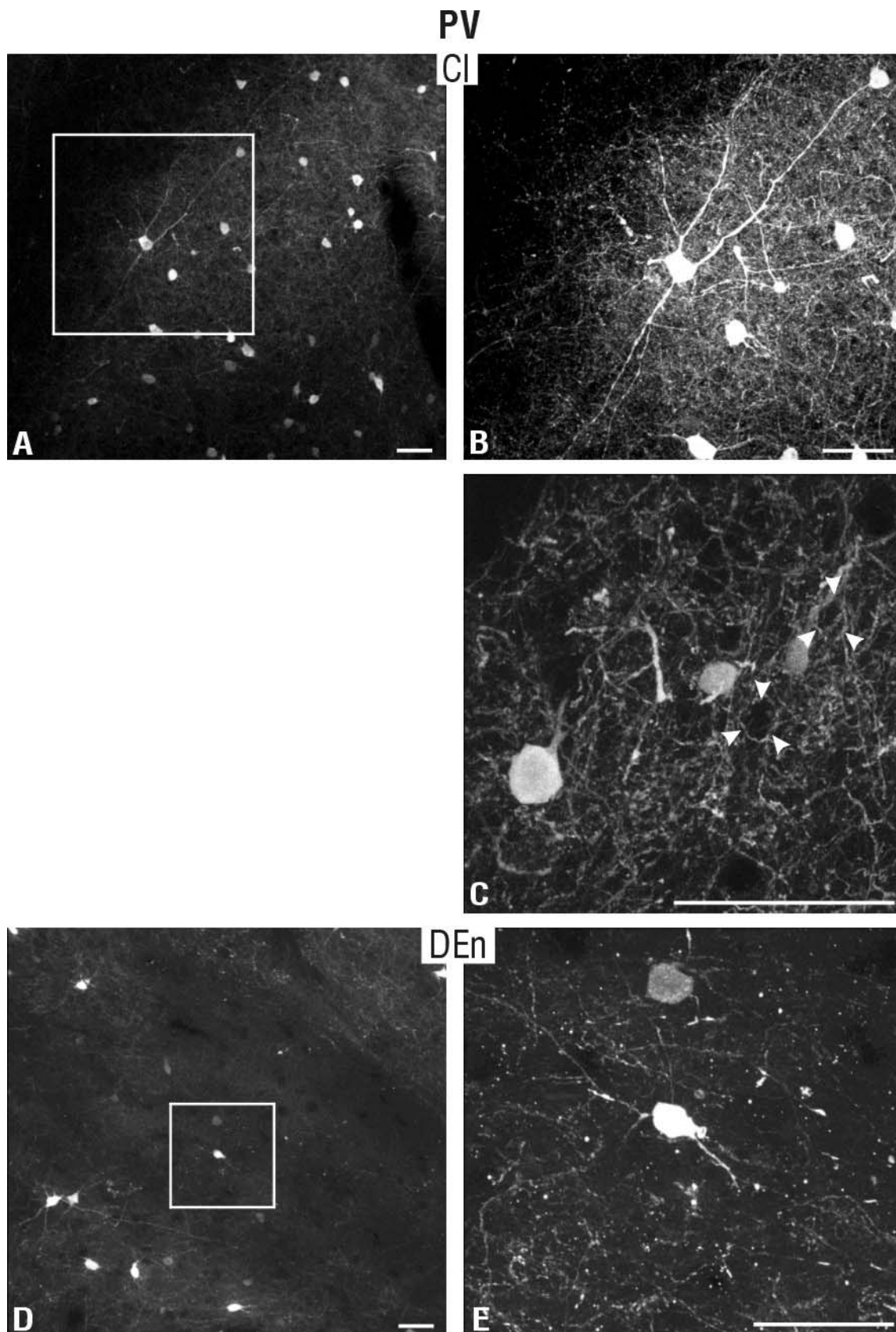
#### **4.2.1 Charakterystyka PV-immunoreaktywnych elementów w przedmurzu i jądrze śródgruszkowym grzbietowym**

##### **4.2.1.1 Badania jakościowe**

W przedmurzu przeciwciała anty-PV bardzo intensywnie wyznakowało neuropil, dzięki czemu z łatwością można było wyznaczyć granice tej struktury (ryc. 9), gdyż sąsiadowała ona z obszarami o znacznie niższej PV-ir: kleszczami mniejszymi ciała modelowatego, torebką zewnętrzną, jądrem śródgruszkowym grzbietowym oraz głębokimi warstwami kory wyspowej. Zbliżoną do Cl immunoreaktywność wykazywały jedynie głębokie warstwy kory oczodołowej



**Ryc. 9.** Rozmieszczenie elementów PV-immunoreaktywnych w CI i DEn. Użyte skróty: BLA-jądro podstawno-boczne ciała migdałowatego, CI-przedmurze, CPu-prążkowie grzbietowe, DEn-jądro śródgruszkowe grzbietowe, ec-torebka zewnętrzna, fmi-kleszcze mniejsze ciała modzełowego. Liczby oznaczają stosunek do Bregmy. Odcinek podziałki = 500  $\mu$ m.



**Ryc. 10.** Ekspresja PV w przedmurzu (A, B, C) i jądrze śródgruszkowym grzbietowym (D, E). Groty wskazują koszyczki (C)-opis w tekście. Odcinek podziałki = 50  $\mu$ m.

(Bregma +2,7mm), co utrudniało wyznaczenie granicy bocznej części przedniej przedmurza.

Dość licznie występujące w obrębie przedmurza PV-pozytywne komórki były równomiernie rozmieszczone w jego poszczególnych częściach (ryc. 9, 10A). Komórki te posiadały intensywnie wyznakowane perykariony, oraz stosunkowo długie wypustki (ryc. 10B). Na przebiegu niektórych z nich widoczne były żyłakowate rozszerzenia. Zakończenia PV-ir lokalizowały się głównie w okolicy perykarionów niewybarwionych komórek i brały udział w tworzeniu koszyczków na ich powierzchni (ryc. 10C).

W porównaniu do Cl, w jądrze śródgruszkowym grzbietowym neuropil był wyznakowany bardzo słabo (ryc. 9, 10D,E). Wyznaczenie dokładnych granic DEn, za wyjątkiem granicy z przedmurzem, gdzie sieć włókien PV-pozytywnych była znacznie bogatsza (ryc. 9), było trudne, ponieważ sąsiadujące struktury: torebka zewnętrzna, warstwa III kory gruszkowej i jądro śródgruszkowe brzuszne posiadały zbliżoną immunoreaktywność. W obu częściach DEn komórki PV-pozytywne występowały sporadycznie. Drzewo dendrytyczne było znacznie słabiej widoczne (wypustki były obserwowane na znacznie krótszym przebiegu). W obszarze DEn obecne były obie subpopulacje PV-ir włókien – z żyłakowatościami oraz gładkie.

#### **4.2.1.2 Badania ilościowe**

Policzono gęstości neuronów PV-pozytywnych w przedmurzu i jądrze śródgruszkowym grzbietowym u czterech zwierząt. Wyniki przedstawiono w tabeli IX.

Porównanie uzyskanych wyników między zwierzętami wykazało, że badane zwierzęta nie różniły się statystycznie istotnie ilością komórek przypadających na jednostkę pola testowego zarówno w przypadku przedmurza jak i jądra śródgruszkowego grzbietowego.

Nie wykazano istnienia różnic statystycznie istotnych w gęstości wyznakowanych neuronów między poszczególnymi częściami przedmurza ani jądra śródgruszkowego grzbietowego.



Tabela IX. Gęstości neuronów PV-pozytywnych w przedmurzu i jądrze śródgruszkowym grzbietowym u badanych zwierząt.

Zwierzę	Gęstość neuronów na mm <sup>2</sup> (±SD)	
	Przedmurze	Jądro śródgruszkowe grzbietowe
R1	89 ± 27	28 ± 18
R2	120 ± 32	32 ± 12
R3	104 ± 34	32 ± 13
R4	102 ± 35	36 ± 19

Obliczono również gęstości neuronów PV-pozytywnych w wyróżnionych częściach obu badanych struktur. Wyniki umieszczono w tabeli X.

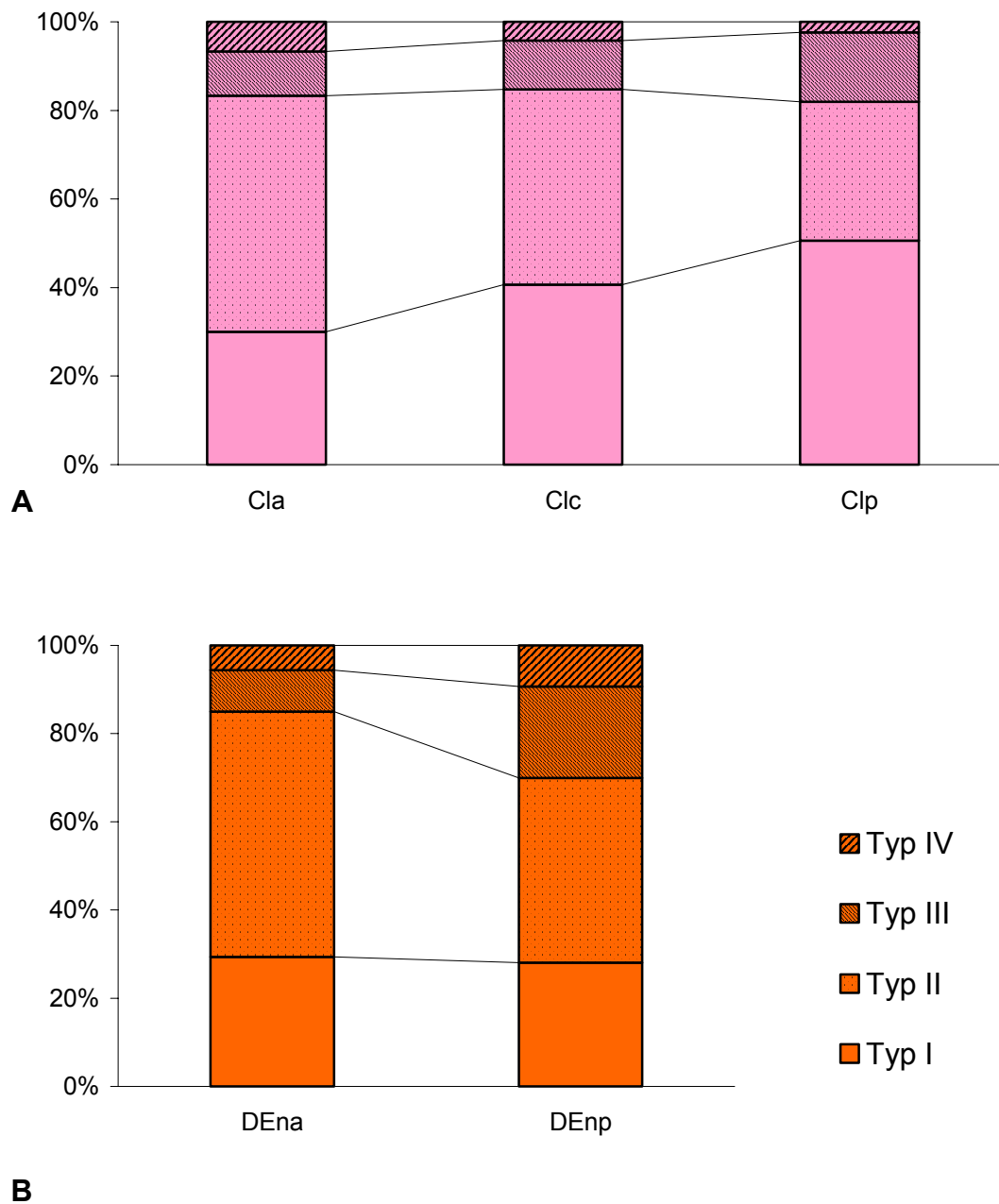
Tabela X. Rozkład gęstości neuronów PV-pozytywnych w przedmurzu i jądrze śródgruszkowym grzbietowym

Struktura/część	Gęstość neuronów na mm <sup>2</sup> (±SD)
Przedmurze	
część przednia	109 ± 25
część środkowa	101 ± 24
część tylna	100 ± 47
Jądro śródgruszkowe grzbietowe	
część przednia	33 ± 12
część tylna	31 ± 17

Średnia gęstość neuronów PV-pozytywnych w CI wynosiła **103,5 ± 33 /mm<sup>2</sup>** podczas gdy w jądrze śródgruszkowym grzbietowym – **32 ± 15 /mm<sup>2</sup>**.

Komórki PV-pozytywne stanowiły średnio **4,7 ± 0,5%** całkowitej liczby neuronów przedmurza. Wśród tej populacji rozkład procentowy wyróżnionych czterech typów morfologicznych był różny między poszczególnymi częściami przedmurza (test Chi<sup>2</sup>, p<0,02, ryc.11A). Na istotność różnic rozkładów typów komórek w przedmurzu największy wpływ miały komórki typu II dominujące z przodu oraz komórki typu I występujące głównie w części tylnej przedmurza.





**Ryc. 11.** Rozkład procentowy wyróżnionych typów morfologicznych neuronów:  
 (A) PV-pozytywnych w poszczególnych częściach przedmurza  
 (B) CB-pozytywnych w obu częściach jądra śródgruszkowego grzbietowego

W jądrze śródgruszkowym grzbietowym populacja neuronów PV-pozytywnych stanowiła  $1,8 \pm 0,2\%$  całkowitej liczby neuronów DEn. W obu wyróżnionych częściach tej struktury procentowy rozkład typów nie różnił się istotnie i wynosił dla neuronów typu I-32%, dla typu II-40%, dla typu III-19% i dla typu IV-9%.

### **Porównanie uzyskanych wyników między strukturami**

Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała istnienie statystycznie istotnej różnicy w gęstości neuronów PV-ir między Cl i DEn (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

Analiza statystyczna uzyskanych wyników wykazała również różnicę w procencie jaki stanowią neurony PV-pozytywne w populacji neuronów Cl i DEn. W Cl procent ten był znamienne wyższy niż w DEn (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

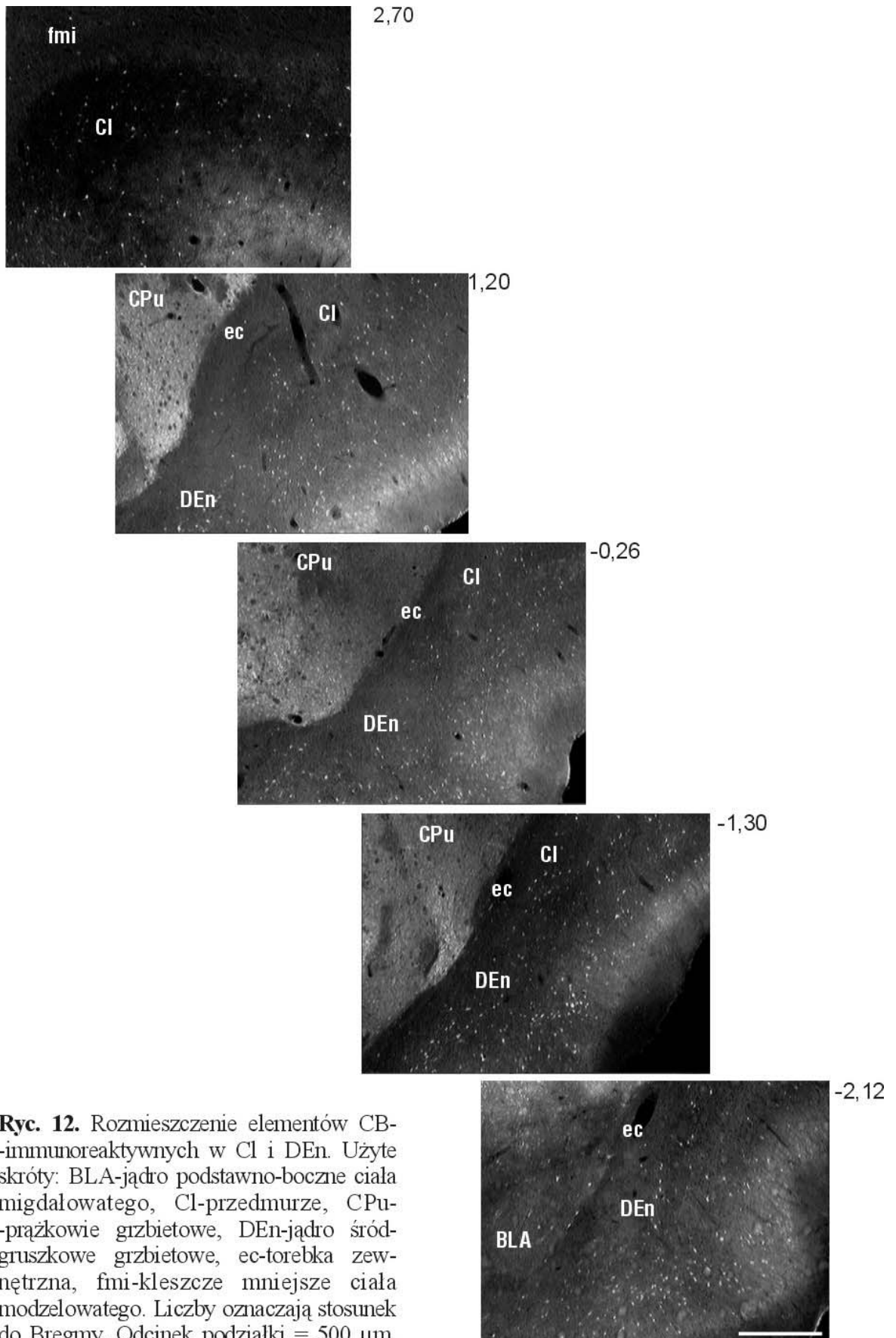
Analiza statystyczna wykazała istotność związku między typem morfologicznym komórki PV-pozytywnej, a strukturą (test  $\chi^2$ ,  $p < 0,03$ ) – rozkłady typów morfologicznych komórek w obu strukturach różniły się istotnie.

## **4.2.2 Charakterystyka CB-immunoreaktywnych elementów w przedmurzu i jądrze śródgruszkowym grzbietowym**

### **4.2.2.1 Badania jakościowe**

Na wszystkich analizowanych przekrojach przedmurza wybarwionych na obecność elementów CB-ir neuropil był bardzo słabo wyznakowany (ryc. 12). Wyznaczenie granic Cl na podstawie tego barwienia było trudne, gdyż zarówno w obrębie torebki zewnętrznej, jądra śródgruszkowego grzbietowego jak i sąsiadujących warstw kory CB-ir neuropilu była bardzo podobna.

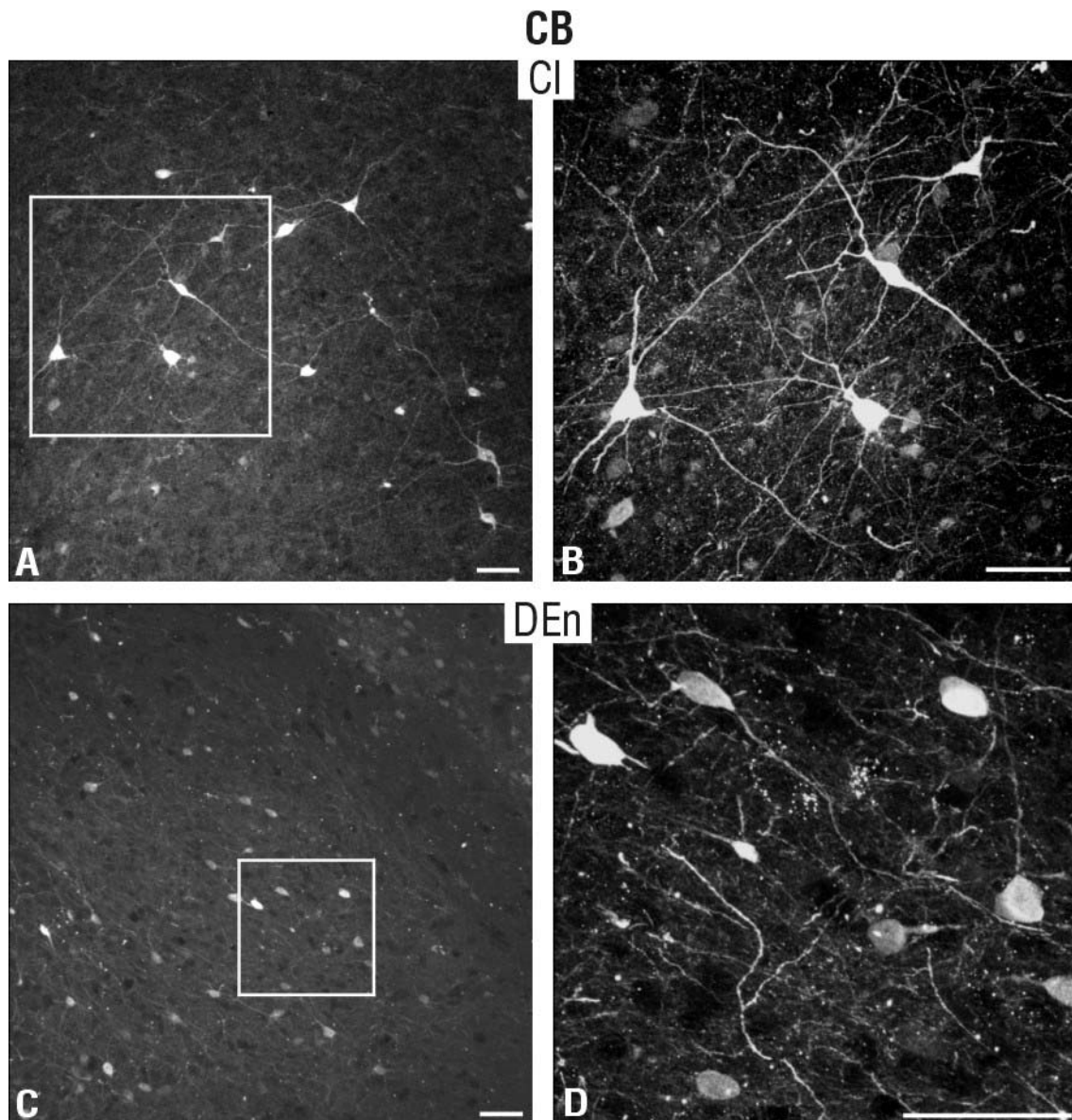
Komórki CB-pozytywne posiadały intensywnie wyznakowane ciało oraz wypustki i dość licznie występowały we wszystkich częściach Cl (ryc. 13A,B). Obserwowano również populację komórek znacznie słabiej barwiącą się. CB-ir włókna były zarówno gładkie jak i z żyłakowatymi rozszerzeniami i tworzyły w Cl sieć o delikatnym utkaniu. Włókna te podobnie jak zakończenia CB-ir występowały w okolicy niewybarwionych komórek, jednak nie brały udziału w tworzeniu



**Ryc. 12.** Rozmieszczenie elementów CB-immunoreaktywnych w CI i DEn. Użyte skróty: BLA-jądro podstawno-boczne ciała migdałowego, CI-przedmurze, CPU-prążkowie grzbietowe, DEn-jądro śródgruszkowe grzbietowe, ec-torebka zewnętrzna, fmi-kleszcze mniejsze ciała modelowego. Liczby oznaczają stosunek do Bregmy. Odcinek podziałki = 500  $\mu$ m.

koszyczków tak dobrze widocznych jak w przypadku elementów PV-ir.

Pod względem intensywności wyznakowania neuropilu DEn, na całej długości, był zbliżony do Cl, VEn i sąsiednich warstw kory gruszkowej. We wszystkich tych strukturach bardzo podobne były także rozkład i intensywność wyznakowanych komórek (ryc. 13C,D). Obserwowano również dwie subpopulacje, silniej i znacznie słabiej wyznakowanych komórek. CB-ir włókna gładkie i z żyłakowatymi rozszerzeniami na przebiegu tworzyły w DEn wspólnie z zakończeniami delikatną sieć.



**Ryc. 13.** Ekspresja CB w przedmurzu (A, B) i jądrze śródgruszkowym grzbietowym (C, D). Odcinek podziałki = 50  $\mu$ m.

#### 4.2.2.2 Badania ilościowe

U trzech zwierząt obliczono gęstości neuronów CB-pozytywnych w przedmurzu i jądrze śródgruszkowym grzbietowym. Uzyskane wyniki zamieszczono w tabeli XI.

*Tabela XI. Gęstości neuronów CB-pozytywnych w przedmurzu i jądrze śródgruszkowym grzbietowym u badanych zwierząt*

Zwierzę	Gęstość neuronów na mm <sup>2</sup> (±SD)	
	Przedmurze	Jądro śródgruszkowe grzbietowe
R1	131 ± 50	123 ± 55
R2	110 ± 32	102 ± 25
R3	127 ± 35	106 ± 29

Analiza ilościowa preparatów wykazała, że badane zwierzęta nie różniły się statystycznie istotnie pod względem ilości komórek CB-pozytywnych przypadających na jednostkę pola testowego w obu badanych strukturach.

Obliczono także gęstości neuronów CB-pozytywnych w poszczególnych częściach przedmurza i jądra śródgruszkowego grzbietowego, a wyniki umieszczono w tabeli XII.

*Tabela XII. Rozkład gęstości neuronów CB-pozytywnych w wyróżnionych częściach przedmurza i jądra śródgruszkowego grzbietowego.*

Struktura/część	Gęstość neuronów na mm <sup>2</sup> (±SD)
Przedmurze	
część przednia	118 ± 46
część środkowa	124 ± 39
część tylna	132 ± 27
Jądro śródgruszkowe grzbietowe	
część przednia	110 ± 36
część tylna	109 ± 39

Nie wykazano również istotnych statystycznie różnic w gęstości neuronów CB-pozytywnych między poszczególnymi częściami przedmurza ani jądra śródgruszkowego grzbietowego.

Średnia gęstość neuronów CB-pozytywnych w Cl wynosiła  $123 \pm 38 /\text{mm}^2$  podczas gdy w jądrze śródgruszkowym grzbietowym  $110 \pm 36 /\text{mm}^2$ .

Komórki CB-pozytywne stanowiły w przedmurzu  $5,6 \pm 0,5\%$  całkowitej liczby neuronów. Rozkład czterech typów morfologicznych w populacji komórek CB-pozytywnych nie różnił się istotnie między poszczególnymi częściami Cl. Neurony typu I stanowiły więc w całym przedmurzu – 32%, typu II – 50%, typu III – 11%, natomiast typu IV – tylko 7% wszystkich CB-pozytywnych neuronów.

Komórki CB-pozytywne w jądrze śródgruszkowym grzbietowym stanowiły  $6,1 \pm 0,6\%$  całkowitej liczby neuronów DEn. Stwierdzono natomiast obecność istotnych różnic w rozkładach typów morfologicznych komórek między rozróżnionymi częściami DEn (ryc. 11B). Na różnice w rozkładach typów morfologicznych neuronów zawierających CB między przodem, a tyłem DEn, najistotniejszy wpływ miała zdecydowanie większa reprezentacja neuronów typu III w części tylnej.

### ***Porównanie uzyskanych wyników między strukturami***

Przeprowadzona analiza statystyczna nie wykazała istnienia różnicy statystycznie istotnej w gęstości neuronów CB-ir między Cl i DEn (ANOVA,  $p > 0,05$ ).

Podobnie, analiza statystyczna nie wykazała różnic między Cl i DEn w procencie jaki stanowiły neurony CB-pozytywne w populacji neuronów Cl i DEn (ANOVA,  $p > 0,05$ ).

Analiza statystyczna wykazała natomiast istotność związku między typem morfologicznym komórki CB-pozytywnej, a strukturą, w której typ ten występował (test  $\text{Chi}^2$ ,  $p < 0,05$ ) – rozkłady typów morfologicznych komórek w obu strukturach różniły się istotnie.

### 4.2.3 Charakterystyka CR-immunoreaktywnych elementów w przedmurzu i jądrze śródgruszkowym grzbietowym

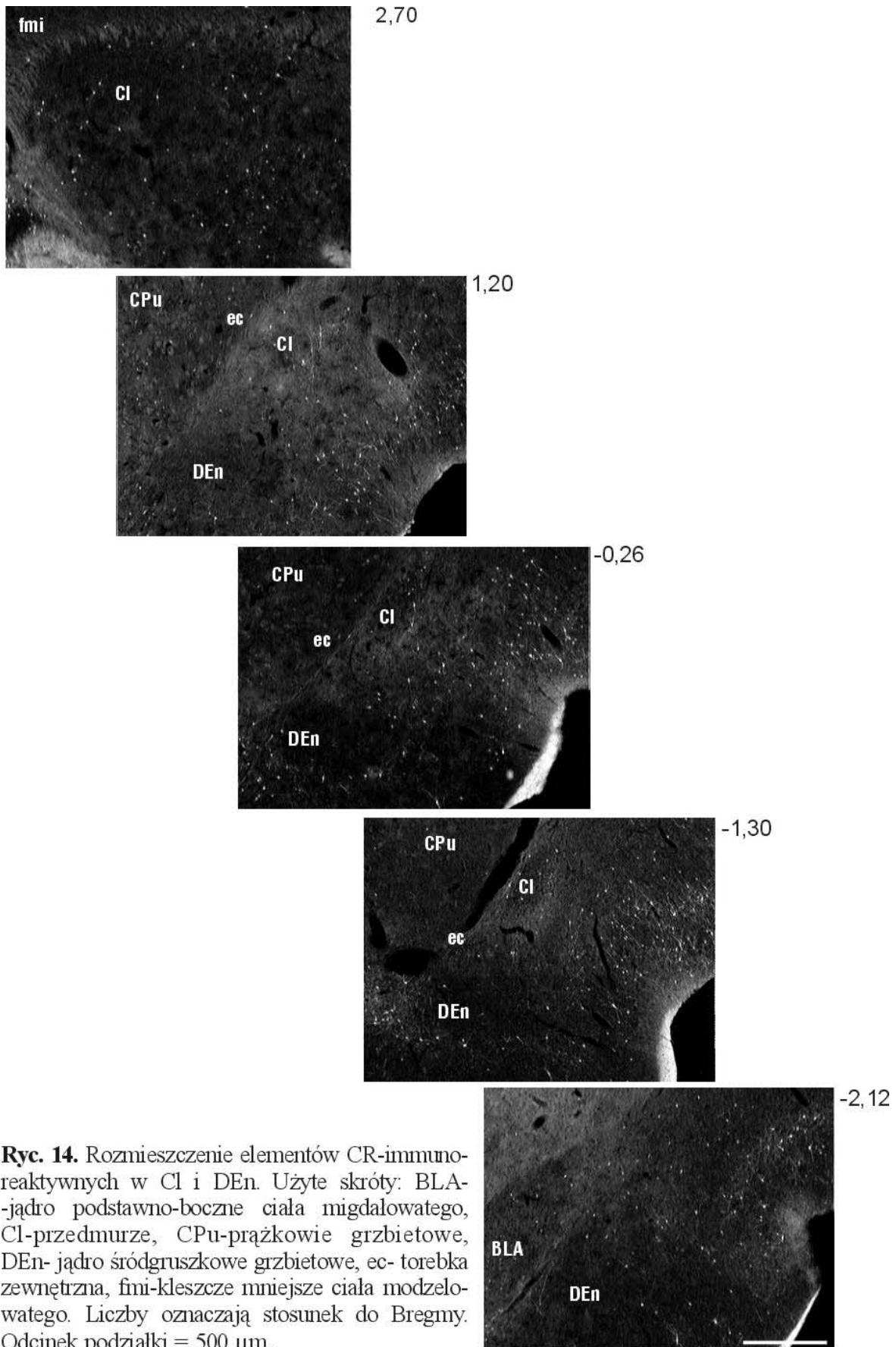
#### 4.2.3.1 Badania jakościowe

Na przekrojach czołowych granice przedmurza były stosunkowo łatwe do prześledzenia, dzięki zróżnicowaniu CR-ir neuropilu. Neuropil w środkowej części przekroju wykazywał nieco słabszą CR-ir w stosunku do otaczających struktur, natomiast brzegi sąsiadujące z: kleszczami mniejszymi ciała modzelowatego, torebką zewnętrzną, DEn i głębokimi warstwami kory wyspowej i oczodołowej znakowały się intensywniej (ryc. 14), związane to było z liczniej występującymi włóknami CR-ir. Obraz taki widoczny był na całej długości struktury.

W przedmurzu znaleziono nieliczne komórki CR-pozytywne, które posiadały intensywnie wyznakowane ciało i bogate drzewo dendrytyczne (ryc. 15A,B). Komórki CR-pozytywne były rozmieszczone równomiernie, jednak te najintensywniej wyznakowane z długimi wypustkami lokalizowały się głównie na granicy z korą wyspową i na granicy z DEn (ryc. 14). CR-ir włókna, gładkie i z żyłakowatościami, oraz ir-punkty w obrębie CI tworzyły sieć.

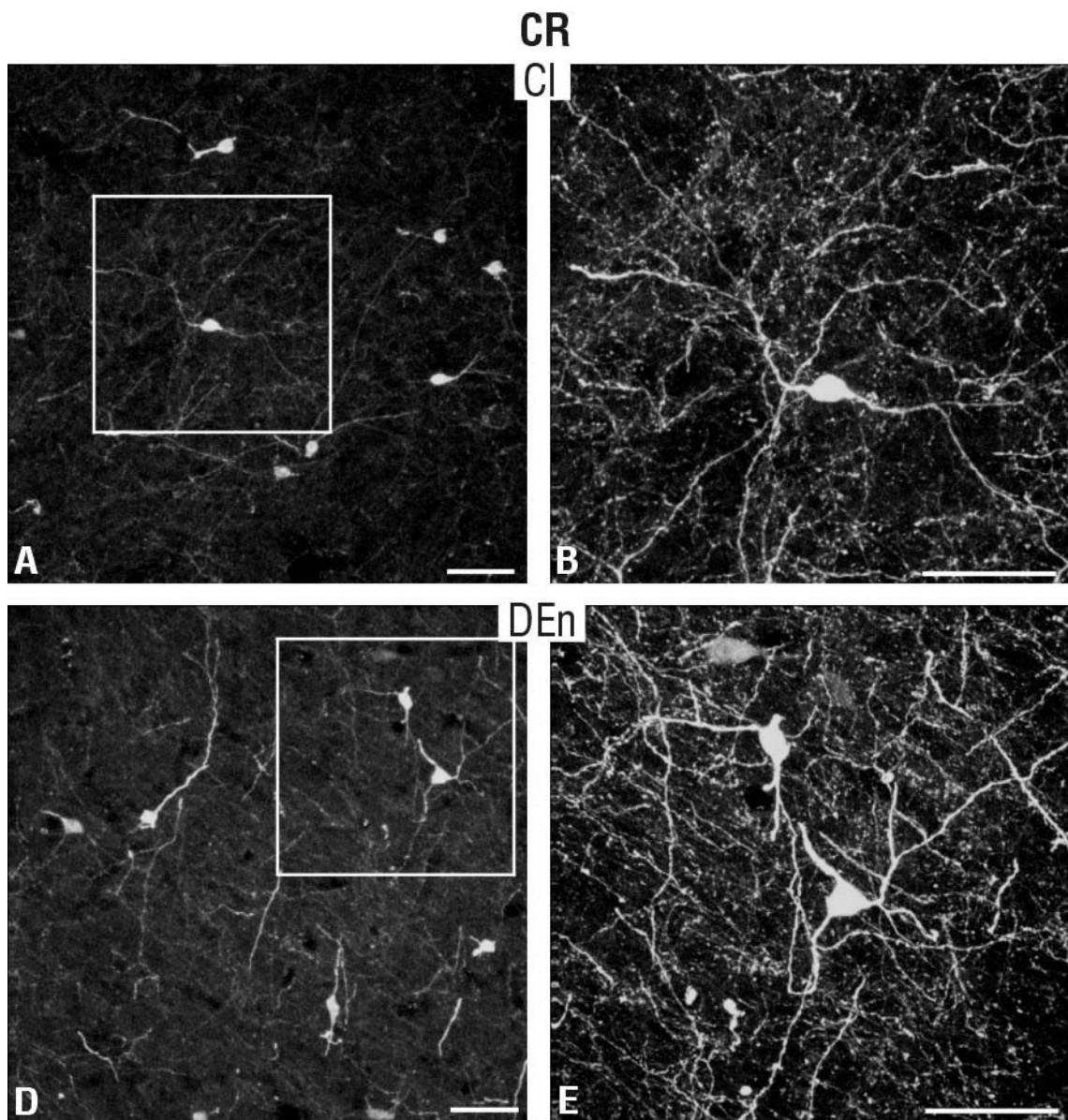
Podobnie jak w przypadku przedmurza, granice jądra śródgruszkowego grzbietowego były wyraźne. Było to możliwe dzięki specyficznej lokalizacji komórek i włókien, których największe skupiska występowały na granicy z korą gruszkową i VEn oraz dzięki podbarwieniu neuropilu, który cechowała jeszcze niższa CR-ir niż w CI (ryc. 14).

W DEn obserwowano mniej komórek CR-pozytywnych niż w przedmurzu. Posiadały one intensywnie wyznakowane ciało i długie wypustki (ryc. 15 C,D). Włókna CR-ir, zarówno gładkie jak i posiadające żyłakowatości, wykazywały pewne uporządkowanie w obu częściach DEn. Na przekrojach czołowych większość włókien układała się prostopadle do powierzchni bocznej półkuli mózgu. Pomiędzy włóknami rozmieszczone były CR-ir punkty.



**Ryc. 14.** Rozmieszczenie elementów CR-immunoreaktywnych w CI i DEn. Użyte skróty: BLA-jądro podstawno-boczne ciała migdałowatego, CI-przedmurze, CPu-prążkowie grzbietowe, DEn- jądro śródgruszkowe grzbietowe, ec- torebka zewnętrzna, fmi-kleszcze mniejsze ciała modzlowatego. Liczby oznaczają stosunek do Bregmy. Odcinek podziałki = 500  $\mu$ m.





**Ryc. 15.** Ekspresja CR w przedmurzu (A, B) i jądrze śródgruszkowym grzbietowym (C, D). Odcinek podziałki = 50  $\mu\text{m}$ .

#### 4.2.3.2 Badania ilościowe

U trzech zwierząt wykonano pomiary gęstości neuronów CR-pozytywnych w przedmurzu i jądrze śródgruszkowym. Wyniki przedstawiono w tabeli XIII.

Analiza ilościowa wykazała, że badane zwierzęta nie różniły się statystycznie istotnie pod względem ilości komórek przypadających na jednostkę pola testowego zarówno w przedmurzu jak i jądrze śródgruszkowym grzbietowym.

*Tabela XIII. Gęstości neuronów CR-pozytywnych w przedmurzu i jądrze śródgruszkowym grzbietowym u badanych zwierząt*

Zwierzę	Gęstość neuronów na mm <sup>2</sup> (±SD)	
	Przedmurze	Jądro śródgruszkowe grzbietowe
R1	59 ± 8	30 ± 16
R2	51 ± 30	43 ± 16
R3	44 ± 16	36 ± 13

Dokonano również obliczeń gęstości neuronów CR-pozytywnych w wyróżnionych częściach przedmurza i jądra śródgruszkowego grzbietowego. Wyniki zestawiono w tabeli XIV.

*Tabela XIV. Rozkład gęstości neuronów CR-pozytywnych w wyróżnionych częściach przedmurza i jądra śródgruszkowego grzbietowego*

Struktura/część	Gęstość neuronów na mm <sup>2</sup> (±SD)
Przedmurze	
część przednia	46 ± 15
część środkowa	48 ± 17
część tylna	58 ± 24
Jądro śródgruszkowe grzbietowe	
część przednia	33 ± 15
część tylna	40 ± 14

Nie wykazano także statystycznie istotnych różnic w gęstości neuronów CR-pozytywnych między poszczególnymi częściami przedmurza ani jądra śródgruszkowego grzbietowego.

Średnia gęstość neuronów CR-pozytywnych w CI wynosiła **51 ± 19 /mm<sup>2</sup>** podczas gdy w jądrze śródgruszkowym grzbietowym – **36 ± 15 /mm<sup>2</sup>**.

Populacja neuronów CR-pozytywnych stanowiła **2,3 ± 0,3%** całkowitej liczby neuronów przedmurza. Rozkład procentowy czterech wyróżnionych w tej populacji typów morfologicznych nie wykazał różnic w ich rozmieszczeniu między

poszczególnymi częściami przedmurza i dla typu I wynosił on średnio 34%, dla typu II-31%, dla typu III-30%, a dla typu IV-5%.

W jądrze śródgruszkowym grzbietowym komórki CR-pozytywne stanowiły  $2,0 \pm 0,4\%$  całkowitej liczby neuronów tego jądra. Nie znaleziono różnic w rozmieszczeniu poszczególnych typów morfologicznych komórek CR-pozytywnych między częściami DEn. Rozkład procentowy typów morfologicznych w tej strukturze kształtował się następująco: do typu I należało średnio 31% komórek, do typu II-36%, do typu III-31% natomiast do typu IV-2%.

### ***Porównanie uzyskanych wyników między strukturami***

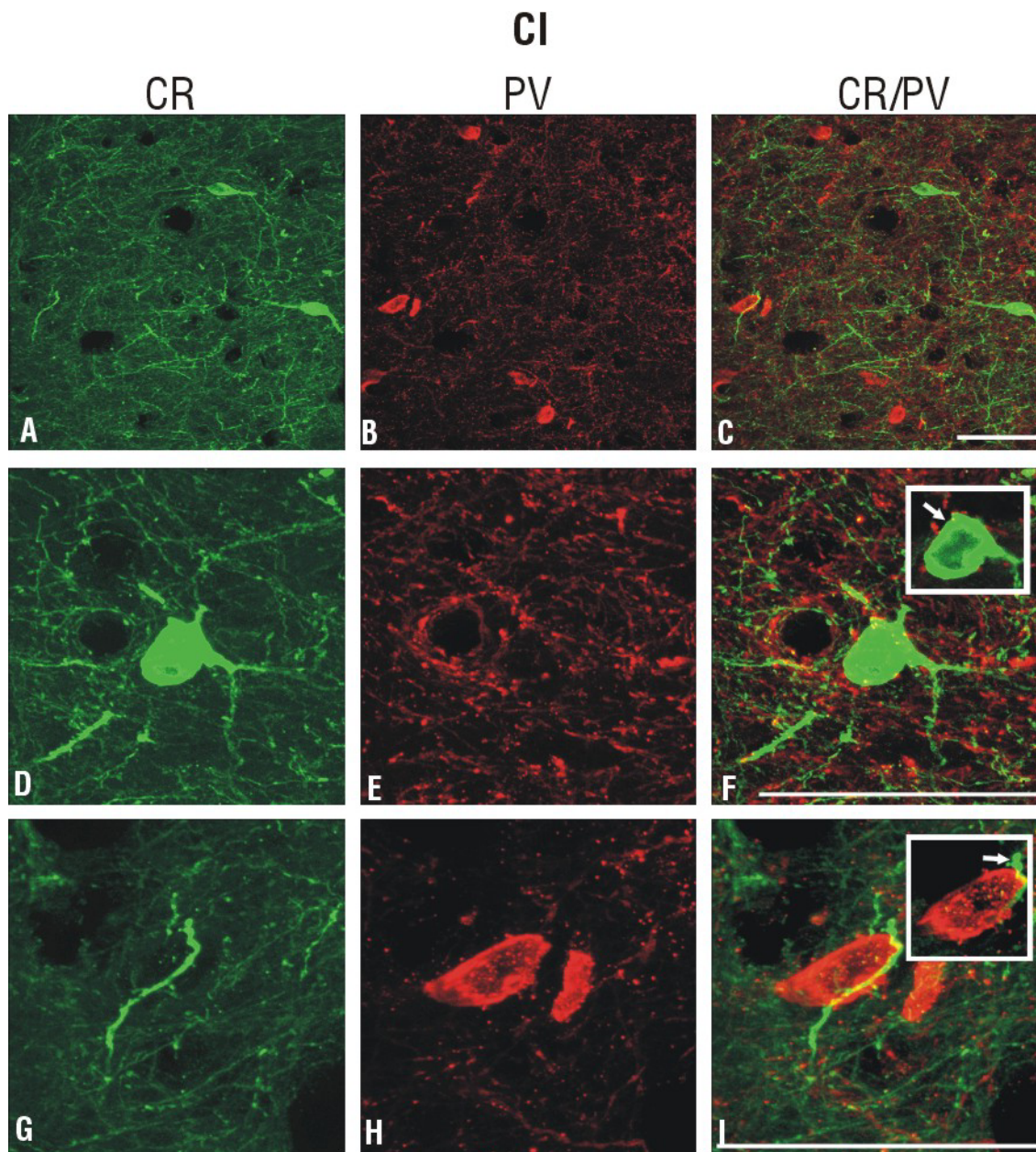
Analiza statystyczna wykazała różnice statystycznie istotne w gęstości neuronów CR-pozytywnych między Cl i DEn (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

Analiza statystyczna nie wykazała jednak, że procentowy udział neuronów CR-pozytywnych różni się istotnie między badanymi strukturami (ANOVA,  $p > 0,1$ ). Również nie wykazano związku statystycznie istotnego między typem morfologicznym komórek CR-pozytywnych, a strukturą (test  $\chi^2$ ,  $p > 0,05$ ), bowiem rozkłady typów morfologicznych komórek między tymi strukturami nie różniły się istotnie.

## **4.3 Ocena wzajemnych zależności między subpopulacjami neuronów zawierających CaBPs w przedmurzu i jądrze śródgruszkowym grzbietowym**

### **4.3.1 Analiza wzajemnych zależności między neuronami zawierającymi PV i CR**

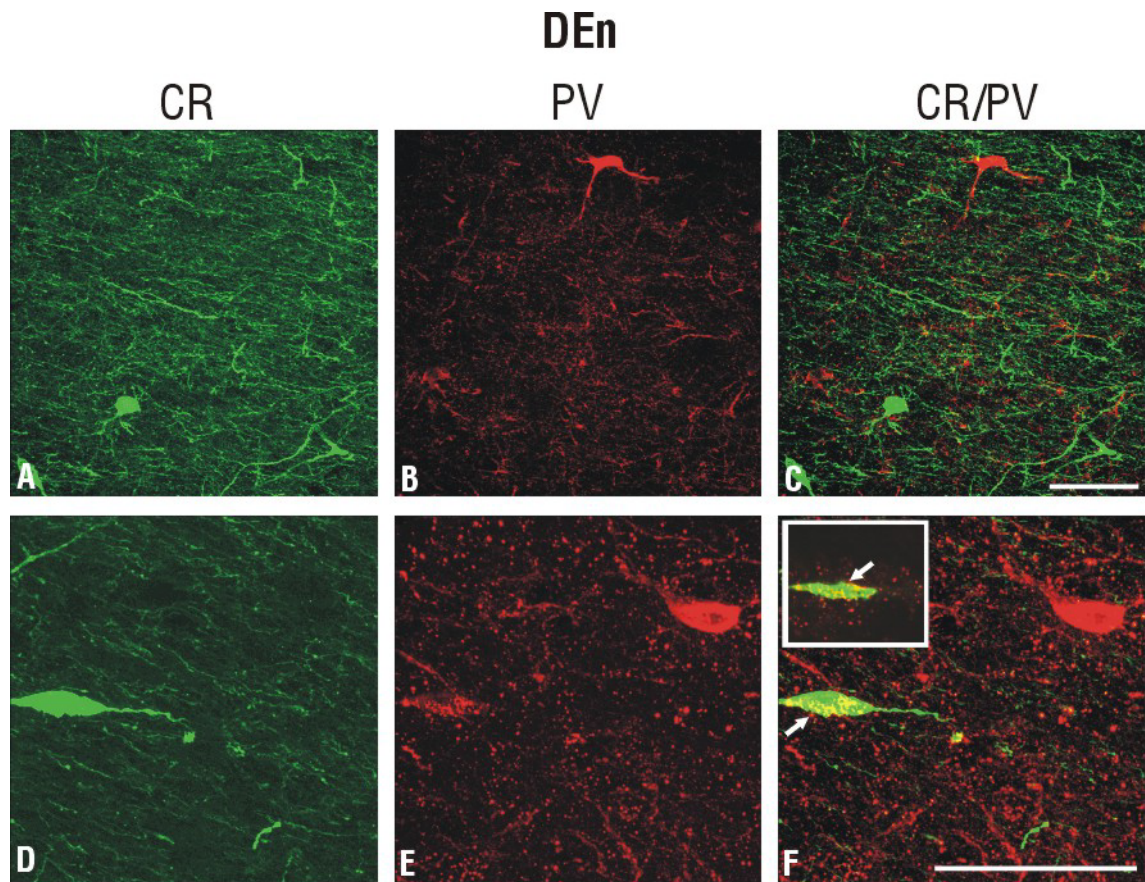
W czasie analizy preparatów wyznakowanych podwójnie, na obecność elementów zawierających PV i CR, nie zaobserwowano komórek zawierających jednocześnie oba białka. Zarówno w Cl (ryc. 16) jak i w DEn (ryc. 17) komórki PV- i CR-pozytywne stanowiły odrębne populacje. W przedmurzu z przebadanych łącznie 92 komórek, 50 było PV-pozytywnych, a 42 było CR-pozytywnych. W jądrze śródgruszkowym grzbietowym zbadano łącznie 24 komórki z czego 14 było



**Ryc. 16.** Ekspresja PV (oznaczona na czerwono) i CR (oznaczona na zielono) w przedmurzu. Strzałki wskazują zakończenia: PV-ir na komórkach CR-pozytywnych (F) oraz CR-ir na komórkach PV-pozytywnych (I). Odcinek podziałki = 50  $\mu\text{m}$ .



PV-pozytywnych, a 10 było CR-pozytywnych. Komórek wykazujących współwystępowanie białek nie znaleziono.



**Ryc. 17.** Ekspresja PV (oznaczona na czerwono) i CR (oznaczona na zielono) w jądrze śródgruszkowym grzbietowym. Strzałki wskazują zakończenia PV-ir na komórkach CR-pozytywnych (F). Odcinek podziałki = 50  $\mu$ m.

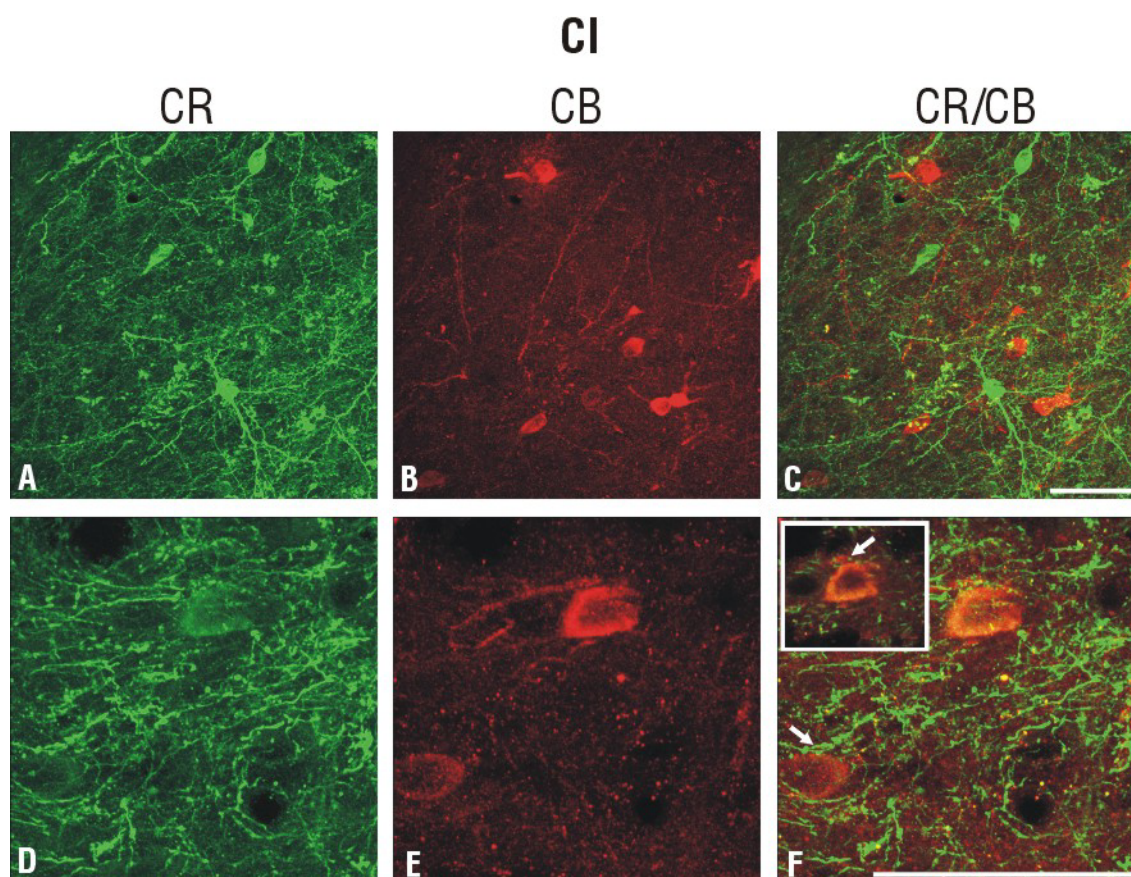
W obu strukturach obserwowano PV-ir włókna i zakończenia na ciele i wypustkach prawie wszystkich komórek CR-pozytywnych (ryc. 16D-F, ryc. 17D-F). W przedmurzu z 42 przebadanych komórek CR-pozytywnych – 40 posiadało bezpośredni kontakt z włóknami i zakończeniami PV-ir, zaś w DEn wszystkie z 10 przebadanych komórek.

Równie często CR-ir włókna i zakończenia występowały na ciałach komórek PV-pozytywnych. Obserwowano to w przedmurzu na 49 ze zbadanych 50 komórek PV-pozytywnych, i w jądrze śródgruszkowym grzbietowym na wszystkich 14 zbadanych komórkach PV-pozytywnych (ryc. 16G-I).

### 4.3.2 Analiza wzajemnych zależności między neuronami zawierającymi CB i CR

Ocena wzajemnych relacji między neuronami zawierającymi CB i neuronami zawierającymi CR w przedmurzu i jądrze śródgruszkowym grzbietowym pozwoliła na stwierdzenie, że są to rozdzielne populacje (ryc. 18A-C, ryc. 19A-C). W obrębie przedmurza zbadano 48 komórek. 33 z nich zawierały CB zaś 14 było CR-pozytywnych. Znalaziono 1 komórkę wyznakowaną pozytywnie na obecność obu badanych białek (ryc. 18D-E). W jądrze śródgruszkowym grzbietowym na 24 przebadane komórki – 13 było CB-pozytywnych, natomiast 9 było CR-pozytywnych. Nie znaleziono komórek zawierających jednocześnie CB i CR.

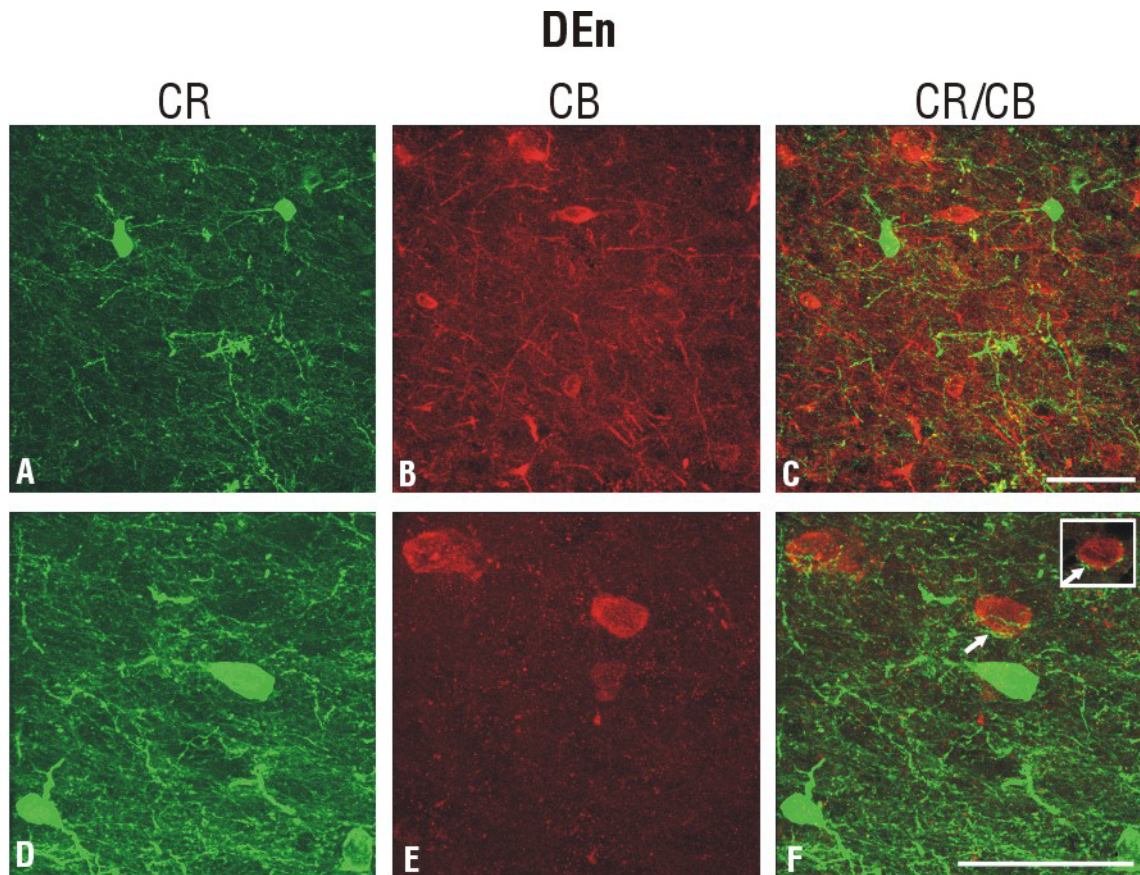
Zarówno w Cl jak i w DEn występowały włókna i zakończenia CR-ir na wszystkich komórkach CB-pozytywnych (ryc. 18D-F, 19D-F).



**Ryc. 18.** Ekspresja CB (oznaczona na czerwono) i CR (oznaczona na zielono) w przedmurzu. Strzałki wskazują zakończenia CR-ir na komórkach CB-pozytywnych. Odcinek podziałki = 50  $\mu$ m



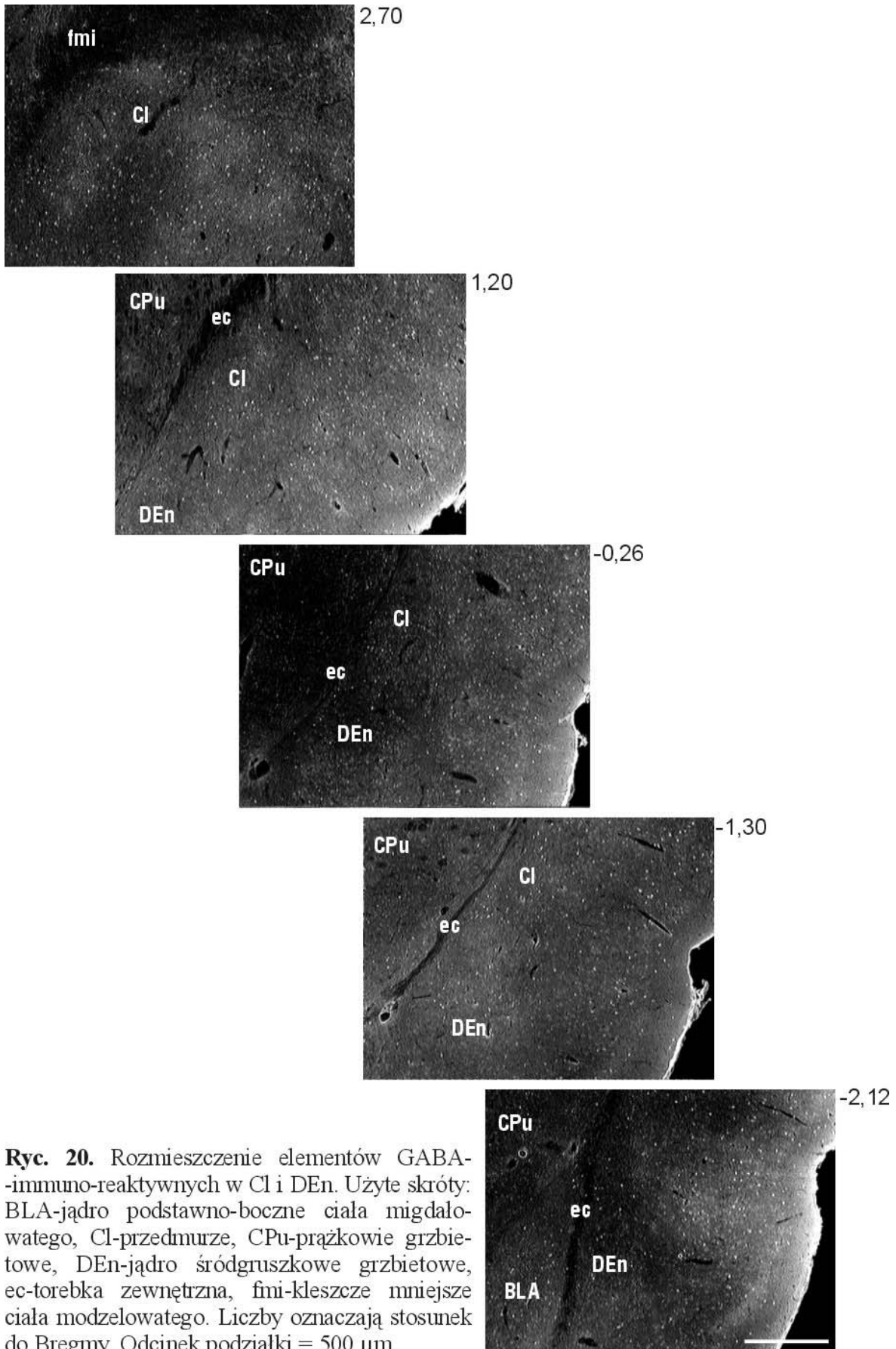
Znacznie rzadziej obserwowano komórki CR-pozytywne, na których ciele występowały zakończenia CB-ir. W Cl zakończenia takie obserwowano na 9 z 14 zbadanych komórek CR-pozytywnych, zaś w DEn odpowiednio na 4 z 9.



**Ryc. 19.** Ekspresja CB (oznaczona na czerwono) i CR (oznaczona na zielono) w jądrze śródgruszkowym grzbietowym. Strzałki wskazują zakończenia CR-ir na komórkach CB-pozytywnych (F). Odcinek podziałki = 50  $\mu$ m.

#### **4.4 Charakterystyka wyznakowanych elementów GABA-immunoreaktywnych w przedmurzu i jądrze śródgruszkowym grzbietowym**

Na wszystkich ocenianych przekrojach mózgowia, GABA-ir elementy zarówno w przedmurzu jak i w jądrze śródgruszkowym grzbietowym, wyznakowały się z podobną intensywnością co w sąsiednich strukturach korowych (ryc. 20). Utrudniało to dokładne wyznaczenie granic bocznych obu badanych struktur. Wyznaczenie granic przyśrodkowych Cl i DEn było znacznie łatwiejsze ze względu na to, że w torebce zewnętrznej GABA-immunoreaktywność była bardzo



**Ryc. 20.** Rozmieszczenie elementów GABA-immuno-reaktywnych w CI i DEn. Użyte skróty: BLA-jądro podstawno-boczne ciała migdałowatego, CI-przedmurze, CPu-prążkowie grzbietowe, DEn-jądro śródgruszkowe grzbietowe, ec-torebka zewnętrzna, fmi-kleszcze mniejsze ciała modzelowatego. Liczby oznaczają stosunek do Bregmy. Odcinek podziałki = 500  $\mu$ m.



niska. Podobnie, niska immunoreaktywność obserwowana w kleszczach mniejszych ciała modelowego, pozwoliła na dokładne wyznaczenie granicy górnej przedmurza w części przedniej. Nie obserwowano różnic w intensywności wyznakowania elementów GABA-ir w obrębie wyróżnionych części badanych struktur. Również porównując obraz immunoreaktywności pomiędzy przedmurzem i jądrem śródgruszkowym grzbietowym różnic takich nie stwierdzono (ryc.20, 21A,C).

Analiza jakościowa wybarwionych preparatów wykazała zarówno w CI jak i w DEn obecność GABA w komórkach, włóknach oraz punktach odpowiadających zakończeniom synaptycznym.

GABA-pozytywne komórki posiadały wyznakowane głównie ciało i pojedyncze, początkowe odcinki wypustek odchodzące od ciał komórek (ryc. 21B,D). W obrębie ciała komórkowego barwiła się zarówno cytoplazma jak i jądro komórkowe, w którym widoczne było nie wyznakowane jąderko. Morfologia ciał komórkowych pozwoliła na wyodrębnienie trzech typów: komórki okrągłe, owalne i wieloboczne (ryc. 21B).

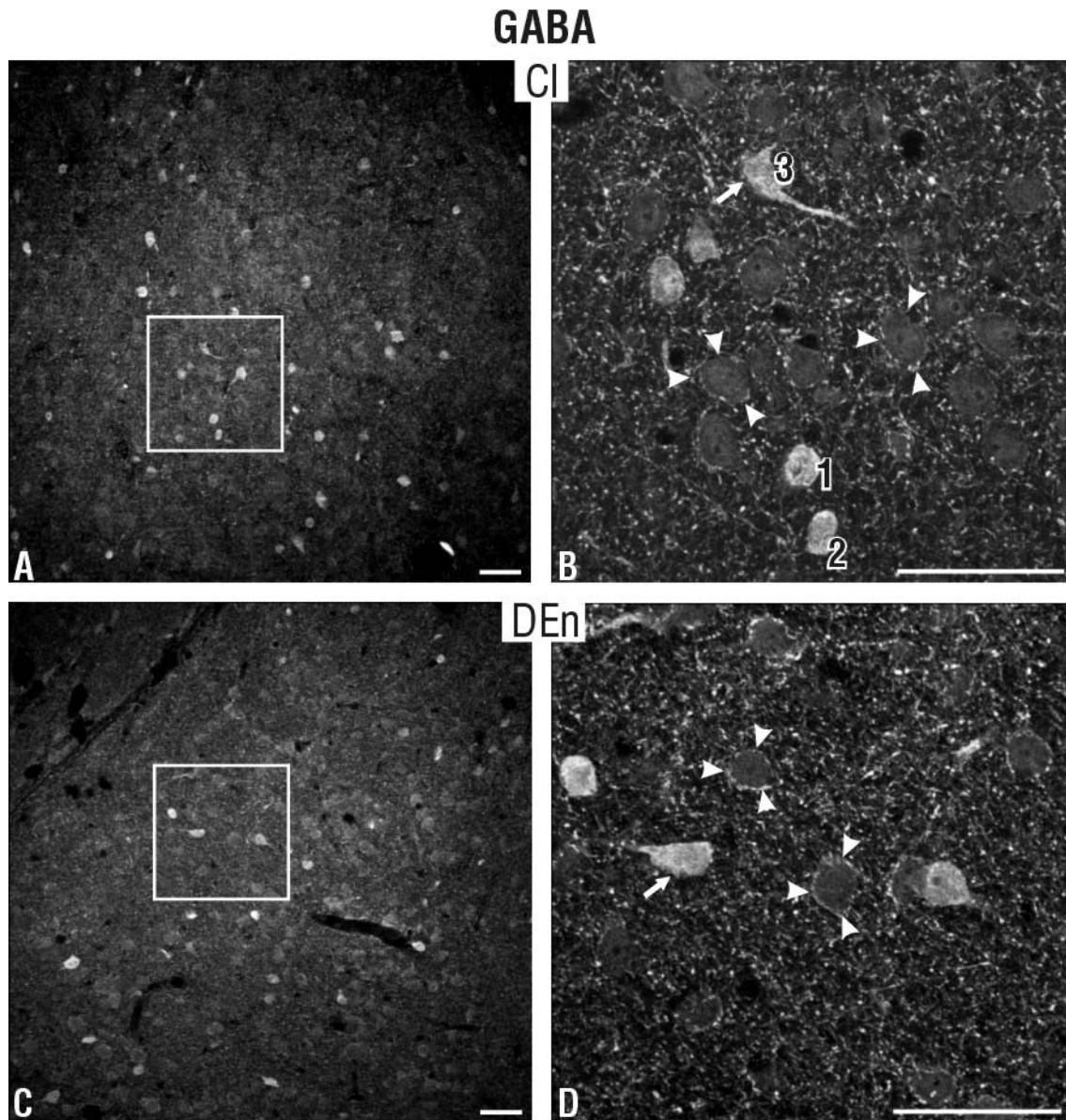
Analiza parametrów morfometrycznych rozróżnionych typów komórkowych pozwoliła na ustalenie pewnych prawidłowości. Wyniki zawarto w tabeli XV.

*Tabela XV. Parametry morfometryczne rozróżnionych typów komórkowych*

Typ	Stosunek osi długiej do krótkiej ( $\pm$ SD)	Pole przekroju w $\mu\text{m}^2$ ( $\pm$ SD)
Owalne	1,56 $\pm$ 0,27	126 $\pm$ 56
Okrągłe	1,22 $\pm$ 0,14	94 $\pm$ 38
Wieloboczne	1,40 $\pm$ 0,28	134 $\pm$ 46

Komórki okrągłe charakteryzowały się najmniejszym stosunkiem osi długiej do krótkiej; co więcej, współczynnik zmienności tego stosunku (około 11%) był najmniejszy (1,22  $\pm$  0,14), co wskazuje na znacznego stopnia jednorodność tej subpopulacji komórkowej. Populacje komórek owalnych i wielobocznych były bardziej heterogenne. Współczynnik zmienności stosunku osi długiej do krótkiej był u nich podobny i wynosił około 19%. Stosunek osi długiej do krótkiej osiągał

też większe wartości –  $1,40 \pm 0,28$  i  $1,56 \pm 0,27$  odpowiednio dla komórek owalnych i wielobocznych. Analiza statystyczna wykazała istotność różnic tego parametru między poszczególnymi typami morfologicznymi komórek GABA-pozytywnych (test  $\chi^2$ ,  $p < 0,001$ ).



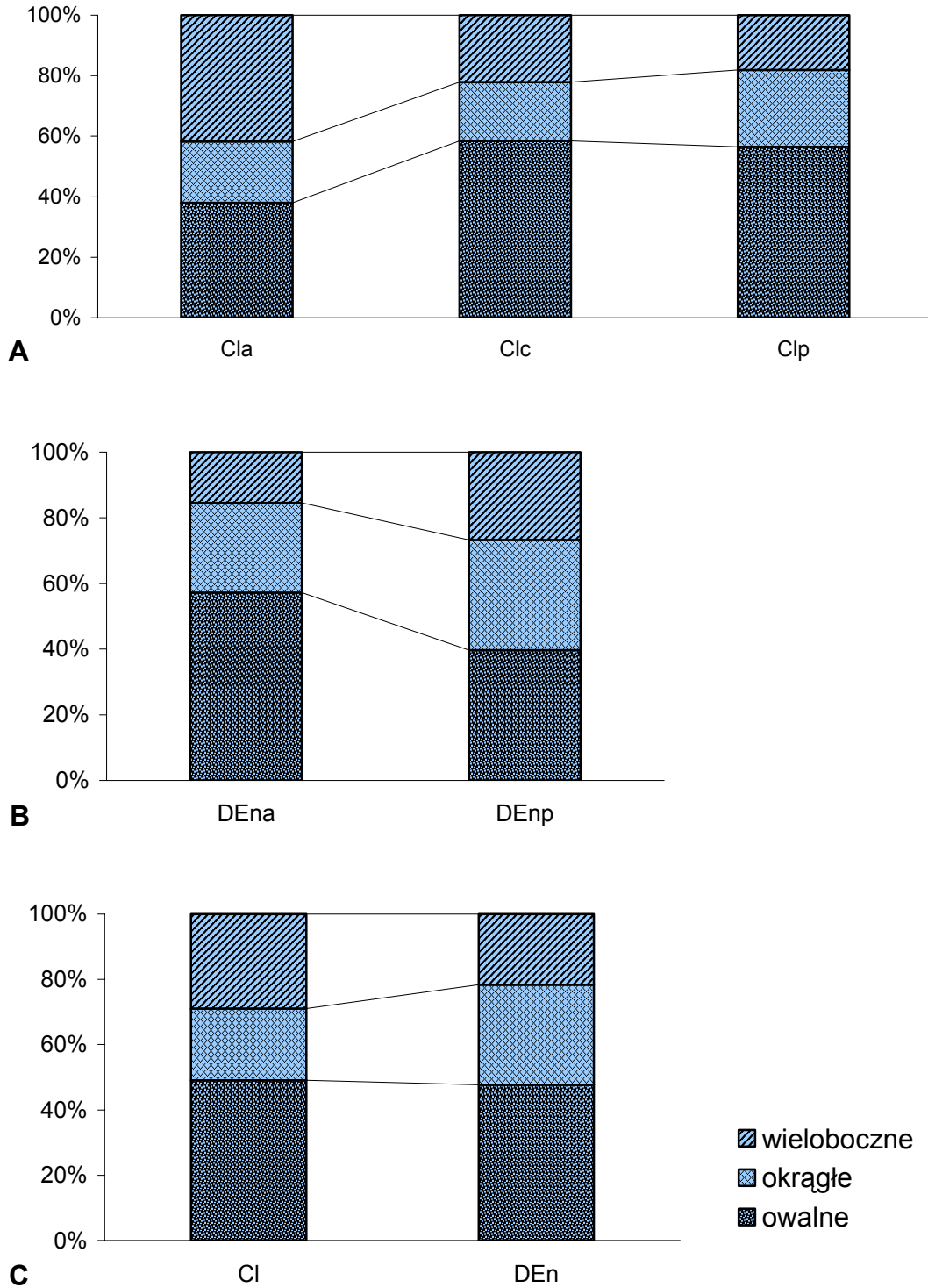
**Ryc. 21.** Ekspresja GABA w przedmurzu (A, B) i w jądrze śródgruszkowym grzbietowym (C, D). Strzałki wskazują GABA-pozytywne komórki z wyznakowanymi początkowymi odcinkami wypustek, groty wskazują koszyczki otaczające niewybarwione komórki, (B) cyfry oznaczają typy morfologiczne komórek GABA-pozytywnych: 1-okrągłe, 2-owalne, 3-wieloboczne-opis w tekście. Odcinek podziałki = 50  $\mu\text{m}$ .

Również analiza wielkości pola przekroju wyróżnionych typów komórek GABA-pozytywnych wykazała istnienie pewnych prawidłowości (tabela XV). Komórki okrągłe były komórkami najmniejszymi, ich średnie pole przekroju wynosiło  $94 \pm 38 \mu\text{m}^2$ . Wielkości pól przekrojów komórek dwóch pozostałych typów były istotnie większe (test  $\text{Chi}^2$ ,  $p < 0,001$ ), wynosząc odpowiednio  $126 \pm 56 \mu\text{m}^2$  i  $134 \pm 46 \mu\text{m}^2$ , jednak między sobą nie różniły się w sposób istotny (test  $\text{Chi}^2$ ,  $p > 0,1$ ).

Analiza statystyczna wykazała istotne różnice w rozkładzie typów morfologicznych komórek GABA-pozytywnych między poszczególnymi poziomami (przód, środek i tył) w przedmurzu (test  $\text{Chi}^2$ ,  $p < 0,001$ ; ryc.22A). Największy odsetek komórek wielobocznych odnotowano w przedniej części przedmurza. W pozostałych częściach przedmurza (środkowej i tylnej) udział tego typu komórkowego w populacji neuronów GABA-pozytywnych był znacznie mniejszy, stanowił on około 1/5 wszystkich neuronów GABA-pozytywnych w tych częściach.

Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała również istotność różnic rozkładów typów morfologicznych między poszczególnymi poziomami jądra śródgruszkowego grzbietowego (przód i tył; test  $\text{Chi}^2$ ,  $p < 0,02$ ; ryc.22B). Nie były one jednak tak silnie wyrażone jak w przedmurzu. Zarówno w przedniej jak i w tylnej części struktury udział neuronów owalnych był największy i osiągnął wartość około 50%, z tym, że nieco więcej ich było w przedniej części tej struktury. Udział neuronów wielobocznych w obu częściach jądra śródgruszkowego grzbietowego był najmniejszy.

Analiza statystyczna potwierdziła również istotność różnic rozkładów typów komórek między przedmurzem, a jądrem śródgruszkowym grzbietowym (test  $\text{Chi}^2$ ,  $p < 0,02$ ; ryc.22C). Co ciekawe udział komórek owalnych w obu strukturach był prawie jednakowy. Stanowiły one połowę populacji komórkowej obu struktur. Różnice między strukturami dotyczą więc różnego udziału komórek dwu pozostałych typów, a w największym stopniu komórek okrągłych, których rozkład między badanymi strukturami był nierównomierny.



**Ryc. 22.** Rozkład procentowy typów morfologicznych neuronów GABA-pozytywnych (A) w poszczególnych częściach przedmurza (B) w obu częściach jądra śródgruszkowego grzbietowego (C) w całych strukturach

Immunoreaktywność neuropilu w przedmurzu i jądrze śródgruszkowym grzbietowym była zależna głównie od dużej liczby GABA-ir punktów. GABA-ir włókna, o krótkim przebiegu, tworzyły sieci w obu strukturach. Często wraz z zakończeniami brały udział w tworzeniu koszyczków na niewybarwionych komórkach (ryc. 21B, D). Zakończenia GABA-ir występowały również na ciałach komórek GABA-pozytywnych.

#### **4.5 Ocena wzajemnych zależności między neuronami zawierającymi białka wiążące wapń, a neuronami GABA-pozytywnymi w przedmurzu i jądrze śródgruszkowym grzbietowym**

W przypadku podwójnych barwień: GABA i PV, GABA i CB, GABA i CR, w obu badanych strukturach stwierdzono współwystępowanie komórek GABA-pozytywnych i odpowiednio PV-, CB- lub CR-pozytywnych.

Liczba komórek zawierających białka wiążące wapń i wykazujących współwystępowanie z GABA, była zależna od rodzaju białka, jak również od struktury, w której przeprowadzono badanie.

Neurony zawierające GABA oraz białka wiążące wapń należały do trzech typów morfologicznych: komórki owalne, okrągłe oraz wieloboczne. Nie znaleziono istotnych różnic w rozkładach typów komórek między komórkami należącymi do różnych subpopulacji komórek wykazujących współwystępowanie (GABA-PV, GABA-CR, GABA-CB; test  $\chi^2$ ,  $p > 0,3$ ). We wszystkich typach współwystępowania dominowały neurony owalne. Stanowiły one przeważnie około połowy populacji komórkowej w każdym z badanych typów.

Analiza statystyczna wykazała istotne różnice rozkładów typów komórek wykazujących współwystępowanie (GABA/CaBPs) między badanymi strukturami (test  $\chi^2$ ,  $p < 0,001$ ). W jądrze śródgruszkowym grzbietowym zdecydowanie dominowały neurony owalne (>70%), podczas gdy udział neuronów wielobocznych był bardzo niewielki (około 10%). W przedmurzu udział neuronów owalnych był również największy, jednak podwójnie wyznakowana była również znacznie większa ilość neuronów wielobocznych.

Na wszystkich komórkach zawierających badane białka wiążące wapń znaleziono GABA-ir zakończenia, zarówno na ciele tych komórek jak i na ich wypustkach.

#### 4.5.1 Współwystępowanie parwalbuminy i kwasu $\gamma$ -aminomasłowego w neuronach przedmurza i jądra śródgruszkowego grzbietowego

Stwierdzono współwystępowanie PV i GABA w neuronach przedmurza (ryc. 23A-F) oraz jądra śródgruszkowego grzbietowego (ryc. 24A-C). Komórki, w których współwystępowała ekspresja PV i GABA, najczęściej należały do typu II, biorąc pod uwagę kryteria morfologiczne zastosowane dla komórek zawierających CaBPs. Zwykle nie posiadały żyłakowatości na wypustkach.

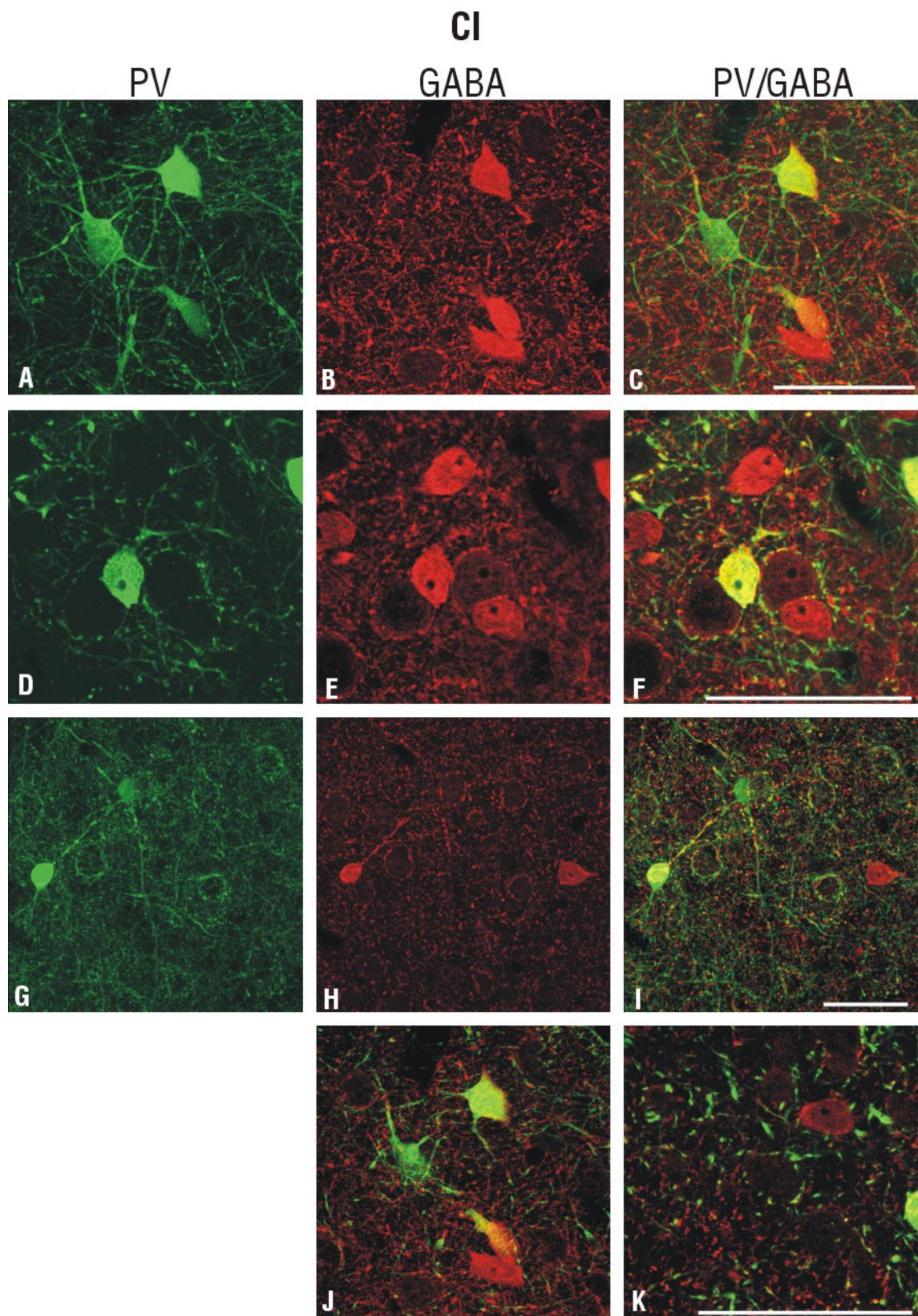
Liczby wyznakowanych neuronów u badanych zwierząt jak i ich rozkłady w wyróżnionych częściach przedmurza i jądra śródgruszkowego grzbietowego przedstawiają tabele XVI i XVII.

*Tabela XVI. Liczby wyznakowanych neuronów w przedmurzu i jądrze śródgruszkowym grzbietowym u badanych zwierząt*

Zwierzę	Liczba wyznakowanych neuronów					
	Przedmurze			Jądro śródgruszkowe grzbietowe		
	GABA	PV	GABA/PV	GABA	PV	GABA/PV
03-043	153	92	76	86	22	19
02-047	56	37	33	17	5	2
03-044	154	90	78	90	19	16

Dane z tabeli XVII posłużyły do wyliczenia odsetka wyznakowanych podwójnie neuronów (wykazujących współwystępowanie znaczników) w stosunku do wszystkich wyznakowanych neuronów GABA-pozytywnych lub PV-pozytywnych w wyróżnionych częściach przedmurza i jądra śródgruszkowego jak i w całych strukturach (ryc. 25).





**Ryc. 23.** Ekspresja GABA i PV w przedmurzu. Kolor czerwony to elementy GABA-pozytywne, zielony to elementy PV-pozytywne, żółty to neurony, w których występują GABA i PV. Opis w tekście. Odcinek podziałki = 50  $\mu\text{m}$ .

*Tabela XVII. Rozkład liczby wyznakowanych neuronów w wyróżnionych częściach przedmurza i jądra śródgruszkowego grzbietowego*

Struktura/część	Liczba wyznakowanych neuronów		
	PV	GABA	GABA/PV
Przedmurze			
część przednia	134	219	119
część środkowa	60	99	47
część tylna	25	45	21
Jądro śródgruszkowe grzbietowe			
część przednia	32	148	27
część tylna	14	45	10

Analiza statystyczna wykazała brak istotnych różnic w stopniu współwystępowania między badanymi częściami obu struktur.

Biorąc pod uwagę całe struktury nie wykazano również istotnych różnic w procencie komórek wykazujących współwystępowanie badanych znaczników między przedmurzem, a jądrem śródgruszkowym grzbietowym.

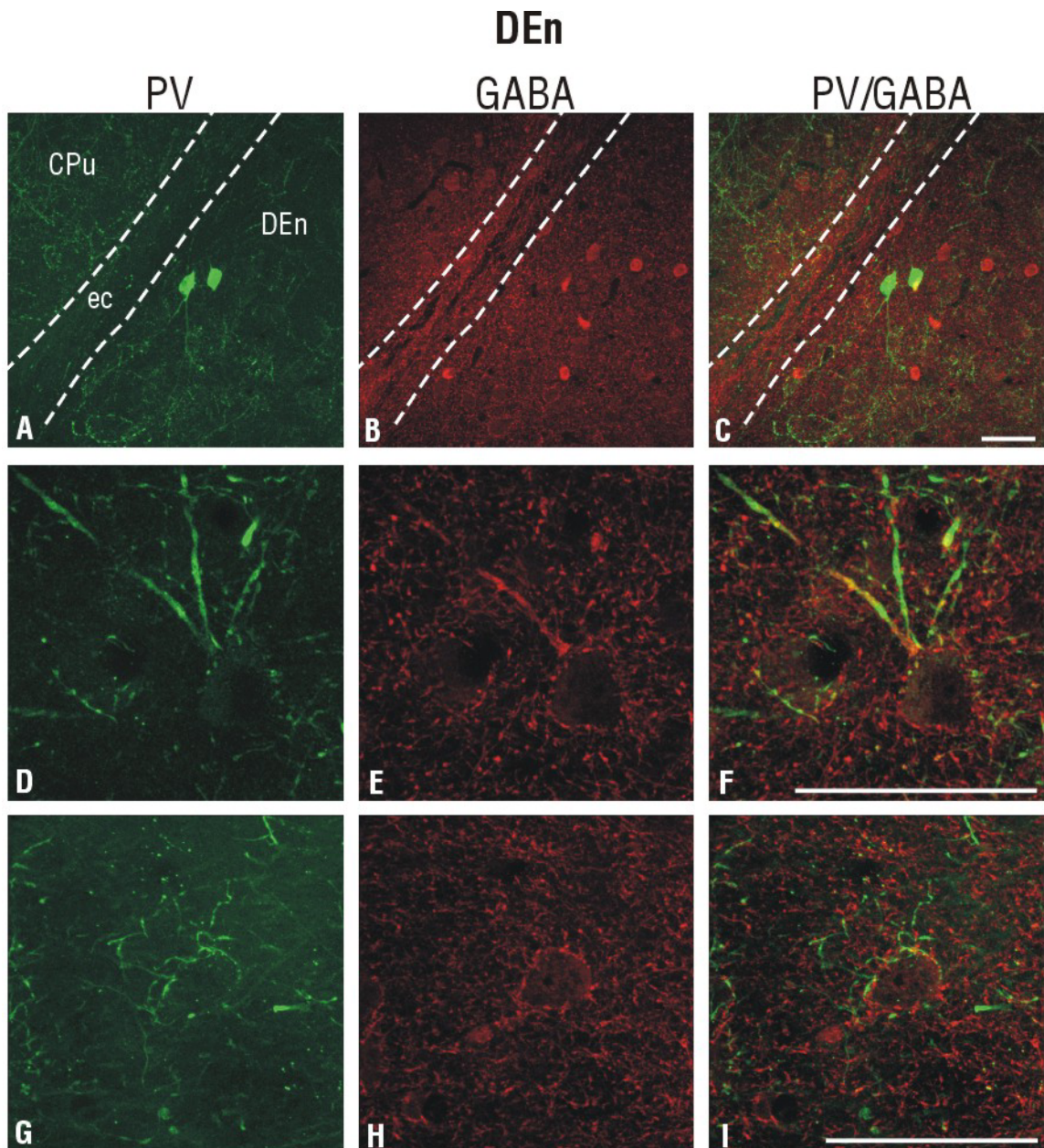
W obu strukturach oprócz komórek wykazujących współwystępowanie, znaleziono również współwystępowanie znaczników w obrębie wypustek (ryc. 23G-I, 24D-F).

Zakończenia GABA-ir zaobserwowano w obu badanych strukturach, na wszystkich oglądanych komórkach PV-pozytywnych (32/32 w przedmurzu zaś 9/9 w jądrze śródgruszkowym grzbietowym). Lokalizowały się one zarówno na ciele tych komórek jak i na ich wypustkach (ryc. 23J).

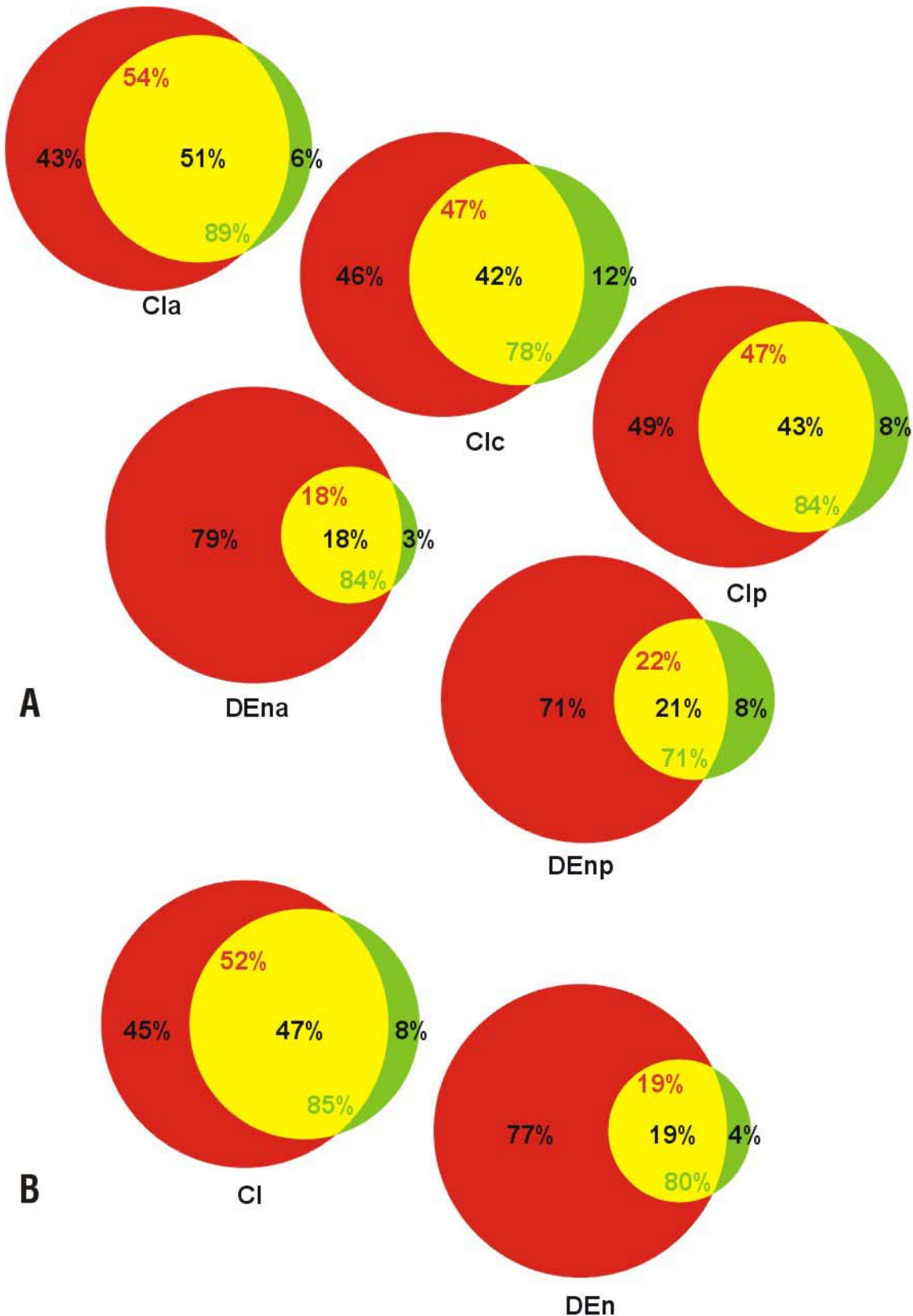
Z kolei na ciele większości komórek GABA-pozytywnych w przedmurzu – 82,0% (na 71 z 87 zbadanych komórek) znajdowano zakończenia PV-ir (ryc. 23K). W DEN obserwowano to rzadziej – w 33,3%, 10 z 30 zbadanych komórek GABA-pozytywnych posiadało zakończenia PV-ir.

Na wszystkich komórkach zawierających zarówno PV i GABA w CI i DEN obserwowano zakończenia GABA-ir oraz PV-ir.





**Ryc. 24.** Ekspresja GABA i PV w jądrze śródgruszkowym grzbietowym. Kolor czerwony to elementy GABA-pozytywne, zielony to elementy PV-pozytywne, żółty oznacza dendryty, w których występują GABA i PV (F). Opis w tekście. Użyte skróty: CPu-prążkowie grzbietowe, ec-torebka zewnętrzna, DEn-jądro śródgruszkowe grzbietowe. Odcinek podziałki = 50  $\mu\text{m}$ .



**Ryc. 25.** Procentowy udział badanych subpopulacji komórkowych (A)-w badanych częściach CI i DEn, (B)-w badanych strukturach. Kolor: zielony-PV, czerwony-GABA, żółty-współwystępowanie PV i GABA. Liczby: zielone-procent neuronów PV zawierających GABA, czerwone-procent neuronów GABA zawierających PV, czarne-procent całkowitej liczby neuronów wyznakowanych w podwójnym barwieniu.

W przedmurzu (ryc. 23D-I) i jądrze śródgruszkowym grzbietowym (ryc. 24G-I) wykazano również istnienie koszyczków otaczających niewybarwione komórki utworzonych zarówno przez elementy GABA-ir jak i PV-ir.

#### 4.5.2 Współwystępowanie kalbindyny D-28k i kwasu $\gamma$ -aminomasłowego w neuronach przedmurza i jądra śródgruszkowego grzbietowego

Zarówno w przedmurzu (ryc. 26A-C) jak i w jądrze śródgruszkowym grzbietowym (ryc. 27A-C) znaleziono neurony, w których współwystępowały CB i GABA. Liczby wyznakowanych neuronów u poszczególnych zwierząt jak i ich rozkłady wewnątrz badanych struktur przedstawiają tabele XVIII i XIX.

*Tabela XVIII. Liczby wyznakowanych neuronów w przedmurzu i jądrze śródgruszkowym grzbietowym u badanych zwierząt*

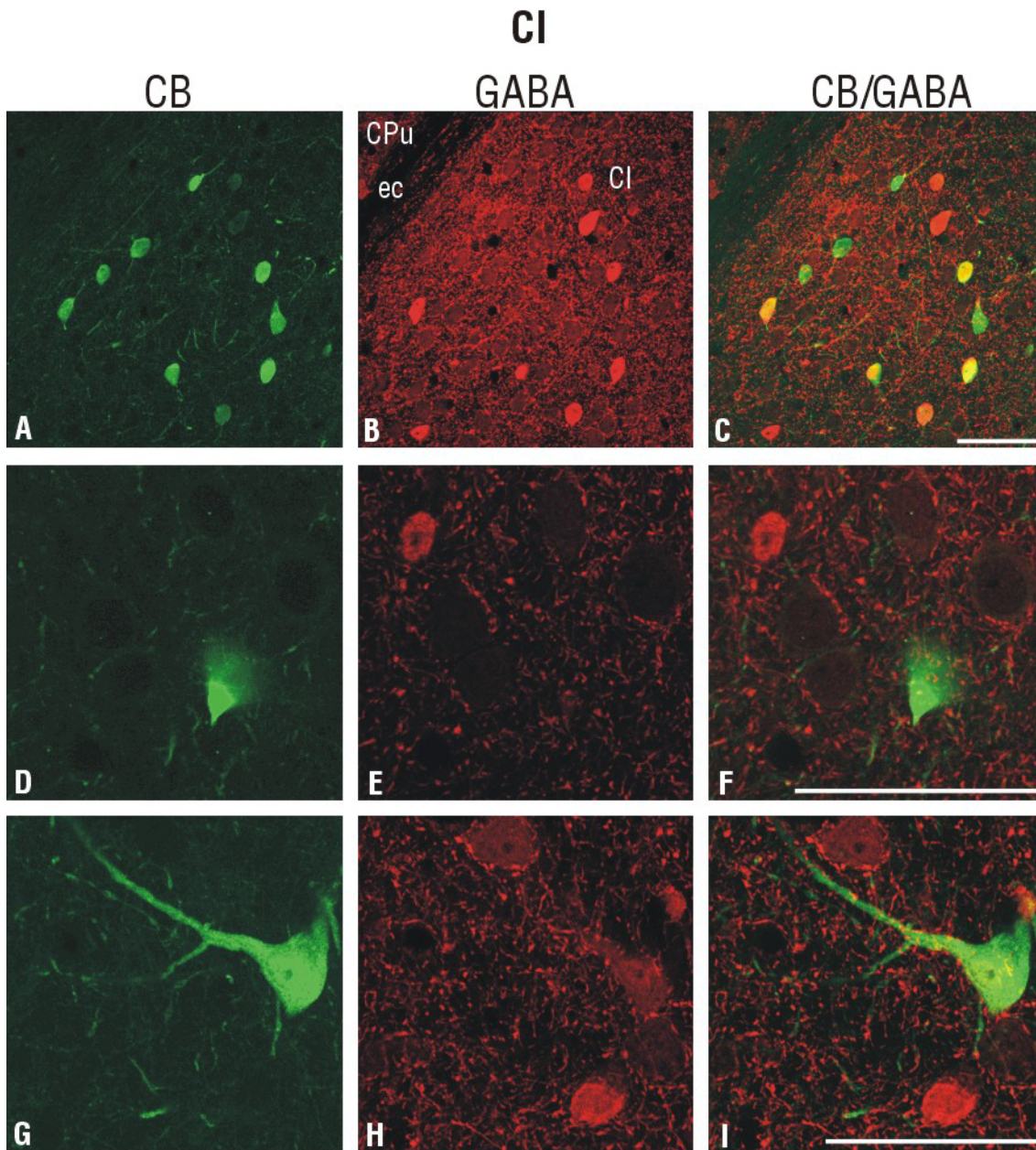
Zwierzę	Liczba wyznakowanych neuronów					
	Przedmurze			Jądro śródgruszkowe grzbietowe		
	GABA	CB	GABA/CB	GABA	CB	GABA/CB
03-043	113	100	60	77	58	27
02-047	41	23	20	45	27	21
03-044	130	97	57	98	81	46

Wartości z tabeli XIX wykorzystano do obliczenia odsetka wyznakowanych podwójnie neuronów (wykazujących współwystępowanie) w stosunku do wszystkich wyznakowanych GABA-pozytywnych lub CB-pozytywnych neuronów w wyróżnionych częściach przedmurza i jądra śródgruszkowego jak i w całych strukturach (ryc. 28).

Analiza statystyczna wykazała brak istotnych różnic w stopniu współwystępowania badanych substancji między poszczególnymi częściami przedmurza.

W jądrze śródgruszkowym grzbietowym obecna była różnica w stopniu współwystępowania badanych znaczników między częścią przednią, a tylną struktury (test istotności różnic wskaźników struktur,  $p < 0,001$ ).





**Ryc. 26.** Ekspresja GABA i CB w przedmurzu. Kolor czerwony to elementy GABA-pozytywne, zielony to elementy CB-pozytywne, żółty to neurony w których występują GABA i CB. Opis w tekście. Użyte skróty: CI-przedmurze, CPu-prążkowie grzbietowe, ec-torebka zewnętrzna. Odcinek podziałki = 50  $\mu\text{m}$ .

Biorąc pod uwagę całe struktury nie wykazano również istotnych różnic w procencie komórek wykazujących współwystępowanie między przedmurzem, a jądrem śródgruszkowym grzbietowym.

*Tabela XIX. Rozkład liczby wyznakowanych neuronów w wyróżnionych częściach przedmurza i jądra śródgruszkowego grzbietowego*

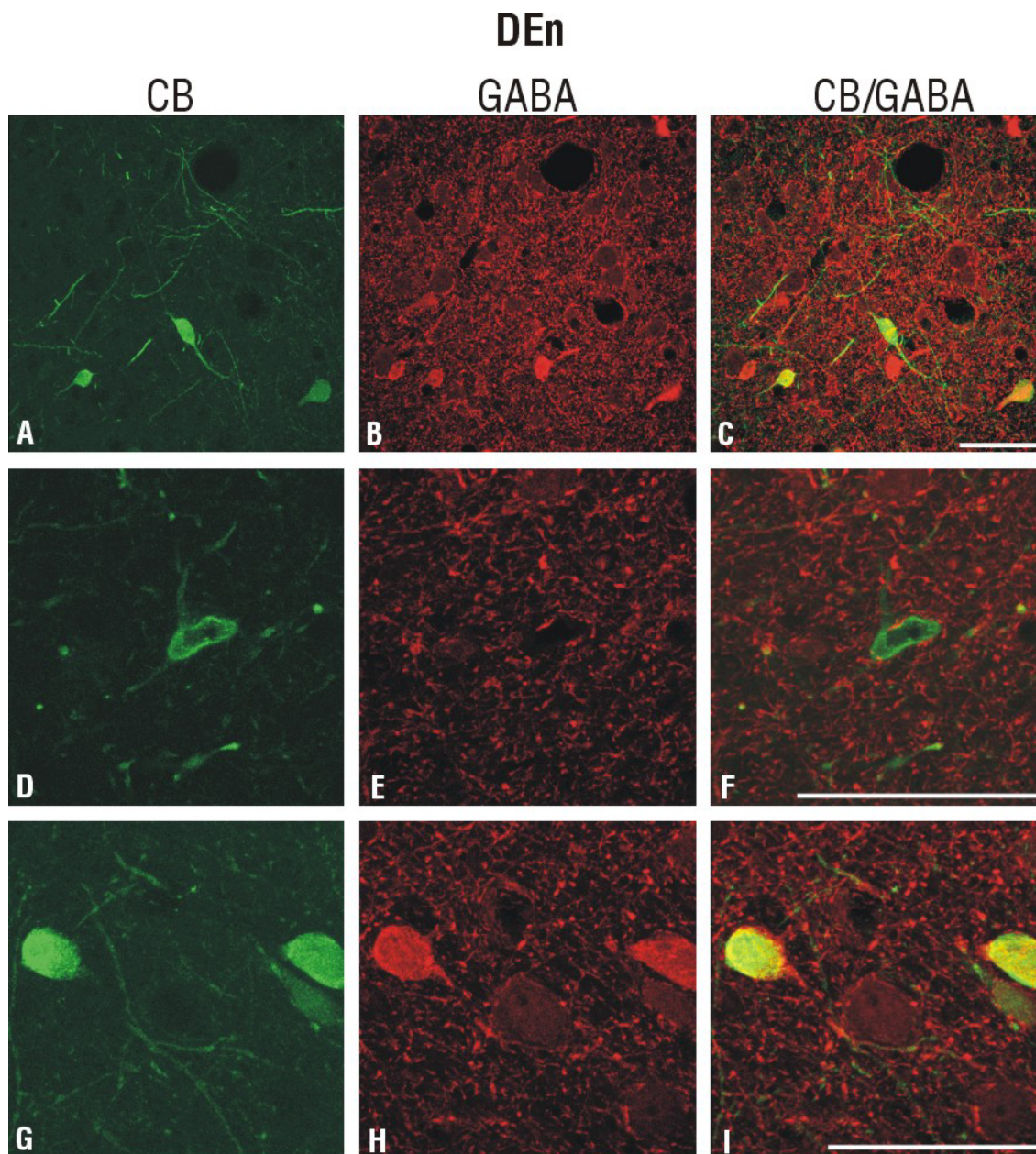
Struktura/część	Liczba wyznakowanych neuronów		
	CB	GABA	GABA/CB
Przedmurze			
część przednia	77	96	55
część środkowa	62	84	34
część tylna	81	104	50
Jądro śródgruszkowe grzbietowe			
część przednia	76	97	53
część tylna	90	123	41

Zarówno w Cl (ryc. 26G-I) jak i w DEn (ryc. 27D-F) prawie na wszystkich badanych komórkach CB-pozytywnych występowały zakończenia GABA-ir (w Cl zakończenia GABA-ir występowały na 79 z 81 zbadanych komórek, w DEn na wszystkich 42 komórkach znaleziono zakończenia GABA-ir). Obserwowano je głównie na ciele wyznakowanych komórek, ale występowały również na ich wypustkach.

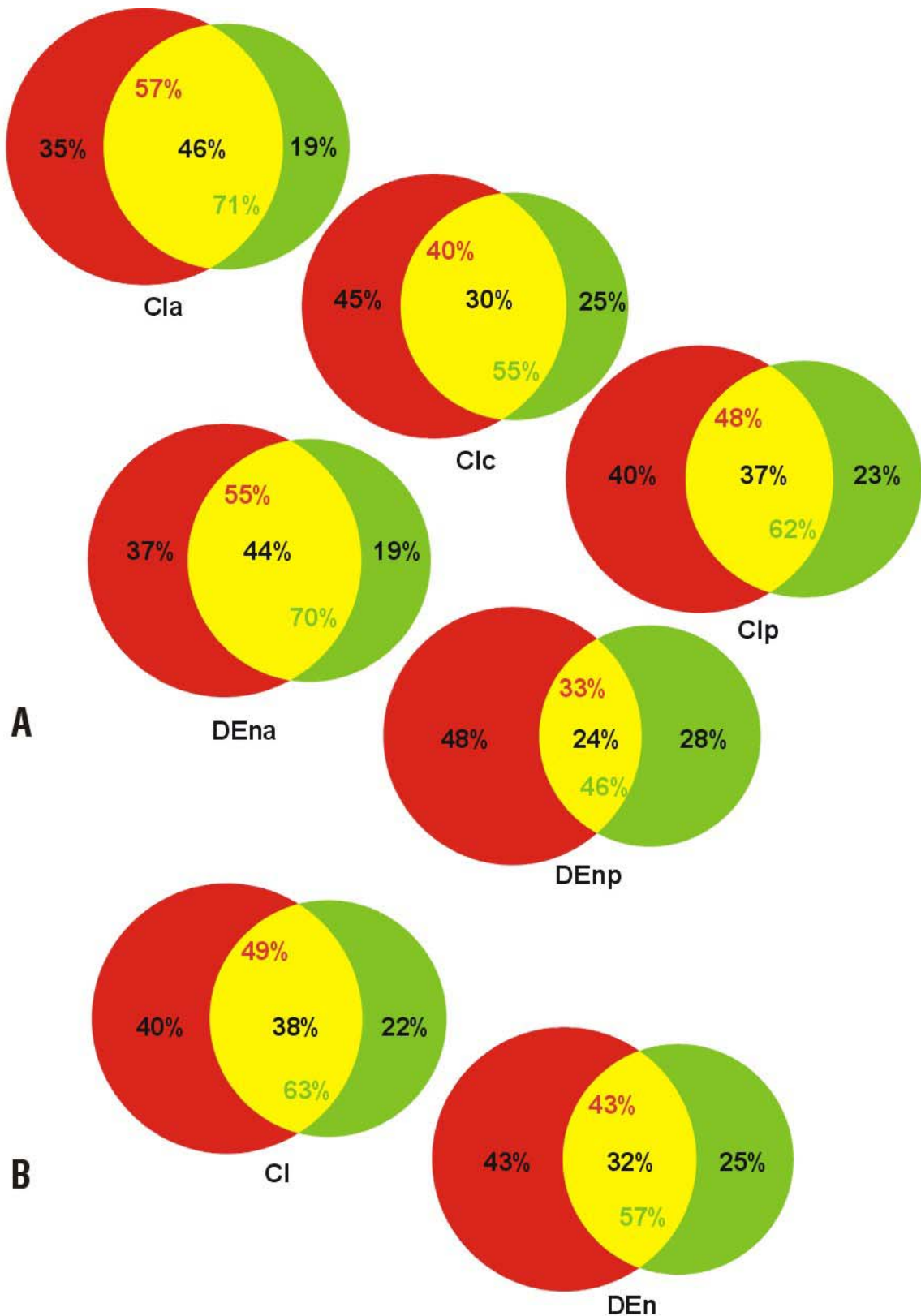
Zakończenia CB-ir tylko sporadycznie występowały na komórkach GABA-pozytywnych. Obraz ten był zbliżony w przedmurzu i jądrze śródgruszkowym grzbietowym (w Cl ze 106 zbadanych komórek GABA-pozytywnych, zakończenia CB-ir występowały na 27, w DEn zakończenia CB-ir znaleziono na 12 komórkach z 54 przeanalizowanych). Zarówno w Cl jak i w DEn na wszystkich zbadanych komórkach wykazujących współwystępowanie GABA i CB występowały zakończenia GABA-ir oraz CB-ir.

GABA-ir elementy w obu strukturach tworzyły koszyczki na niewybarwionych komórkach. Jedynie sporadycznie zakończenia CB-ir brały udział w tworzeniu koszyczków (ryc. 26D-F, ryc. 27G-I).





**Ryc. 27.** Ekspresja GABA i CB w jądrze śródgruszkowym grzbietowym. Kolor czerwony to elementy GABA-pozytywne, zielony to elementy CB-pozytywne, żółty to neurony w których występują GABA i CB. Opis w tekście. Odcinek podziałki = 50  $\mu\text{m}$ .



**Ryc. 28.** Procentowy udział badanych subpopulacji komórkowych (A)-w wyróżnionych częściach CI i DEN, (B)-w całych strukturach. Kolor: zielony-CB, czerwony-GABA, żółty-współwystępowanie CB i GABA. Liczby: zielone-procent neuronów PV zawierających GABA, czerwone-procent neuronów GABA zawierających CB, czarne-procent całkowitej liczby neuronów wyznakowanych w podwójnym barwieniu.

### 4.5.3 Współwystępowanie kalretyniny i kwasu $\gamma$ -aminomasłowego w neuronach przedmurza i jądra śródgruszkowego grzbietowego

W przedmurzu (ryc. 29A-C) jak i w jądrze śródgruszkowym grzbietowym (ryc. 30A-C) znaleziono neurony, w których współwystępowały CR i GABA. Liczby wyznakowanych neuronów u poszczególnych zwierząt jak i ich rozkłady w wyróżnionych częściach badanych struktur przedstawiają tabele XX i XXI.

*Tabela XX. Liczby wyznakowanych neuronów w przedmurzu i jądrze śródgruszkowym grzbietowym u badanych zwierząt*

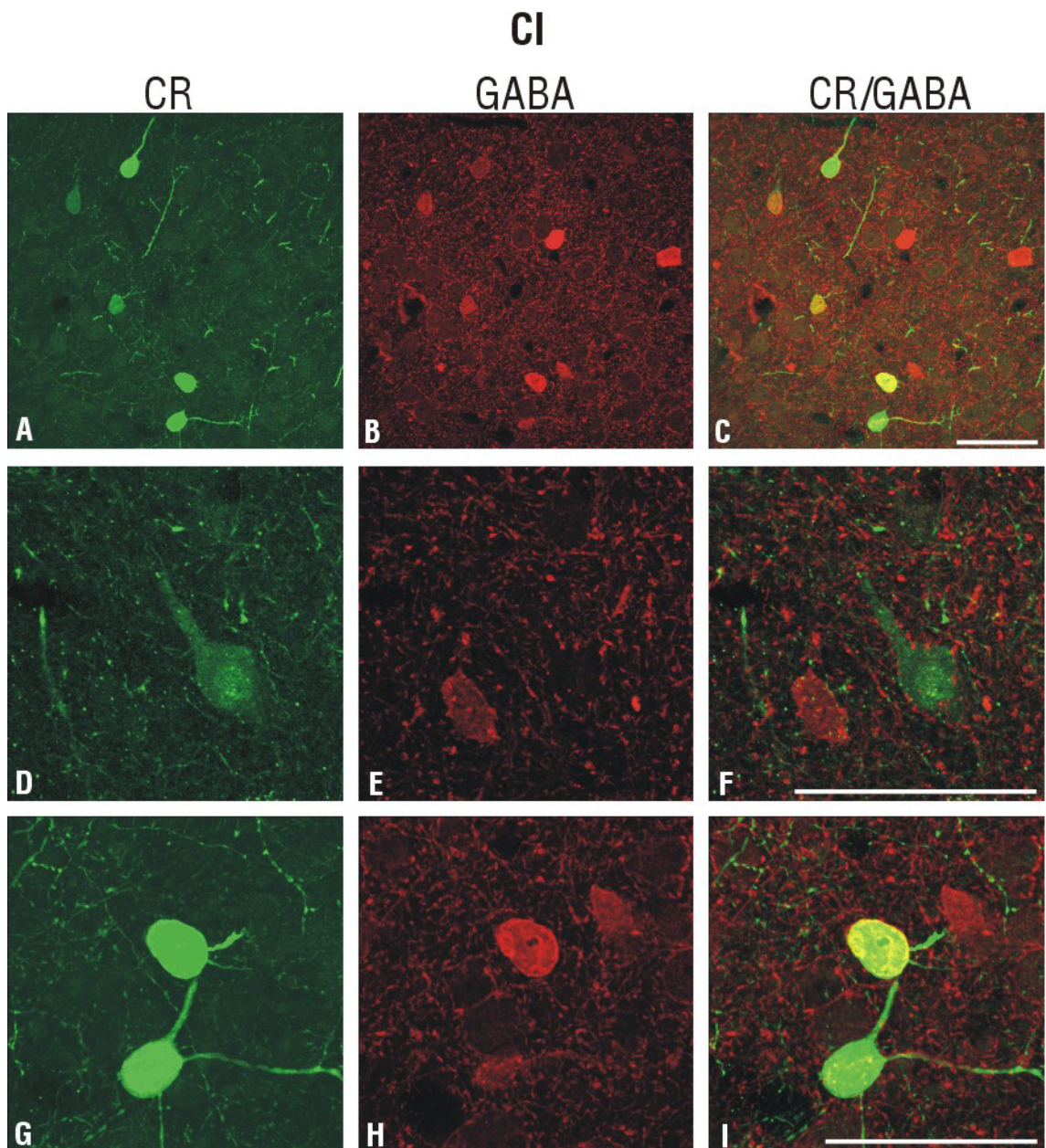
Zwierzę	Liczba wyznakowanych neuronów					
	Przedmurze			Jądro śródgruszkowe grzbietowe		
	GABA	CR	GABA/CR	GABA	CR	GABA/CR
03-043	138	40	20	78	27	9
02-047	39	20	11	57	28	9
03-044	143	44	26	89	25	10

*Tabela XXI. Rozkład liczby wyznakowanych neuronów w wyróżnionych częściach przedmurza i jądra śródgruszkowego grzbietowego*

Struktura/część	Liczba wyznakowanych neuronów		
	CR	GABA	GABA/CR
Przedmurze			
część przednia	38	114	22
część środkowa	29	125	19
część tylna	37	81	16
Jądro śródgruszkowe grzbietowe			
część przednia	45	122	16
część tylna	35	102	12

Zamieszczone w tabeli XXI dane zostały użyte do wyliczenia odsetka wyznakowanych podwójnie neuronów (wykazujących współwystępowanie) w stosunku do wszystkich wyznakowanych GABA-pozytywnych lub CR-pozytywnych neuronów w wyróżnionych częściach przedmurza i jądra





**Ryc. 29.** Ekspresja GABA i CR w przedmurzu. Kolor czerwony to elementy GABA-pozytywne, zielony to elementy CR-pozytywne, żółty to neurony w których występują GABA i CR. Opis w tekście. Odcinek podziałki = 50  $\mu\text{m}$ .

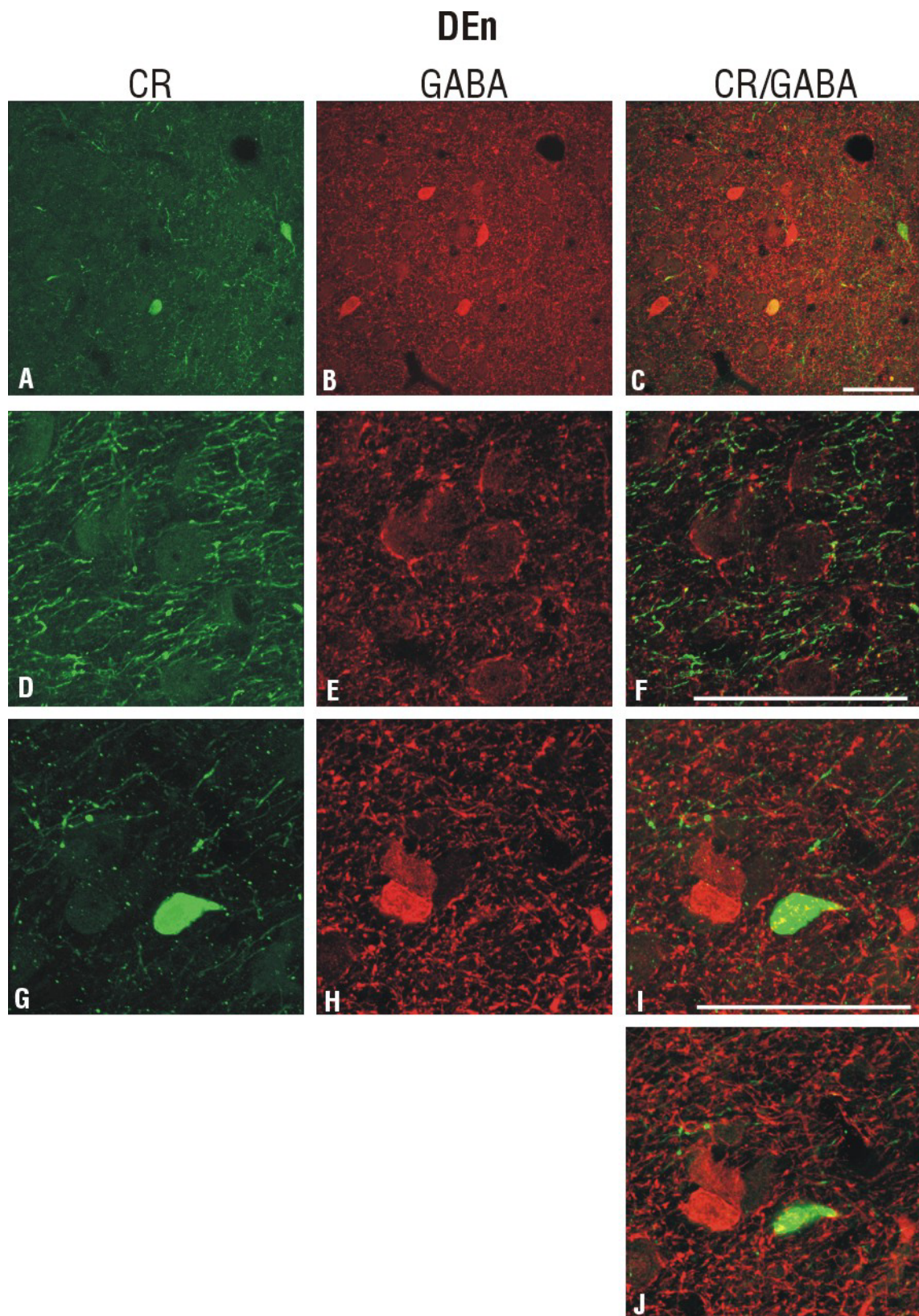
śródogruszkowego grzbietowego jak i w całych strukturach (ryc. 31).

Analiza statystyczna nie wykazała istotności różnic w procencie neuronów wykazujących współwystępowanie badanych substancji zarówno między częściami badanych struktur jak i między strukturami.

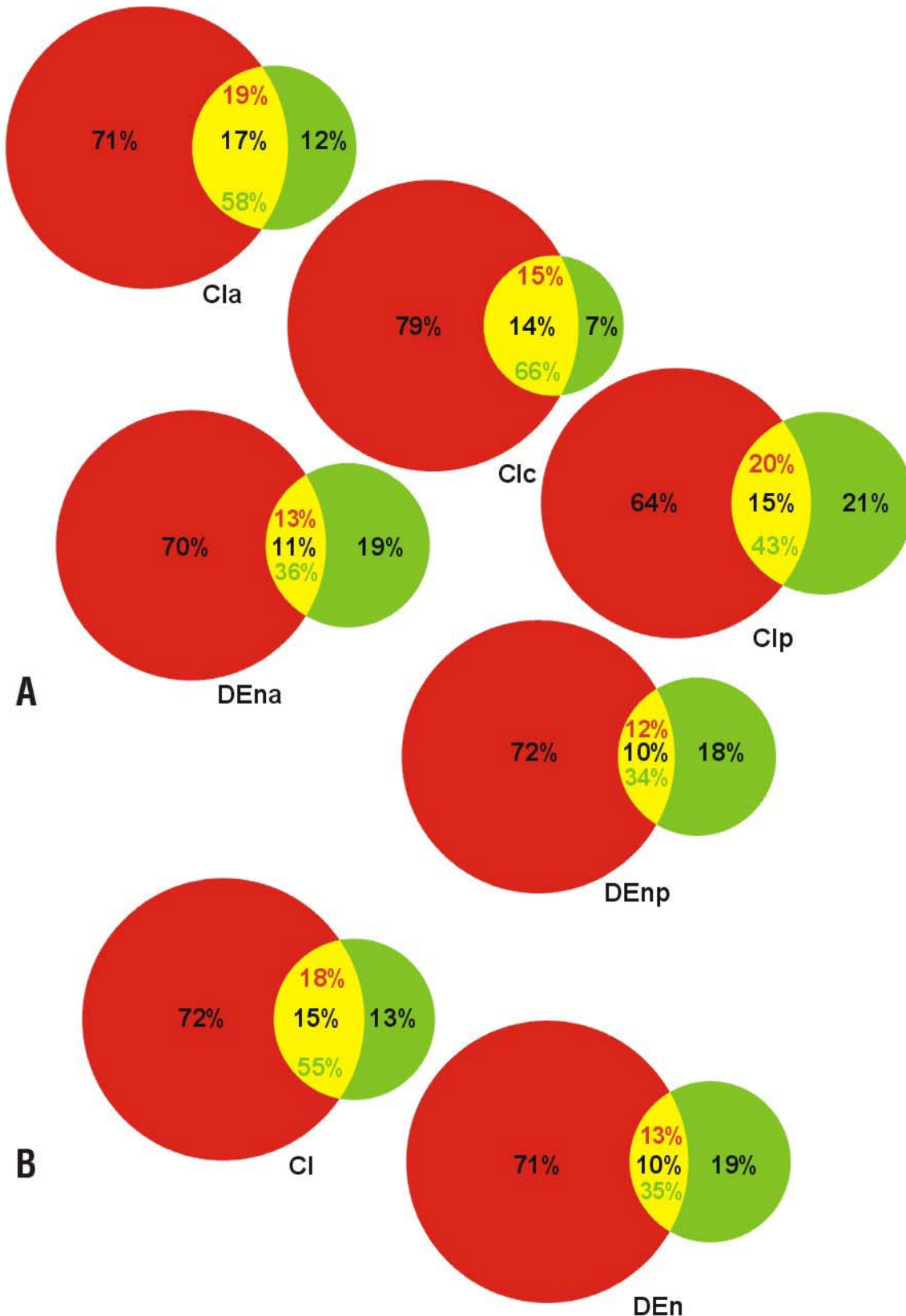
Zarówno w Cl jak i w DEn na wszystkich przebadanych komórkach CR-pozytywnych występowały zakończenia GABA-ir (w Cl na wszystkich zbadanych 42 komórkach CR-pozytywnych występowały zakończenia GABA-ir podobnie w DEn na wszystkich zbadanych 22 komórkach były obecne zakończenia GABA-ir). Obecne one były głównie na ciałach komórek (ryc. 29D-F, ryc. 30G-J) oraz na początkowych odcinkach ich wypustek (ryc. 29G-I). Jedynie sporadycznie obserwowano zakończenia CR-ir w Cl jak i w DEn na ciałach nielicznych komórek GABA-pozytywnych (w Cl z 96 komórek GABA-pozytywnych na 25 występowały zakończenia CR-ir, w DEn z 40 komórek GABA-pozytywnych zakończenia CR-ir występowały na 12). W obu strukturach na wszystkich komórkach, w których występowały wspólnie GABA i CR znaleziono zakończenia GABA-ir i CR-ir.

Zarówno w przedmurzu jaki i jądrze śródogruszkowym grzbietowym GABA-ir elementy tworzyły koszyczki na niewybarwionych komórkach, natomiast elementy CR-ir również bezpośrednio kontaktowały się z ciałami niewybarwionych komórek, jednak nie tworzyły ewidentnych koszyczków (ryc. 29G-I, ryc. 30D-F).





**Ryc. 30.** Ekspresja GABA i CR w jądrze śródgruszkowym grzbietowym. Kolor czerwony to elementy GABA-pozytywne, zielony to elementy CR-pozytywne, żółty to neurony w których występują GABA i CR. Opis w tekście. Odcinek podziałki = 50  $\mu$ m.

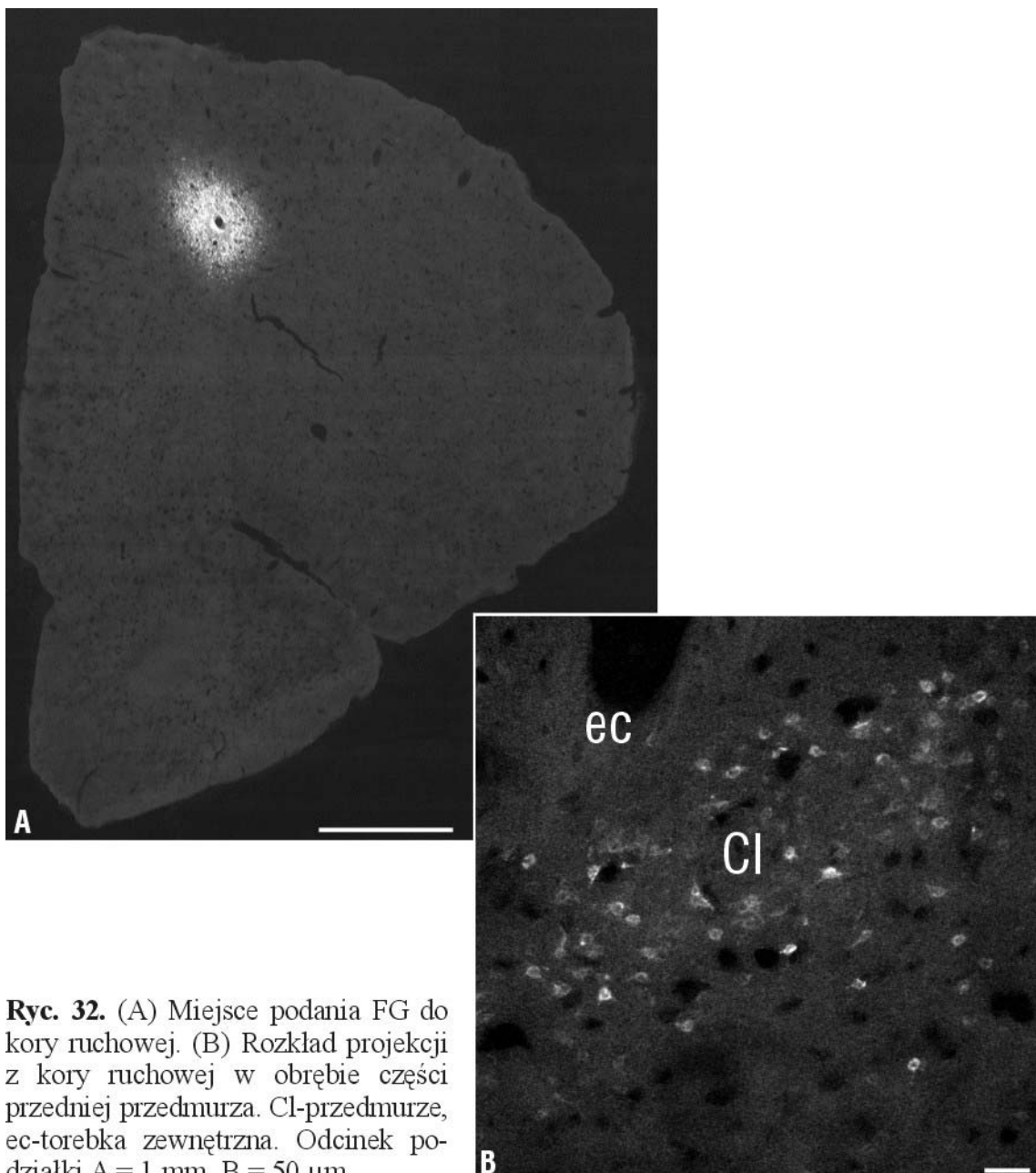


**Ryc. 31.** Procentowy udział badanych subpopulacji komórkowych (A)-w wyróżnionych częściach CI i DEn, (B)-w całych strukturach. Kolor: zielony-CR, czerwony-GABA, żółty-współwystępowanie CR i GABA. Liczby: zielone-procent neuronów PV zawierających GABA, czerwone-procent neuronów GABA zawierających CR, czarne-procent całkowitej liczby neuronów wyznakowanych w podwójnym barwieniu.

#### **4.6 Analiza wzajemnych relacji neuronów projekcyjnych i neuronów zawierających CaBPs przy użyciu metod wstecznego transportu aksonalnego i technik immunohistochemicznych**

##### **4.6.1 Rozkład neuronów przedmurza, wyznakowanych znacznikiem FG, projektujących do kory ruchowej**

Po podaniu znacznika do kory ruchowej (ryc. 32A) u wszystkich badanych zwierząt, stwierdzono obecność wyznakowanych neuronów na przekrojach przedniej i środkowej części przedmurza – do poziomu -0,26 mm względem Bregmy (ryc. 32B).



**Ryc. 32.** (A) Miejsce podania FG do kory ruchowej. (B) Rozkład projekcji z kory ruchowej w obrębie części przedniej przedmurza. Cl-przedmurze, ec-torebka zewnętrzna. Odcinek podziałki A = 1 mm, B = 50  $\mu$ m.



Bardziej ku tyłowi przedmurza nie znaleziono komórek wyznakowanych fluorescencyjnie u żadnego z badanych zwierząt. Wyznakowane komórki najliczniej występowały jednak w przedniej części Cl. Były one zróżnicowane pod względem wielkości ciała i kształtu. Najczęściej występowały neurony średnie i duże, piramidopodobne i owalne. Rozmieszczone były stosunkowo równomiernie.

Przed przystąpieniem do barwień immunohistochemicznych, podania do kory ruchowej były weryfikowane obecnością wyznakowanych wstecznie komórek w odpowiednich jądrach: brzuszno-bocznym i brzuszno-przyśrodkowym wzgórza.

#### **4.6.2 Analiza wzajemnych relacji między neuronami FG-pozytywnymi i neuronami zawierającymi PV w części przedniej przedmurza**

Przeprowadzona analiza preparatów barwionych podwójnie, z użyciem przeciwciał przeciw-FG i przeciw-PV wykazała, że zarówno neurony FG-pozytywne jak i komórki zawierające PV były obecne w przedniej części przedmurza. Neurony projekcyjne były większe, piramidopodobne lub owalne. Komórki PV-pozytywne były natomiast mniejsze, bardziej okrągłe, posiadały wybarwione stosunkowo jednorodnie zarówno ciało jak i wypustki (ryc. 33A-C). Obie grupy neuronów były wzajemnie wymieszane i stanowiły zupełnie rozdzielne populacje komórek o czym świadczył brak neuronów zawierających jednocześnie oba badane znaczniki oraz różnice w morfologii komórek.

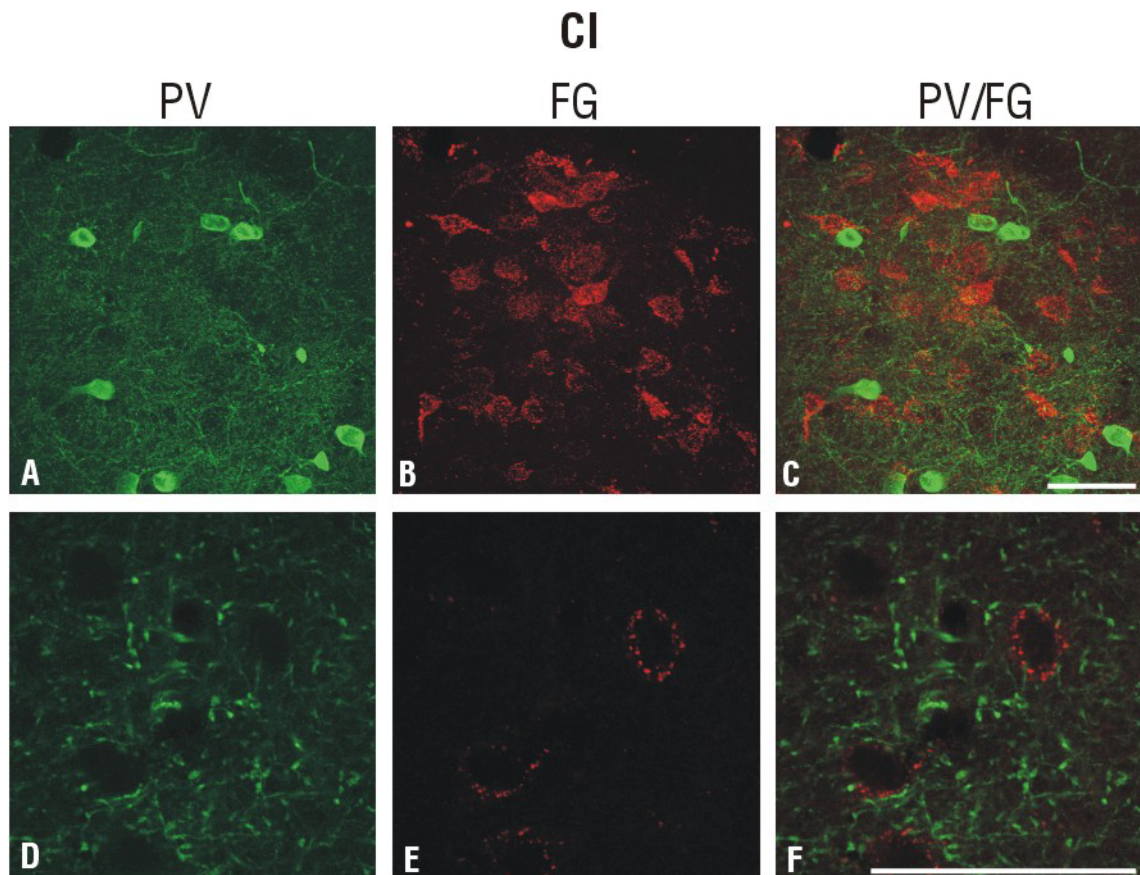
Ciała wyznakowanych FG neuronów projekcyjnych były otoczone włóknami i zakończeniami PV-ir układającymi się w charakterystyczne koszyczki (ryc. 33D-F).

#### **4.6.3 Analiza wzajemnych relacji między neuronami FG-pozytywnymi i neuronami zawierającymi CB w przedniej części przedmurza**

Analiza preparatów histologicznych zawierających zarówno neurony projekcyjne (FG-pozytywne), jak i komórki zawierające CB wykazała, że obie populacje występowały w obrębie przedniej części przedmurza. W obrębie opisanej strefy projekcyjnej neurony FG-pozytywne i CB-pozytywne były rozmieszczone równomiernie u wszystkich badanych zwierząt. Ciała neuronów projekcyjnych były

piramidopodobne i posiadały zaznaczone jedynie początkowe odcinki wypustek. Natomiast komórki CB-pozytywne posiadały mniejsze, owalne ciało i długie wybarwione wypustki (ryc. 34A-C). Nie stwierdzono też wzajemnego współwystępowania podanego znacznika fluorescencyjnego i kalbindyny D28-k w obrębie jednego neuronu. Komórki te stanowiły całkowicie rozdzielne populacje.

Nie zaobserwowano zakończeń CB-ir na ciałach neuronów projekcyjnych.



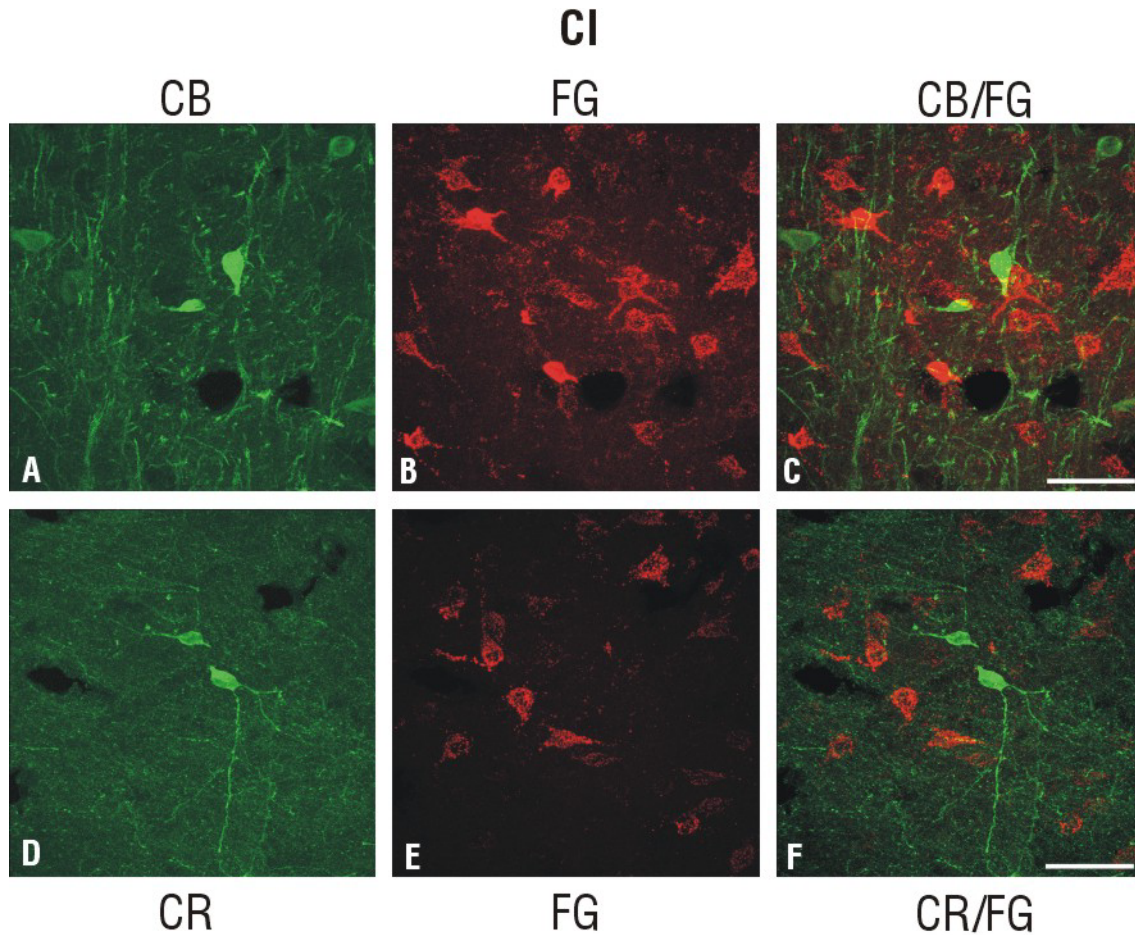
**Ryc. 33.** Ekspresja neuronów FG-pozytywnych i elementów PV-immunoreaktywnych w przedniej części przedmurza. Kolor czerwony oznacza neurony FG-pozytywne, zielony to elementy PV-immunoreaktywne. Opis w tekście. Odcinek podziałki = 50  $\mu$ m.

#### 4.6.4 Analiza wzajemnych relacji między neuronami FG-pozytywnymi i neuronami zawierającymi CR w przedniej części przedmurza

Analiza preparatów immunohistochemicznych barwionych podwójnie, na obecność FG i CR, wykazała obecność obu wyznakowanych populacji neuronów w badanej części przedmurza u wszystkich zwierząt poddanych doświadczeniu.

Neurony FG-pozytywne były wymieszane z neuronami CR-pozytywnymi, stanowiły jednak rozdzielne populacje (ryc. 34D-F).

Zakończeń CR-ir nie znaleziono na neuronach projekcyjnych u żadnego z badanych zwierząt.



**Ryc. 34.** Ekspresja neuronów FG-pozytywnych i CB-pozytywnych (A-C) oraz neuronów FG-pozytywnych i CR-pozytywnych (D-F) w przedniej części przedmurza. Kolor czerwony oznacza neurony FG-pozytywne, zielony to neurony CB-pozytywne (A-C) oraz CR-pozytywne (D-F). Odcinek podziałki = 50  $\mu\text{m}$ .



## 5 DYSKUSJA

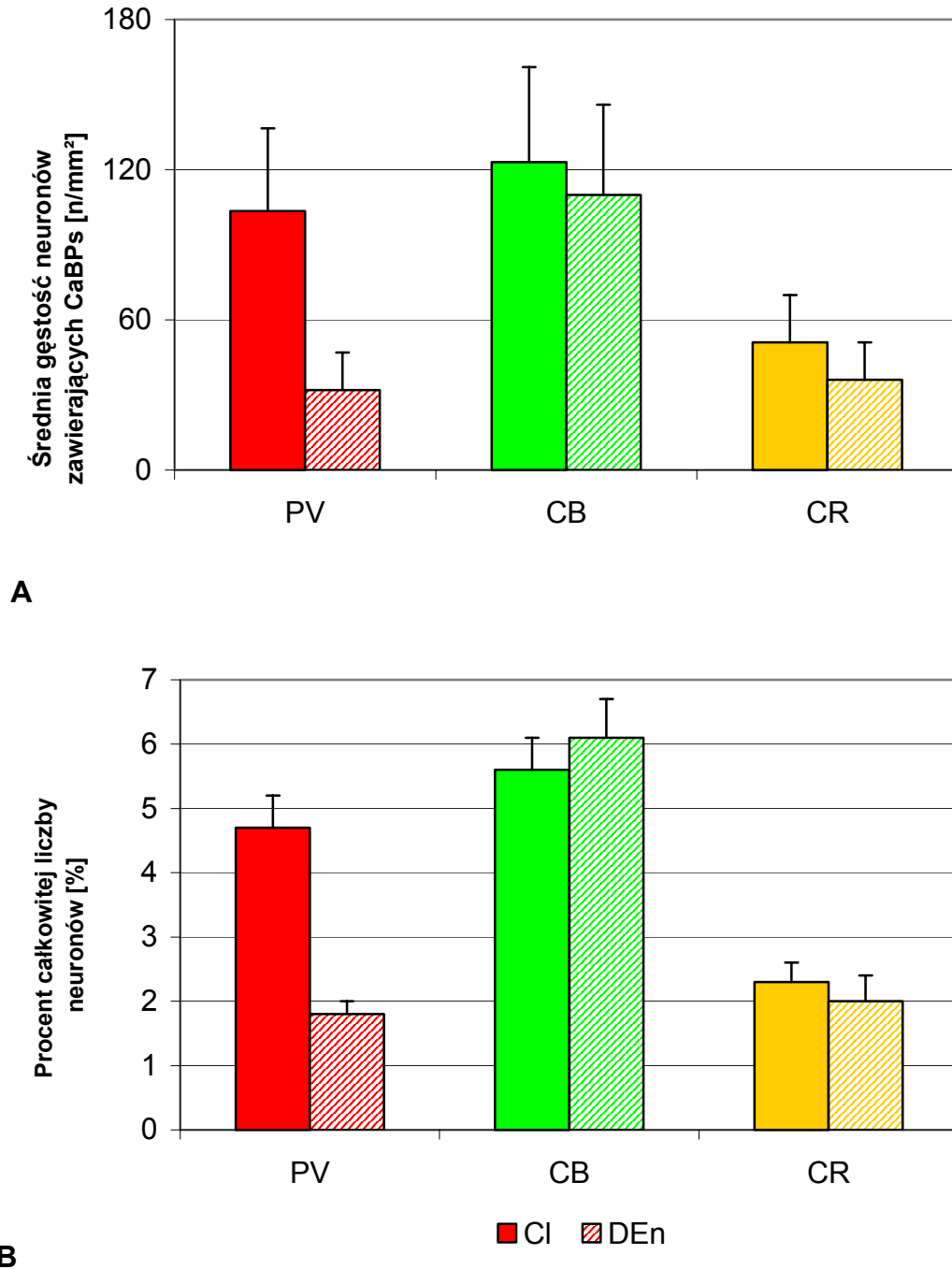
Jakkolwiek białka wiążące wapń w przedmurzu i jądrze śródgruszkowym grzbietowym opisywane były już wcześniej w piśmiennictwie światowym to jak dotychczas nie sprecyzowano ich relacji do komórek zawierających kwas  $\gamma$ -aminomasłowy [38,54,113,184]. Moje badania precyzują te spostrzeżenia, dostarczają danych o udziale poszczególnych populacji neuronalnych zawierających białka wiążące wapń i wykazujących ekspresję neurotransmitera GABA w tej okolicy, oraz szacują ich stosunek do neuronów projekcyjnych.

### 5.1 *Morfologia neuronów zawierających CaBPs*

Moje badania wykazały, że populacja neuronów zawierających białka wiążące wapń nie jest homogenna, lecz składa się z kilku subpopulacji komórkowych posiadających odmienną budowę morfologiczną.

Neurony zawierające białka wiążące wapń występują w wielu okolicach mózgowia. Istniejące podziały morfologiczne bazują na kształcie i wielkości perykarionu oraz budowie drzewa dendrytycznego. Podziały morfologiczne opierające się na charakterystyce wypustek zdecydowanie łatwiej jest zastosować w strukturach o budowie warstwowej [40] niż w jądrach podkorowych. Dlatego też przyjęty przeze mnie podział neuronów wzoruje się na podziale zaproponowanym dla ciała migdałowatego, będącego podobnie jak przedmurze i jądro śródgruszkowe grzbietowe strukturą podkorową [103].

Wyróżniłam 4 główne typy neuronów charakterystycznych dla populacji komórek zawierających białka wiążące wapń w obu badanych strukturach. Typ I tworzą małe, owalne neurony z 3-5 cienkimi wypustkami o równej grubości. Typu II to średnie i duże, wieloboczne neurony również z 3-5 wypustkami o różnej średnicy. Do typu III zaliczyłam neurony dwubiegunowe o owalnym (CR-pozytywne) i wrzecionowatym (PV-, CB-pozytywne) kształcie. Typ IV stanowiły duże neurony piramidopodobne. Należy zaznaczyć, że ponad 90% stanowiły neurony pierwszych trzech typów, a udział neuronów typu IV był mniejszy niż 10% (ryc. 35).



**Ryc.35.** Rozkłady gęstości (A) i procentowych udziałów (B) neuronów zawierających białka wiążące wapń w przedmurzu i jądrze śródgruszkowym grzbietowym szczura.

Wcześniejsze badania oparte na klasycznych technikach barwienia opisują populacje neuronalne przedmurza i jądra śródgruszkowego bazując na kształcie, wielkości ciała neuronu oraz charakterystycznych cechach ich wypustek. Badania metodą Golgiego wykazały istnienie licznych neuronów zawierających kolce dendrytyczne oraz mniej licznych – neuronów bezkolcowych [138]. Przy czym neurony z kolcami dendrytycznymi odpowiadają neuronom projekcyjnym, natomiast bezkolcowe neuronom wstawkowym [40]. Biorąc pod uwagę, że większość neuronów zawierających białka wiążące wapń to neurony wstawkowe, nie dziwi fakt, że obserwowałam w badanych przeze mnie populacjach neuronalnych niewielką ilość neuronów piramidopodobnych, które mogłyby odpowiadać neuronom piramidalnym z grupy neuronów zawierających kolce dendrytyczne wyróżnionych przez Mamos [138]. Analogicznie większa ilość obserwowanych przeze mnie neuronów typu I (małe owalne) jak i typu III (dwubiegunowe) może odpowiadać neuronom bezkolcowym [138]. Od tego schematu odbiega wyróżniony przeze mnie typ II, który ze względu na cechy morfologiczne oraz wielkość ciała neuronu przynależałby raczej do neuronów MS (grupa neuronów z kolcami)[138].

Podobne typy neuronów obserwowane były w przedmurzu i jądrze śródgruszkowym grzbietowym już od najprymitywniejszych ssaków [6], poprzez kolejne szczeble filogenetyczne [46,192,236], aż do naczelnych [187]. Typy te wydają się odpowiadać również neuronom zawierającym białka wiążące wapń występującym w jądrach ciała migdałowatego [103,141,150] co w świetle badań rozwojowych wydaje się potwierdzać wspólne, korowe, pochodzenie przedmurza, jądra śródgruszkowego i ciała migdałowatego [146]. Zróżnicowany jest jednak udział poszczególnych typów neuronów. W przedmurzu i jądrze śródgruszkowym grzbietowym myszy np. przeważają neurony wielobiegunowe [184]. Podobne spostrzeżenia wynikają z obserwacji tej okolicy u szczura, co może świadczyć o dużym bogactwie wytwarzanych przez nie połączeń.

### **5.1.1 Porównanie ekspresji parwalbuminy, kalbindyny oraz kalretyniny w przedmurzu i jądrze śródgruszkowym grzbietowym**

W moich badaniach zaobserwowałam, że zarówno przedmurze jak i jądro śródgruszkowe grzbietowe charakteryzowały się zróżnicowaną ilościowo i jakościowo ekspresją białek wiążących wapń, chociaż udziały każdej z subpopulacji neuronalnych zawierającej te białka w obu strukturach były nie większe niż 7% (ryc. 35).

Porównanie zarówno średnich gęstości neuronów PV-, CB-, CR-pozytywnych jak i ich udziału procentowego w stosunku do wszystkich neuronów danej struktury wykazało statystycznie istotne różnice w badanych parametrach między przedmurzem i jądrem śródgruszkowym grzbietowym. W przedmurzu gęstość neuronów zawierających kalbindynę oraz parwalbuminę była stosunkowo duża (ryc. 35) i była wyższa niż komórek CR-pozytywnych. W jądrze śródgruszkowym grzbietowym zarówno gęstość jak i procentowy udział komórek CB-pozytywnych był większy w stosunku do pozostałych dwóch białek.

#### **5.1.1.1 Neurony zawierające parwalbuminę**

Spośród badanych białek, odrębność obu struktur najbardziej podkreślała ekspresja parwalbuminy. Różnice te dotyczyły zarówno intensywności wyznakowania neuropilu jak i gęstości oraz udziału procentowego, jaki stanowiły neurony parwalbuminowe w przedmurzu i jądrze śródgruszkowym grzbietowym.

Moje obserwacje wykazały znaczącą heterogenność rozmieszczenia neuronów parwalbuminowych – występowały one głównie w przedmurzu, podczas gdy w jądrze śródgruszkowym grzbietowym stanowiły one znacznie mniej liczebną populację neuronów (ryc. 35). Dotychczasowe badania wskazywały na przewagę neuronów parwalbuminowych w przedmurzu szczura, podczas gdy w jądrze śródgruszkowym grzbietowym pojawiały się jedynie sporadycznie (3-5 na przekroju struktury) [54,56]. Badania przeprowadzone na innych gatunkach, wykazywały zróżnicowaną ilość neuronów zawierających parwalbuminę w jądrze śródgruszkowym. U myszy neurony parwalbuminowe występowały jedynie w części przedniej tego jądra [184] natomiast u stekowców nie wykazano obecności

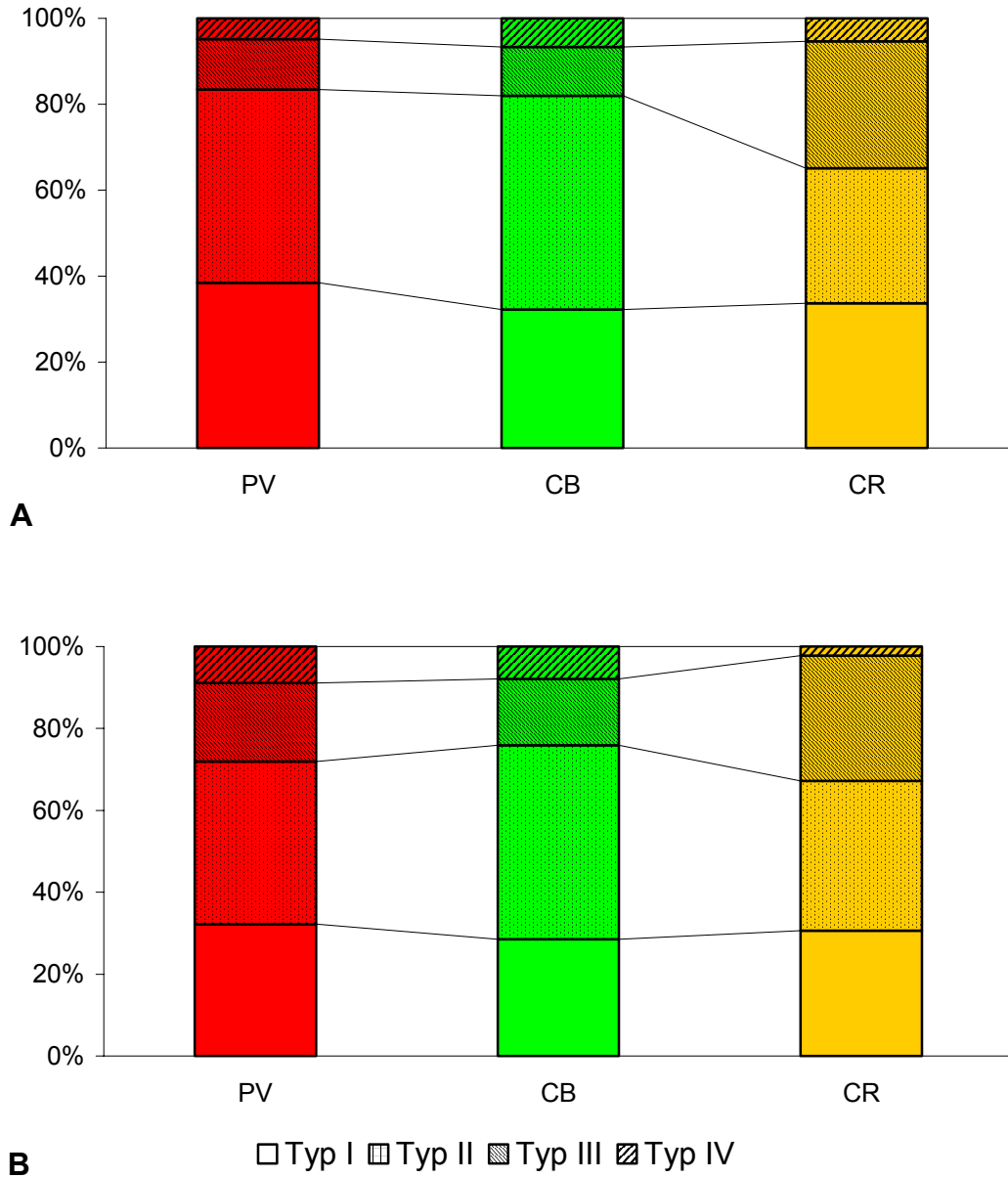
parwalbuminy w neuronach jądra śródgruszkowego [6]. Najnowsze badania przeprowadzone przez Wójcika i wsp. wykazały obecność neuronów parwalbuminowych w jądrze śródgruszkowym grzbietowym królika [237], podczas gdy u naczelnych neuronów te występowały w obu strukturach w zbliżonej gęstości i intensywności barwienia [187].

Neurony parwalbuminowe należały do wszystkich wyróżnionych typów morfologicznych z wyraźną przewagą typu I i II (ryc. 36). Występowanie podobnych typów neuronów wykazano również u królika [237], gdzie z kolei wyraźnie zaznaczała się przewaga neuronów typu II w przedmurzu. Moje obserwacje zaprzeczają wcześniejszym badaniom przeprowadzonym na szczurze [54] gdzie w populacji neuronów parwalbuminowych wykazano tylko neurony okrągłe i owalne.

W przeciwieństwie do jądra śródgruszkowego grzbietowego, przedmurze było niejednorodne pod względem rozmieszczenia typów morfologicznych neuronów parwalbuminowych od przodu ku tyłowi struktury. Zaobserwowałam wzrost odsetka neuronów typu I oraz zmniejszenie odsetka neuronów typu II ku tyłowi przedmurza. Dotychczas nie przeprowadzono podobnych badań, jednakże, uwzględniając, że jedną z cech charakterystycznych tych dwóch typów jest wielkość ciała neuronu można to odnieść do badań przeprowadzonych na przedmurzu psa, gdzie zaobserwowano podobną korelację w stosunku do całkowitej populacji neuronalnej przedmurza – w części przedniej przedmurza obserwowano bowiem neurony o większych profilach [135]. Interesujące wydaje się, że analiza rozkładów typów morfologicznych neuronów projekcyjnych przedmurza szczura wykazuje podobną tendencję – wzrost odsetka neuronów owalnych [195] oraz zmniejszenie wielkości ciała neuronu od przodu ku tyłowi [193].

### **5.1.1.2 Neurony zawierające kalbindynę D-28k**

W przeprowadzonych przeze mnie badaniach neurony kalbindynowe, najliczniejsze spośród badanych neuronów zawierających białka wiążące wapń, rozmieszczone są w przedmurzu i jądrze śródgruszkowym grzbietowym równomiernie. Nieco inny układ rozmieszczenia neuronów kalbindynowych



**Ryc. 36.** Udział poszczególnych typów morfologicznych neuronów zawierających białko wiążące wapń w przedmurzu (A) i jądrze śródgruszkowym grzbietowym (B) szczura.

występuje u myszy, bowiem w przedmurzu i jądrze śródgruszkowym grzbietowym obserwuje się zmianę gęstości tych komórek w kierunku od przodu ku tyłowi [184]. Dotychczasowe obserwacje ilościowe wskazywały na zdecydowanie większą (szczur [31,54]) czy też niewielką (stekowce [6]) przewagę ilości neuronów kalbindynowych w jądrze śródgruszkowym grzbietowym.

W piśmiennictwie opisywana jest również zmienność intensywności barwienia elementów kalbindyno-dodatnich. Podobnie do moich obserwacji Real i wsp. [184] u myszy obserwowali występowanie intensywnie i słabo barwiących się neuronów w przedmurzu.

Neurony kalbindynowe, podobnie jak parwalbuminowe charakteryzowały się wyraźną przewagą typów I i II, a różnice, jakie zaobserwowałam, wystąpiły między przedmurzem i jądrem śródgruszkowym grzbietowym i były związane z rozmieszczeniem typów morfologicznych neuronów. Pozostałe oceniane parametry w obu strukturach kształtowały się podobnie.

We wcześniejszych badaniach na szczurze Druga i wsp. [54] zaobserwowali wyraźną przewagę (90%) neuronów owalnych i okrągłych o dość szerokich zakresach wielkości (oś długa 12 – 18 $\mu$ m, oś krótka 9 – 13 $\mu$ m). Odnotowali oni również obecność neuronów wrzecionowatych i trójkątnych. Kowiański i wsp. [113] z kolei zauważyli przewagę neuronów dwu- i wielobiegunowych w obrębie jądra śródgruszkowego. Moje badania dokładniej charakteryzują tę główną populację neuronalną, wyróżniając małe owalne i duże wielobiegunowe neurony. Zbliżone obserwacje dotyczące typów morfologicznych poczynił Wójcik [236] dla przedmurza i jądra śródgruszkowego grzbietowego królika. Jednakże w przypadku królika prawie połowę neuronów kalbindynowych w obu strukturach stanowiły duże neurony wielobiegunowe typu II. Podobne spostrzeżenia poczyniono u niedojrzałej myszy, gdzie dodatkowo zasugerowano, że intensywnie barwiące się neurony przynależą do grupy wielobiegunowych, a słabo barwiące się raczej do neuronów typu I [38], czego nie wykazałam w moich badaniach. W przypadku stekowców główną część populacji neuronów kalbindynowych stanowiły małe, wielobiegunowe neurony o średnicy mniejszej niż 10  $\mu$ m. W obserwacjach Reinhout i Baizer [187] u małpy również najliczniejszą grupę stanowiły neurony małe, okrągłe bądź owalne z licznymi cienkimi wypustkami – odpowiadają one

wyróżnionym przeze mnie u szczura neuronom typu I. Ponadto autorzy ci obserwowali duże wielobiegunowe neurony, z kilkoma grubymi wypustkami odpowiadające komórkom typu II, a komórki dwubiegunowe stanowiące trzecią populację odpowiadałyby neuronom typu III u szczura.

Po zestawieniu danych z piśmiennictwa i dokonanych przeze mnie obserwacji zaznacza się podział na zwierzęta z przewagą dużych wielobiegunowych (szczur, królik) oraz na zwierzęta z przewagą małych okrągłych neuronów kalbindynowych (stekowce, małpa) [6,187,237].

### **5.1.1.3 Neurony zawierające kalretyninę**

Rozmieszczenie najmniej licznej populacji spośród badanych neuronów zawierających białka wiążące wapń, a mianowicie neuronów zawierających kalretyninę wykazywało charakterystyczny schemat rozmieszczenia w obrębie przedmurza. Neurony te preferencyjnie lokalizowały się w strefie brzeżnej badanej struktury. Podobną lokalizację tych komórek opisano u myszy [184] i królika [236]. Nie pokrywa się to jednak z lokalizacją stref projekcyjnych z przedmurza do kory nowej, natomiast jest zgodne z badaniami rozwojowymi [38].

W przypadku jądra śródgruszkowego grzbietowego zaobserwowałam podobne brzeżne rozmieszczenie neuronów kalretyninowych, jak w przedmurzu. Inaczej wygląda to u myszy, gdzie neurony kalretyninowe rozmieszczone są w jądrze śródgruszkowym grzbietowym równomiernie [184]. U królika ze względu na jedynie pojedyncze neurony kalretyninowe trudno jest mówić o ich rozkładzie w tym jądrze [237].

W odróżnieniu od neuronów parwalbuminowych i kalbindynowych w przypadku neuronów kalretyninowych wyraźnie zaznacza swój udział populacja neuronów typu III stanowiąca ok. 30% całkowitej liczby tych komórek u szczura (ryc. 36). Przy czym morfologia tych neuronów odbiegała od odpowiadającym im neuronów parwalbuminowych i kalbindynowych typu III– neurony kalretyninowe miały owalny, a nie wrzecionowaty kształt. Poprzednie badania wskazywały na znaczącą przewagę neuronów dwubiegunowych w jądrze śródgruszkowym grzbietowym szczura [113]



Podobną tendencję zaobserwowano u małpy gdzie neurony dwubiegunowe z wydłużonym perykarionem wręcz dominowały (wymiar osi długiej 20-25  $\mu\text{m}$ ), a neurony z większą liczbą wypustek obserwowano znacznie rzadziej [6]. U stekowców również zaobserwowano obecność dwóch typów neuronów kalretyninowych względem jednego wielobiegunowego, jednak szacunki ilościowe nie zostały odnotowane, można więc tylko w oparciu o zamieszczony średni współczynnik kulistości neuronów kalretyninowych, wynoszący 2,18 sądzić, że stanowiły liczącą się populację [6]. Warte odnotowania jest stwierdzenie, że były to neurony o większych średnicach niż sąsiadujące kalbindynowe, ich średnica przekraczała też średnią średnicę neuronów jądra śródgruszkowego grzbietowego [6]. W przypadku królika wyraźnie dominowały neurony zbliżone do moich typu II i IV stanowiąc 77% populacji [237], nie mniej neurony dwubiegunowe stanowiły 19% i wykazywały zbliżoną morfologię do zaobserwowanej przeze mnie u szczura.

U wszystkich badanych zwierząt obserwuje się przewagę neuronów stosunkowo dużych należących do wyróżnionych przeze mnie typów II, III i IV.

### **5.1.2 Zmiany ewolucyjne rozmieszczenia białek wiążących wapń w obrębie przedmurza i jądra śródgruszkowego grzbietowego**

Uzyskane przeze mnie dane potwierdzają dotychczasowe obserwacje o niewielkim udziale neuronów zawierających białka wiążące wapń w ogólnej liczbie neuronów przedmurza i jądra śródgruszkowego grzbietowego u gryzoni. Jednakże określony przeze mnie udział poszczególnych populacji w całkowitej puli neuronów różni się od danych uzyskanych w badaniach na myszy, w których obserwowano przewagę neuronów parwalbuminowych (7,9%) nad kalbindynowymi (5,4%) w przedmurzu, oraz wyraźnie mniejszą liczbę neuronów wykazujących ekspresję poszczególnych białek wiążących wapń w jądrze śródgruszkowym grzbietowym [184]. Zarówno w moich badaniach jak i u myszy w obu strukturach obserwowano niewielką liczbę neuronów kalretyninowych (ok. 2%).

Dane dotyczące zwierząt stojących niżej na drabinie ewolucyjnej – stekowców wykazują istotne różnice w stosunku do tych zaobserwowanych u gryzoni. Wyraźnie widoczna jest polaryzacja ekspresji poszczególnych białek

wiązących wapń. Parwalbumina występuje wyłącznie w przedmurzu podczas gdy kalretynina w jądrze śródgruszkowym grzbietowym. Kalbindyna natomiast w obu strukturach rozmieszczona jest w miarę równomiernie. Neurony parwalbuminowe stanowiły 3,8% populacji neuronów przedmurza stekowców, neurony kalbindynowe występują w 21,5% neuronów przedmurza i w 27% neuronów jądra śródgruszkowego, a kalretyninowe w 13,9% neuronów jądra śródgruszkowego. Większy udział neuronów CB- i CR- niż PV-pozytywnych u stekowców wynikać może z rozwoju ewolucyjnego tych białek [2] – parwalbumina jest bowiem najmłodszym białkiem tej rodziny co może powodować, iż u zwierząt filogenetycznie starszych jest jej wielokrotnie mniej.

W toku ewolucji obserwuje się przesunięcia ilościowe w obrębie poszczególnych klas białek wiążących wapń w neuronach, między jądrem śródgruszkowym grzbietowym i przedmurzem. Następuje zwiększenie się udziału neuronów parwalbuminowych u zwierząt filogenetycznie młodszych (mysz, szczur, królik, małpa [54,184,187,236]) oraz zmniejszenie się ekspresji kalretyniny w jądrze śródgruszkowym grzbietowym (królik [236]).

### **5.1.3 Neuropil**

Porównując PV-, CB-, i CR-immunoekspresję neuropilu w przedmurzu zaobserwowałam, że najintensywniej wyznakowany neuropil występował w przypadku parwalbuminy, a najslabiej – w przypadku kalbindyny. W jądrze śródgruszkowym grzbietowym ekspresja wszystkich badanych białek w neuropilu była stosunkowo niska, jednak tylko w przypadku kalretyniny neuropil części środkowej tej struktury praktycznie nie był wybarwiony.

Przeprowadzone przeze mnie badania PV-pozytywnego neuropilu w przedmurzu i jądrze śródgruszkowym grzbietowym potwierdzają dotychczasowe obserwacje innych autorów [6,54,184,237]. Cechą charakterystyczną tego neuropilu są tzw. koszyczki – immunoreaktywne zakończenia i włókna oplatające niewybarwione komórki. Obserwowałam je głównie w przedmurzu. Obserwowane one były również w przedmurzu innych zwierząt [184,236] jak również w jądrach ciała migdałowatego szczura [11,103,143]. Odpowiadać one mogą zakończeniom

aksonów charakterystycznych dla GABAergicznym komórkom koszykowym kory nowej [81]. Analiza przy użyciu mikroskopu elektronowego wykazała, że budujące je włókna i zakończenia tworzą hamujące synapsy na ciele neuronu i początkowych odcinkach wypustek [218].

Ekspresja kalbindyny w neuropilu charakteryzowała się porównywalnie słabym wyznakowaniem w obu badanych strukturach.

Neuropil CR-pozytywny wykazywał znaczne zróżnicowanie w obu strukturach. Intensywność i lokalizacja immunopozytywnego neuropilu pokrywała się z lokalizacją neuronów kalretyninowych. Wyjątkiem był barak znakowania neuropilu w części środkowej jądra śródgruszkowego grzbietowego. Podobne wyniki uzyskał u królika Wójcik [236] z tą różnicą, iż immunoreaktywność neuropilu była znacznie wyższa niż u szczura. U małpy [187] obie struktury wykazywały zbliżoną wysoką immunoreaktywność neuropilu, a wybarwione komórki były rozłożone równomiernie w obu strukturach.

W przypadku ekspresji kalbindyny i kalretyniny nie stwierdziłam występowania charakterystycznych dla parwalbuminy koszyków. Zaobserwowałam jedynie obecność zakończeń w postaci pojedynczych punktów.

W obrębie neuropilu charakterystycznymi immunopozytywnymi elementami były również wypustki komórek nerwowych i utworzone przez nie włókna nerwowe. Ekspresję wszystkich badanych białek obserwowałam nie tylko w gładkich włóknach, ale również tych posiadających żyłkowatości. Podobny obraz obserwowano u królika [237]. Obecność żyłkowatości na włóknach kalretyninowych w obrębie jądra śródgruszkowego szczura opisał Kowiański i wsp. [113]. Przy zastosowaniu metody pośmiertnego transportu lipofilnego znacznika DiI wykryto obecność żyłkowatości na przebiegu włókien występujących w przedmurzu i jądrze śródgruszkowym szczura i królika [128].

Żyłkowatości występujące na włóknach wykazujących ekspresję białek wiążących wapń opisywano również w innych miejscach m. in. w ciele migdałowatym [144,145] zespole hipokampa [97] oraz w korze przedczołowej człowieka w tym ostatnim przypadku były to zakończenia neuronów parwalbuminowych wzgórza [126].

W badaniach eksperymentalnych wykazano, że żylakowatości występujące na włóknach nerwowych odpowiedzialne są prawdopodobnie za tzw. przekąźnictwo objętościowe [23], w którym znaczącą rolę może odgrywać podtlenek azotu (NO).

Występować one mogą zarówno na aksonach włókien projekcyjnych [128] jak i neuronów wstawkowych [126,144].

#### **5.1.4 Badania współwystępowania białek wiążących wapń**

W żadnej z badanych struktur, pomimo podobieństw subpopulacji neuronów zawierających białka wiążące wapń wynikających z przynależności do tych samych typów morfologicznych, nie zaobserwowałam współwystępowania parwalbuminy z kalretyniną oraz kalbindyny D-28k z kalretyniną w obrębie jednego neuronu.

Jednakże w obu strukturach na ciałach komórek zawierających białka wiążące wapń występowały immunopozytywne zakończenia. Może to świadczyć o tym, że komórki zawierające CaBPs mogą poprzez obecność tych zakończeń regulować funkcję innych komórek zawierających CaBPs.

W piśmiennictwie sporadycznie można znaleźć dane dotyczące współwystępowania białek wiążących wapń w neuronach przedmurza i jądra śródgruszkowego. U myszy Real i wsp. [184] zaobserwowali, że ok. 13% neuronów parwalbuminowych wykazuje również obecność kalbindyny D-28k, a z kolei ok. 18% neuronów kalbindynowych wykazuje również ekspresję parwalbuminy. Stanowiło to ok. 1% całkowitej liczby neuronów przedmurza.

Podobne obserwacje poczyniono dla kory wzrokowej szczura, okolicy posiadającej dobrze udokumentowane połączenia z przedmurzem [72] oraz kory czołowej [102]. Natomiast nie stwierdzono współwystępowania kalretyniny z parwalbuminą lub kalbindyną D-28k oraz stosunkowo niewielkie, współwystępowanie kalbindyny D-28k z parwalbuminą (5,3 – 12,1%) [72]. Odmienne wyniki uzyskano w korze gruszkowej szczura łączącej się z jądrem śródgruszkowym grzbietowym, w której występuje zróżnicowanie współwystępowania parwalbuminy w neuronach kalbindynowych (do 60%) w zależności od warstwy tej kory [120].

Obecność dwóch białek wiążących wapń w jednej komórce obserwowano również w zespole podstawno-bocznym szczura, gdzie 60% neuronów kalbindynowych zawierało również parwalbuminę [143,145] podczas gdy neuronów parwalbuminowych zawierających kalbindynę D-28k było od 26% [31] do 80% [143,145]. Nie opisano w jądrze podstawno-bocznym ciała migdałowatego współwystępowania kalretyniny z innymi białkami wiążącymi wapń [103,143].

Uwzględniając powyższe dane wydaje się, że zaobserwowany przeze mnie brak współwystępowania kalretyniny z pozostałymi białkami wiążącymi wapń świadczy o pewnej odmienności neuronów kalretyninowych od pozostałych wykazujących ekspresję parwalbuminy czy też kalbindyny D-28k w tych strukturach.

U organizmów o wyższym stopniu zorganizowania mózgowia współwystępowanie białek wiążących wapń wykazywało nieco odmienne cechy. Badania przeprowadzone na materiale ludzkim wykazały w korze wzrokowej niewielkiego stopnia współwystępowanie w neuronach kalretyninowych – kalbindyny D-28k (ok. 7%), w neuronach parwalbuminowych – kalretyniny (2,50 – 3,28%), natomiast jedynie sporadycznie obserwowano współwystępowanie parwalbuminy i kalbindyny D-28k w jednym neuronie [123]. W korze skroniowej u człowieka obserwowano natomiast zrównoważony (10%) stopień współwystępowania białek wiążących wapń w obrębie jednego neuronu – dotyczyło to ekspresji parwalbuminy z kalbindyną D-28k oraz kalretyniny z kalbindyną D-28k [42,43].

## **5.2 Neurony GABAergiczne**

Zarówno w przedmurzu jak i w jądrze śródgruszkowym grzbietowym zaobserwowałam stosunkowo równomiernie rozmieszczone neurony GABAergiczne. Wcześniejsze badania innych autorów wykazały podobny schemat rozmieszczenia tych neuronów w obu badanych przeze mnie strukturach, przy czym miały one tendencję do grupowania się w skupiska utworzone przez 2-3 komórki nerwowe [171]. Moje badania potwierdziły obecność takich skupisk komórkowych

wyłącznie w przedmurzu (ryc. 21B, 23B,E), podczas gdy w jądrze śródgruszkowym grzbietowym były one równomiernie rozmieszczone w całej strukturze (ryc. 21D, 24B).

Stosując metodę pośrednią (uwzględniającą stopnie wzajemnego współwystępowania GABA, PV, CR, CB) oszacowałam liczbę neuronów GABAergicznym w obu strukturach na 7 do 12%. W badaniach innych autorów obliczono ilość neuronów GABAergicznym w przedmurzu i jądrze śródgruszkowym grzbietowym myszy na 13% całkowitej liczby neuronów [71] podczas gdy u królika jest ich około 7% [111]. U człowieka w oparciu o metodę Golgi'ego określono ilość neuronów wstawkowych na 7% [17]. Natomiast u szczura nie określono liczbowo ich udziału, określając jedynie, że stanowią one najmniej liczną populację [138].

Taki niewielki udział neuronów wstawkowych wydaje się być zgodny z obserwacjami Arimatsu i wsp. [5] którzy zaobserwowali w przedmurzu przede wszystkim neurony wykazujące ekspresję lateksyny większość, których stanowią neurony glutaminergiczne [4]. Wydaje się, że udział neuronów wstawkowych maleje w miarę rozwoju ewolucyjnego, zwłaszcza, że u stekowców, sądząc po ilości neuronów zawierających białka wiążące wapń, można domniemywać o stosunkowo dużym udziale tych neuronów w populacji neuronalnej przedmurza i jądra śródgruszkowego.

Zastosowana przeze mnie klasyfikacja neuronów GABAergicznym uwzględniająca tylko kształt ciała neuronu wynikała z charakterystyki barwienia immunohistochemicznego tego neurotransmitera – wyznakowaniu podlegały głównie perykarion i początkowe odcinki wypustek. Z wyróżnionych przeze mnie trzech typów neuronów: (1) owalnych, (2) okrągłych i (3) wielobocznych, największą grupę stanowiły neurony owalne (ponad 50% populacji neuronów GABAergicznym). Odpowiada to obserwacjom dokonanych przez Narkiewicza i wsp. [170,171], wskazujących na przewagę w tej grupie neuronów małych. U myszy zaobserwowano natomiast znaczący udział neuronów wrzecionowatych [71]. Wyróżnione typy wydają się odpowiadać opisanym przez Mamos [138] neuronom bezkolcowym.

GABAergiczny neuropil obu struktur składał się z sieci włókien, które razem z zakończeniami tworzyły „koszyczki” na ciałach niewyznakowanych neuronów oraz na perykarionach innych neuronów GABAergicznych [174]. Potwierdzają to wcześniejsze obserwacje innych autorów [71,171] przeprowadzone z zastosowaniem barwień immunohistochemicznych, jak również badania przy użyciu mikroskopu elektronowego. Te ostatnie badania wskazują na to, iż są to symetryczne zakończenia aksonosomatyczne, które u kota stanowią ok. 10% synaps [101]. Obserwacje te świadczą o hamującym wpływie neuronów GABAergicznych zarówno na neurony projekcyjne, jak i na pozostałe neurony GABAergiczne, co sugerować może ich wzajemną kontrolę.

### **5.3 Badania współwystępowania CaBPs i GABA**

W moich badaniach zaobserwowałam zróżnicowany udział współwystępowania białek wiążących wapń z neuroprzeźkaźnikiem GABA w obrębie neuronów przedmurza i jądra śródgruszkowego. Zależał on od rodzaju białka, struktury, a w przypadku neuronów kalbindynowych również od części struktury.

Najliczniejsze współwystępowanie z GABA wykazywały neurony zawierające parwalbuminę (w obu badanych strukturach ponad 80%), następnie komórki zawierające kalbindynę D-28k (ok. 60 %), a najmniejszą – neurony zawierające kalretyninę (55 i 35% odpowiednio w przedmurzu i jądrze śródgruszkowym grzbietowym). W przypadku trzech badanych subpopulacji procent współwystępowania z GABA był wyższy w przedmurzu, niż w jądrze śródgruszkowym grzbietowym. Sumując poszczególne wartości dla przedmurza ilości neuronów zawierających białka wiążące wapń zaobserwowałam, że przekracza ona ilość neuronów GABAergicznych. Być może odpowiada to stwierdzonemu w przedmurzu myszy współwystępowaniu parwalbuminy, kalbindyny D-28k z GABA [184] – ok. 19% neuronów. Natomiast w jądrze śródgruszkowym grzbietowym wydaje się, że istnieje populacja neuronów GABAergicznych nie wykazująca dodatkowo ekspresji żadnego białka wiążącego

wapń, być może wykazują one ekspresję VIP-u, somatostatyny – obecność których w neuronach jądra śródgruszkowego opisał Kowiański i wsp. [113].

Brak dotychczas bezpośrednich danych świadczących o stopniu współwystępowania CaBPs z GABA w badanej przeze mnie okolicy, jednakże badania przeprowadzone w ciele migdałowatym szczura wykazują podobne zależności. Kempainen i Pitkanen [103] wykazali, że w ciele migdałowatym współwystępowanie z GABA wykazuje 94% neuronów parwalbuminowych, 75% kalbindynowych, a tylko 24% kalretyninowych. Zaobserwowali też istnienie zróżnicowania między jądrem bocznym, a podstawnym ciała migdałowatego. O ile dużego stopnia współwystępowanie neuronów parwalbuminowych z GABA nie wykazywało różnic, to już w przypadku neuronów kalbindynowych w jądrze bocznym obserwowano GABA w 55% przypadków, a w jądrze podstawnym 84-87%; podobnie w przypadku neuronów kalretyninowych obecność GABA charakteryzowała 46% neuronów, podczas gdy w jądrze podstawnym zaledwie 14%. W zespole korowo-przyśrodkowym obserwowano współwystępowanie 86% CB z GABA i 75% CR z GABA [145]. Biorąc pod uwagę wspólne pochodzenie przedmurza, jądra śródgruszkowego i ciała migdałowatego [146] a zwłaszcza przedmurza i jądra podstawno-bocznego z płaszczą bocznego oraz jądra śródgruszkowego i jądra bocznego ciała migdałowatego z płaszczą brzuszno należy przypuszczać, iż obserwowane przeze mnie różnice w rozkładzie oraz współwystępowaniu białek wiążących wapń z GABA przemawiają za innym niż korowe pochodzeniem neuronów wstawkowych w tych strukturach.

W korze mózgu obserwuje się wysoki stopień współwystępowania GABA w neuronach parwalbuminowych sięgający od 93 do 100% [30,44,72,80,106,226]. Podobnie, choć nie tak wysokiego stopnia współwystępowanie obserwuje się między neuronami kalbindynowymi i GABA w neuronach hipokampa szczura (85%) [224], kalbindynowymi i GAD w korze wzrokowej kota (90%) [45], oraz 100% w korze gruszkowej [120]. Natomiast dane dotyczące neuronów kalretyninowych różnią się znacznie określając udział GABA lub GAD od 40% w korze śródwęchowej szczura [148] do 90 % w hipokampie szczura [149] czy też korze wzrokowej u małpy [147].



Wcześniejsze badania wykazały istnienie w ciele migdałowatym i korze mózgu dwóch kalbindynowych populacji neuronalnych: neuronów piramidalnych, lub piramidopodobnych – pełniących funkcje projekcyjne oraz neuronów wstawkowych [31,142].

W badaniach na transgenicznym myszach wykazano, iż znajdujące się w korze mózgu neurony kalbindynowe pochodzą rozwojowo z dwóch różnych źródeł. Neurony wykazujące silną ekspresją kalbindyny D-28k uważane przez część autorów za GABAergiczne mają pochodzenie podpłaszczowe, natomiast mniej liczne neurony wykazujące słabą ekspresję kalbindyny pochodzą z płaszcza korowego [222]. W wykonanych badaniach zaobserwowałam również podobny podział neuronów kalbindynowych zlokalizowanych w przedmurzu i jądrze śródgruszkowym grzbietowym, jednak trudno jest w tym przypadku udowodnić ich różne pochodzenie.

W przypadku neuronów kalretyninowych zaobserwowałam istnienie dysproporcji między współwystępowaniem z GABA w obrębie ciała komórki i jej wypustek. Badania kory wzrokowej szczura wykazały, że stopień współwystępowania GABA w kalretyninowych wypustkach i zakończeniach wynosił 100%, natomiast w 92% ciał neuronów kalretyninowych zaobserwowano obecność tego neurotransmitera [73]. Być może wynika to z większej szybkości transportu GABA od ciała komórki do jej zakończeń w tej klasie neuronów.

W moich badaniach niemal wszystkie neurony zawierające białka wiążące wapń, w obu strukturach, podlegają bezpośredniej kontroli komórek GABAergicznymi, o czym świadczą obserwowane na ich powierzchni GABA-pozytywne zakończenia.

PV-ir zakończenia i włókna obecne były na większości komórek GABAergicznymi. Natomiast zakończenia wykazujące ekspresję kalbindyny i kalretyniny na ciałach GABAergicznymi neuronów obserwowałam sporadycznie. Należy jednak zaznaczyć, iż powyższy schemat różnił się w obu badanych strukturach. Zaobserwowałam bowiem obecność większej ilości neuronów GABAergicznymi z zakończeniami PV-ir w przedmurzu (82% neuronów GABAergicznymi posiadało zakończenia PV-ir na ciele) niż w jądrze śródgruszkowym grzbietowym (jedynie 33%).

Zakończenia PV-ir były zlokalizowane przede wszystkim na ciele neuronu ale i na początkowych odcinkach wypustek neuronów GABAergicznych. Świadczyć to może o bezpośrednim hamującym wpływie subpopulacji neuronów parwalbuminowych na neurony wstawkowe przedmurza i w mniejszym stopniu jądra śródgruszkowego grzbietowego. W ciele migdałowatym zaobserwowano, że na neuronach parwalbuminowych występują zakończenia o charakterze pobudzającym, pochodzące głównie od sąsiadujących neuronów [214]. Być może główną funkcją neuronów parwalbuminowych podobnie jak w hipokampie [66] jest hamowanie zwrotne i regulacja aktywności rytmicznej.

Oprócz neuronów wykazujących współwystępowanie znaczników w przedmurzu i w jądrze śródgruszkowym grzbietowym znaleziono również włókna, w których współwystępowały GABA i PV. Elementy GABA-pozytywne wspólnie z PV-pozytywnymi tworzyły omówione już wcześniej „koszyczki” obecne w przedmurzu i jądrze śródgruszkowym grzbietowym.

#### **5.4 Neurony projekcyjne, a białka wiążące wapń w przedmurzu**

Po podaniach do kory ruchowej zaobserwowałam wyznakowane neurony zlokalizowane w części przedniej przedmurza. Strefę projekcyjną budowały dużej wielkości neurony owalne i piramidopodobne. Jest to zgodne z wcześniejszymi obserwacjami opisującymi w przedmurzu strefę ruchową [194].

Neurony zawierające białka wiążące wapń oraz neurony wysyłające projekcję do kory ruchowej stanowiły całkowicie rozdzielne populacje neuronalne. Wyznakowane wstecznie neurony projekcyjne przedmurza nie zawierały żadnego z badanych białek wiążących wapń. Neurony projekcyjne do kory ruchowej były znacznie bardziej liczne i charakteryzowały się odmienną morfologią od leżących między nimi, pojedynczych neuronów zawierających CaBPs.

Komórki zawierające parwalbuminę jako jedyne posiadały zakończenia na neuronach wyznakowanych wstecznie, co może świadczyć o ich ważnej funkcji regulującej czynność neuronów projekcyjnych.

Wcześniejsze badania opisywały istnienie podobnego układu zależności między neuronami projekcyjnymi, a neuronami parwalbuminowymi czy też kalbindynowymi w przedmurzu szczura [54].

Brak występowania zakończeń kalbindynowych i kalretyninowych na neuronach projekcyjnych można tłumaczyć tym, że oddziałują one na neurony innych stref projekcyjnych obecnych w przedmurzu lub na inne neurony wstawkowe.

Porównując przedmurze z innymi strukturami podkorowymi pojawia się możliwość istnienia również neuronów projekcyjnych zawierających białka wiążące wapń. Moryś i wsp. [156] badając zależności między neuronami projekcyjnymi zespołu podstawno-bocznego ciała migdałowatego, a ekspresją białek wiążących wapń wykazali istnienie wysokiego stopnia współwystępowania kalbindyny D-28k w obrębie neuronów rzutujących do kory czołowej szczura. Równocześnie obserwowane przez nich relacje między neuronami wstecznie wyznakowanymi a strukturami zawierającymi parwalbuminę kształtowały się podobnie jak w przedmurzu szczura.

### **5.5 Neurony zawierające CaBPs oraz neurony GABAergiczne, a funkcja przedmurza i jądra śródgruszkowego grzbietowego**

Jak wynika z piśmiennictwa z ostatniego okresu struktury położone do boku od torebki zewnętrznej odgrywają istotną rolę w generowaniu i rozprzestrzenianiu się napadów padaczkowych [152,153,204,227]. Niewątpliwie ważnym układem zapobiegającym właśnie takim procesom jest prawidłowo wykształcony system hamowania zapewniany przez neurony wstawkowe. Potwierdzają to obserwacje, w których wykazano, że zmniejszenie ilości neuronów GABAergicznych lub zahamowanie ich działania może prowadzić do wystąpienia napadów padaczkowych lub chorobowych stanów lękowych ze względu na brak efektu hamującego w obrębie mózgowia [39,182].

Morfologia badanych przez mnie neuronów zawierających białka wiążące wapń jak i badania na współwystępowanie wskazują, że w większości są to są neurony wstawkowe – zwłaszcza obecność parwalbuminy pozwala stosunkowo

jednoznacznie określić tę część populacji neuronów wstawkowych. Jednakże występują również neurony o cechach morfologicznych charakterystycznych dla neuronów projekcyjnych. Wyróżniają się tutaj neurony kalretyninowe wykazujące najmniejszy stopień współwystępowania z GABA.

Morfologia elementów neuropilu wyznakowanych w badanych strukturach wskazuje na ich związek z układem lokalnej sieci neuronalnej. Zakończenia PV-ir, głównie typu aksonosomatycznego znajdowały się zarówno na neuronach projekcyjnych przedmurza do kory ruchowej, neuronach kalretyninowych jak i neuronach GABAergicznych w przedmurzu i w jądrze śródgruszkowym grzbietowym, przy czym zauważalna była większa liczba tych zakończeń w obrębie przedmurza. Świadczyć to może o tym, że neurony zawierające parwalbuminę – najmlodsze filogenetycznie białko spośród badanych – odgrywają znaczącą rolę w integracji przepływu informacji zwłaszcza do i z obszarów kory nowej, będącej głównym obszarem docelowym przedmurza [112,194,211].

Między przedmurzem i jądrem śródgruszkowym grzbietowym istnieją pewne różnice zarówno w obrazie jakościowym jak i ilościowym w obrębie poszczególnych subpopulacji neuronów zawierających poszczególne białka wiążące wapń. Różnice te uwidoczniają się również we wzajemnych relacjach między populacjami komórek GABAergicznych, a komórkami zawierającymi PV, CB i CR. Potwierdzać to może hipotezę o odrębności rozwojowej tych dwóch struktur, postawioną na podstawie dotychczasowych obserwacji histologicznych [130], immunohistologicznych [54,184], czy też różnic w połączeniach neuronów tych struktur [168,194].

Brak różnic w rozmieszczeniu parwalbuminy i kalbindyny w przedmurzu szczura, w świetle występowania specyficznych stref projekcyjnych w obrębie tej struktury [112,194,211] wskazywałby, iż różnorodne bodźce docierające do przedmurza podlegają tym samym mechanizmom kontroli.

Wiele wskazuje na to, że struktury o licznych i różnorodnych połączeniach są niewątpliwie ośrodkami integracyjnymi [25]. Integracja informacji czuciowych (wzrokowych, słuchowych, dotykowych) w obrębie ośrodkowego układu nerwowego prawdopodobnie zachodzi w strukturach heteromodalnych [25]. Należą do nich okolice kory przedczołowej, ciemieniowo-przedpotylicznej, bruzdy

skroniowej górnej [24,25], tylnej części wyspy, kory węchowej, a także przedmurze, wzgórki górne blaszki pokrywy, niektóre jądra wzgórza, ciało migdałowe i hipokamp [24]. Mechanizm procesu integracji informacji, niektórzy z autorów [25] tłumaczą obecnością neuronów multimodalnych – czyli posiadających bezpośrednie połączenia z różnymi obszarami kory.

W przedmurzu, którego zaangażowanie w procesy integracji po raz pierwszy podkreślili Ettliger i Wilson [58], nie obserwowano takich neuronów, bądź były one zaledwie pojedyncze [112,137,193]. Trudno więc wytłumaczyć na tej podstawie, bardzo wysoką aktywność przedmurza w badaniach przy użyciu technik elektrofizjologicznych, czy też nowszych takich jak PET czy fMRI [8,24,76,185]. Sugeruje to istnienie innego mechanizmu, umożliwiającego również proces integracji informacji czuciowych. Taką rolę mogą spełniać neurony wstawkowe. Mogą one być zaangażowane w procesy kontroli integracji informacji. Dlatego też wysoka ekspresja znaczników tych neuronów – białek wiążących wapń (zwłaszcza parwalbuminy) [2,61,74,86,103] obserwowana we wspomnianych już strukturach heteromodalnych wydaje się być w nich nieprzypadkowa.

Pomimo wielu doniesień opisujących czynność i morfologię przedmurza i jądra śródgruszkowego grzbietowego, wciąż niepoznany w pełni pozostaje mechanizm wpływu tych struktur na funkcję ośrodkowego układu nerwowego, a ostatnie doniesienia wskazują na znaczącą rolę tej okolicy w procesach integracyjnych.

## 6 GŁÓWNE WYNIKI I WNIOSKI

1. Przedmurze i jądro śródgruszkowe grzbietowe charakteryzowały się niewielką procentowo populacją, niejednorodnie rozmieszczonych neuronów zawierających białka wiążące wapń. Największe różnice w ekspresji wykazywała parwalbumina. W obu badanych strukturach nie wykazano współwystępowania badanych białek w tej samej komórce nerwowej. Zaobserwowano jednak liczne wzajemne zakończenia na ciałach wyznakowanych komórek.
2. Zarówno w przedmurzu jak i w jądrze śródgruszkowym grzbietowym obserwowano, równomiernie rozmieszczone, przeważnie owalnego kształtu, neurony GABAergiczne.
3. Procent neuronów, w których białka wiążące wapń współwystępują z neuroprzekaźnikiem GABA był stosunkowo wysoki i zależny od rodzaju białka. Najczęściej neuroprzekaźnik GABA występował w neuronach PV-pozytywnych a najrzadziej w CR-pozytywnych. Większość komórek zawierających białka wiążące wapń posiadała na swoim ciele zakończenia GABAergiczne. Natomiast na ciałach komórek GABAergicznych obecne były liczne zakończenia PV-ir.
4. Neurony przedmurza wysyłające projekcję do kory ruchowej oraz neurony zawierające białka wiążące wapń stanowiły oddzielne populacje. Na większości ciał komórek projekcyjnych występowały wyłącznie liczne zakończenia PV-ir.
5. Zaobserwowane różnice w ekspresji poszczególnych białek wiążących wapń w przedmurzu i jądrze śródgruszkowym grzbietowym potwierdzają istniejący podział tej okolicy oparty o badania histochemiczne oraz wydają się odzwierciedlać najnowsze poglądy o pochodzeniu tych struktur.
6. Przeprowadzone badania wykazały, iż neurony zawierające białka wiążące wapń jak i GABA należą do tej samej klasy neuronów wstawkowych w przedmurzu i jądrze śródgruszkowym grzbietowym.
7. Najważniejszą rolę koordynującą aktywność przedmurza wydają się spełniać neurony parwalbuminowe zwłaszcza poprzez wpływ na neurony GABAergiczne jak i neurony projekcyjne.
8. Uwzględniając wysoki odsetek współwystępowania z GABA, neurony parwalbuminowe mogą stanowić dogodny znacznik neuronów wstawkowych przedmurza i jądra śródgruszkowego w badaniach nad tymi strukturami.

## 7 STRESZCZENIE

Wykorzystując immunohistochemiczne metody oznaczania białek wiążących wapń (parwalbuminy, kalbindyny, kalretyniny), neurotransmitera GABA jak również wsteczny transport aksonalny FluoroGoldu wykazano u szczura różnice w ekspresji neuronów zawierających badane substancje jak i we wzajemnych relacjach między badanymi populacjami neuronów w przedmurzu i jądrze śródgruszkowym grzbietowym.

Badania przeprowadzono na 18 szczurach rasy Wistar. Po wybarwieniu, preparaty mózgowi oceniono przy użyciu mikroskopii konfokalnej oraz dokonano pomiarów morfometrycznych.

Obecność neuronów zawierających białka wiążące wapń wykazano zarówno w przedmurzu jak i w jądrze śródgruszkowym grzbietowym. Największe różnice w rozmieszczeniu między strukturami wykazywały neurony parwalbuminowe występujące głównie w przedmurzu. Neurony zawierające poszczególne białka stanowiły niezależne populacje pomimo tego, że wyróżniono w każdej z nich podobne typy morfologiczne. Zarówno w przedmurzu jak i w jądrze śródgruszkowym grzbietowym występowały, stosunkowo równomiernie rozmieszczone, neurony GABAergiczne. W obrębie neuronów parwalbuminowych neuroprzekaznik GABA występował najczęściej, a w obrębie neuronów kalretyninowych, najrzadziej. Badane struktury różniły się istotnie procentowym udziałem komórek wykazujących współwystępowanie CR z GABA. W przedmurzu wykazano ponadto, że neurony projekcyjne do kory ruchowej oraz neurony zawierające białka wiążące wapń stanowią rozdzielne populacje.

Badane struktury charakteryzowały się stosunkowo niewielkim udziałem neuronów zawierających białka wiążące wapń. Uzyskane wyniki pozwalają na stwierdzenie, że wyznakowane w obu strukturach neurony zawierające białka wiążące wapń należą do lokalnej sieci neuronów wstawkowych co potwierdzają ich cechy morfologiczne, obecność w neuronach zawierających CaBPs neuroprzekaznika GABA, a także w przedmurzu brak współwystępowania z neuronami projekcyjnymi do kory ruchowej. Spośród badanych białek wiążących wapń, elementy parwalbumino-ir posiadają najbogatszą sieć zakończeń zarówno na neuronach projekcyjnych jak i GABAergicznym, a także CR-pozytywnym przez co wydają się odgrywać znaczącą rolę w integracji przepływu informacji do i z obszarów kory nowej, będącej obszarem docelowym przedmurza.



## 8 PIŚMIENICTWO

1. Airaksinen, M.S., Thoenen, H., Meyer, M., Vulnerability of midbrain dopaminergic neurons in calbindin-D28k-deficient mice: lack of evidence for a neuroprotective role of endogenous calbindin in MPTP-treated and weaver mice, *Eur. J. Neurosci.*, 9 (1997) 120-127.
2. Andressen, C., Blümcke, I., Celio, M.R., Calcium-binding protein: selective markers of nerve cells, *Cell Tiss Res*, 271 (1993) 181-208.
3. Arai, H., Emson, P.C., Mountjoy, C.Q., Carassco, L.H., Heizmann, C.W., Loss of parvalbumin-immunoreactive neurones from cortex in Alzheimer-type dementia, *Brain Res.*, 418 (1987) 164-169.
4. Arimatsu, Y., Ishida, M., Takiguchi-Hayashi, K., Uratani, Y., Cerebral cortical specification by early potential restriction of progenitor cells and later phenotype control of postmitotic neurons, *Development*, 126 (1999) 629-638.
5. Arimatsu, Y., Miyamoto, M., Nihonmatsu, I., Hirata, K., Uratani, Y., Hatanaka, Y., Takiguchi-Hayashi, K., Early regional specification for a molecular neuronal phenotype in the rat neocortex, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 89 (1992) 8879-8883.
6. Ashwell, K.W., Hardman, C., Paxinos, G., The claustrum is not missing from all monotreme brains, *Brain Behav. Evol.*, 64 (2004) 223-241.
7. Azzaroni, A., Infantellina, F., Rapisarda, C., Riva Sanseverino, E., Potentials in the claustrum evoked by single or repetitive stimulation of the specific and non-specific thalamic nuclei in the cat, *Rev Neurol (Paris)*, 115 (1966) 154-155.
8. Banati, R.B., Goeres, G.W., Tjoa, C., Aggleton, J.P., Grasby, P., The functional anatomy of visual-tactile integration in man: a study using positron emission tomography, *Neuropsychologia*, 38 (2000) 115-124.
9. Beckingham, K., Lu, A.Q., Andruss, B.F., Calcium-binding proteins and development, *Biomaterials*, 11 (1998) 359-373.
10. Ben Ari, Y., Khalilov, I., Represa, A., Gozlan, H., Interneurons set the tune of developing networks. [Review] [50 refs], *Trends Neurosci.*, 27 (2004) 422-427.
11. Berdel, B., Moryś, J., Expression of calbindin-D28k and parvalbumin during development of rat's basolateral amygdaloid complex, *Int. J. Dev. Neurosci.*, 18 (2000) 501-513.
12. Berdel, B., Moryś, J., Maciejewska, B., and Narkiewicz, O. Rozwoj neuronow zespolu podstawno-bocznego ciala migdalowatego szczura. II Konferencja Embriologiczna, Sobotka may 25-27, 1994 1, 3. 1994.
13. Berggard, T., Miron, S., Onnerfjord, P., Thulin, E., Akerfeldt, K.S., Enghild, J.J., Akke, M., Linse, S., Calbindin D28k exhibits properties characteristic of a Ca<sup>2+</sup> sensor, *J. Biol. Chem.*, 277 (2002) 16662-16672.

14. Białowąs, J., Chadzypanagiotis, D., Structure of the claustrum in rabbits, *Folia Morphol (Warsz)*, 31 (1972) 73-81.
15. Bouillere, V., Schwaller, B., Schurmans, S., Celio, M.R., Fritschy, J.M., Neurodegenerative and morphogenic changes in a mouse model of temporal lobe epilepsy do not depend on the expression of the calcium-binding proteins parvalbumin, calbindin, or calretinin, *Neuroscience*, 97 (2000) 47-58.
16. Braak, H., Braak, E., A simple procedure for electron microscopy of Golgi-impregnated nerve cells, *Neurosci Lett*, 32 (1982) 1-4.
17. Braak, H., Braak, E., Neuronal types in the claustrum of man, *Anat Embryol (Berl)*, 163 (1982) 447-460.
18. Braak, H., Braak, E., Neuropathological staging of Alzheimer-related changes, *Acta Neuropathol*, 82 (1991) 239-259.
19. Brand, S., A serial section Golgi analysis of the primate claustrum, *Anat Embryol (Berl)*, 162 (1981) 475-488.
20. Brewer, J.M., Wunderlich, J.K., Ragland, W.L., The amino acid sequence of avian thymic hormone, a parvalbumin, *Biochimie*, 72 (1990) 653-660.
21. Brion, J.P., Resibois, A., A subset of calretinin-positive neurons are abnormal in Alzheimer's disease, *Acta Neuropathol. (Berl)*, 88 (1994) 33-43.
22. Brockhaus, H., Die Cyto- und Myeloarchitectonik des Cortex claustralis und des Claustrum beim Menschen, *J Psychol Neurol*, 49 (1940) 249-348.
23. Brzyska, M., Czarkowska-Bauh, J., Elbaum, D., Gierdalski, M., Grabowska, A., Gorska, T., Jegliński, W., Kaczmarek, L., Kowalska, D.M., Majczynski, H., Niewiadomska, G., Skangiel-Kramaska, J., Skup, M., Szelag, E., Turlejski, K., Werka, T., Wrobel, A., Zagrodzka, J., Zielinski, K., and Zernicki, B., *Mózg a zachowanie*, Vol. 1, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2000, 513 pp.
24. Calvert, G.A., Crossmodal processing in the human brain: insights from functional neuroimaging studies, *Cereb. Cortex*, 11 (2001) 1110-1123.
25. Calvert, G.A., Brammer, M.J., Iversen, S.D., Crossmodal identification, *Trends in Cognitive Sciences*, 2 (1998) 247-253.
26. Calvert, G.A., Thesen, T., Multisensory integration: methodological approaches and emerging principles in the human brain, *J. Physiol Paris*, 98 (2004) 191-205.
27. Cao, Q.L., Yan, X.X., Luo, X.G., Garey, L.J., Prenatal development of parvalbumin immunoreactivity in the human striate cortex, *Cereb Cortex*, 6 (1996) 620-630.
28. Carey, R.G., Bear, M.F., Diamond, I.T., The laminar organization of the reciprocal projections between the claustrum and striate cortex in the tree shrew, *Tupaia glis*, *Brain Res*, 184 (1980) 193-198.
29. Cates, M.S., Teodoro, M.L., Phillips, G.N., Jr., Molecular mechanisms of calcium and magnesium binding to parvalbumin, *Biophys. J.*, 82 (2002) 1133-1146.

30. Celio, M.R., Parvalbumin in most gamma-aminobutyric acid-containing neurons of the rat cerebral cortex, *Science*, 231 (1986) 995-997.
31. Celio, M.R., Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system, *Neuroscience*, 35 (1990) 375-475.
32. Chadzypanagiotis, D., Narkiewicz, O., Connections of the visual cortex with the claustrum, *Acta Neurobiol Exp*, 31 (1971) 291-311.
33. Chan-Palay, V., Zetzsche, T., Hochli, M., Parvalbumin neurons in the hippocampus in senile dementia of the Alzheimer type, Parkinson's disease and multi-infarct dementia, *Dementia*, 2 (1991) 297-313.
34. Cicchetti, F., Prensa, L., Wu, Y., Parent, A., Chemical anatomy of striatal interneurons in normal individuals and in patients with Huntington's disease, *Brain Res Rev*, 34 (2000) 80-101.
35. Clasca, F., Avendano, C., Roman-Guindo, A., Llamas, A., Reinoso-Suárez, F., Innervation from the claustrum of the frontal association and motor areas - axonal transport studies in the cat, *J Comp Neurol*, 326 (1992) 402-422.
36. Condé, F., Lund, J.S., Lewis, D.A., The hierarchical development of monkey visual cortical regions as revealed by the maturation of parvalbumin-immunoreactive neurons, *Dev Brain Res*, 96 (1996) 261-276.
37. Crescimanno, G., Salerno, M.T., Cortimiglia, R., Amato, G., Claustral influence on ipsi- and contralateral motor cortical areas, in the cat, *Brain Res Bull*, 22 (1989) 839-843.
38. Davila, J.C., Real, M.A., Olmos, L., Legaz, I., Medina, L., Guirado, S., Embryonic and postnatal development of GABA, calbindin, calretinin, and parvalbumin in the mouse claustral complex, *J. Comp Neurol.*, 481 (2005) 42-57.
39. Davis, M., The role of the amygdala in fear and anxiety, *Annu Rev Neurosci*, 15 (1992) 353-375.
40. DeFelipe, J., Types of neurons, synaptic connections and chemical characteristics of cells immunoreactive for calbindin-D28K, parvalbumin and calretinin in the neocortex, *J Chem Neuroanat*, 14 (1997) 1-19.
41. DeFelipe, J., González-Albo, M.C., Del Río, M.R., Elston, G.N., Distribution and patterns of connectivity of interneurons containing calbindin, calretinin, and parvalbumin in visual areas of the occipital and temporal lobes of the macaque monkey, *J Comp Neurol*, 412 (1999) 515-526.
42. Del Río, M.R., DeFelipe, J., Colocalization of parvalbumin and calbindin D-28k in neurons including chandelier cells of the human temporal neocortex, *J Chem Neuroanat*, 12 (1997) 165-173.
43. Del Río, M.R., DeFelipe, J., Double bouquet cell axons in the human temporal neocortex: relationship to bundles of myelinated axons and colocalization of calretinin and calbindin D-28k immunoreactivities, *J Chem Neuroanat*, 13 (1997) 243-251.

44. Demeulemeester,H., Arckens,L., Vandesande,F., Orban,G.A., Heizmann,C.W., Pochet,R., Calcium binding proteins and neuropeptides as molecular markers of GABAergic interneurons in the cat visual cortex, *Exp Brain Res*, 84 (1991) 538-544.
45. Demeulemeester,H., Vandesande,F., Orban,G.A., Brandon,C., Vanderhaeghen,J.J., Heterogeneity of GABAergic cells in cat visual cortex, *J. Neurosci.*, 8 (1988) 988-1000.
46. Dinopoulos,A., Papadopoulos,G.C., Michaloudi,H., Parnavelas,J.G., Uylings,H.B.M., Karamanlidis,A.N., Claustrum in the Hedgehog (*Erinaceus europaeus*) brain: Cytoarchitecture and connections with cortical and subcortical structures, *J Comp Neurol*, 316 (1992) 187-205.
47. Diop,A.G., Dussartre,C., Barthe,D., Hugon,J., Neuroprotective properties of calretinin against the HIV-1 gp120 toxicity, *Neurosci Res Commun*, 18 (1996) 107-114.
48. Donato,R., Perspectives in S-100 protein biology. Review article, *Cell Calcium*, 12 (1991) 713-726.
49. Druga,R., The claustrum of the cat (*Felis domestica*), *Folia Morphol (Praha)*, 14 (1966) 7-16.
50. Druga,R., Projection of prepyriform cortex into claustrum, *Folia Morphol (Praha)*, 19 (1971) 405-410.
51. Druga,R., Efferent projections from the claustrum (an experimental study using Nauta's method), *Folia Morphol (Praha)*, 20 (1972) 163-165.
52. Druga,R., Reciprocal connections between the claustrum and the gyrus sigmoideus posterior in the cat. An experimental study using the antegrade degeneration methods and the HRP retrograde axonal transport, *Anat Anz*, 156 (1984) 109-118.
53. Druga,R., Projections from the claustrum to the occipital cortex in the guinea pig, *Folia Morphol (Praha)*, 37 (1989) 57-63.
54. Druga,R., Chen,S., Bentivoglio,M., Parvalbumin and calbindin in the rat claustrum: an immunocytochemical study combined with retrograde tracing from frontoparietal cortex, *J Chem Neuroanat*, 6 (1993) 399-406.
55. Eiden,L.E., Mezey,E., Eskay,R.L., Beinfeld,M.C., Palkovits,M., Neuropeptide content and connectivity of the rat claustrum, *Brain Res*, 523 (1990) 245-250.
56. Ekstrand,J.J., Domroese,M.E., Johnson,D.M.G., Feig,S.L., Knodel,S.M., Behan,M., Haberly,L.B., A new subdivision of anterior piriform cortex and associated deep nucleus with novel features of interest for olfaction and epilepsy, *J Comp Neurol*, 434 (2001) 289-307.
57. Enderlin,S., Norman,A.W., Celio,M.R., Ontogeny of the calcium binding protein calbindin D-28k in the rat nervous system, *Anat. Embryol. (Berl)*, 177 (1987) 15-28.

58. Ettliger,G., Wilson,W.A., Cross-modal performance: behavioural processes, phylogenetic considerations and neural mechanisms, *Behav Brain Res*, 40 (1990) 169-192.
59. Ferrer,I., Kulisevsky,J., Gonzalez,G., Escartin,A., Chivite,A., Casas,R., Parvalbumin-immunoreactive neurons in the cerebral cortex and striatum in Huntington's disease, *Neurodegeneration*, 3 (1994) 169-173.
60. Ferrer,I., Soriano,E., Tunon,T., Fonseca,M., Guionnet,N., Parvalbumin immunoreactive neurons in normal human temporal neocortex and in patients with Alzheimer's disease, *J Neurol Sci*, 106 (1991) 135-141.
61. Ferry,B., Roozendaal,B., McGaugh,J.L., Involvement of  $\alpha_1$ -adrenoceptors in the basolateral amygdala in modulation of memory storage, *Eur J Pharmacol*, 372 (1999) 9-16.
62. Figueredo-Cardenas,G., Harris,C.L., Anderson,K.D., Reiner,A., Relative resistance of striatal neurons containing calbindin or parvalbumin to quinolinic acid-mediated excitotoxicity compared to other striatal neuron types, *Exp Neurol*, 149 (1998) 356-372.
63. Fiszman,M.L., Schousboe,A., Role of calcium and kinases on the neurotrophic effect induced by gamma-aminobutyric acid. [Review] [101 refs], *J. Neurosci. Res.*, 76 (2004) 435-441.
64. Fonseca,M., Soriano,E., Calretinin-immunoreactive neurons in the normal human temporal cortex and in Alzheimer's disease, *Brain Res*, 691 (1995) 83-91.
65. Frassoni,C., Arcelli,P., Selvaggio,M., Spreafico,R., Calretinin immunoreactivity in the developing thalamus of the rat: A marker of early generated thalamic cells, *Neuroscience*, 83 (1998) 1203-1214.
66. Freund,T.F., Buzsáki,G., Interneurons of the hippocampus, *Hippocampus*, 6 (1996) 347-470.
67. Fukuda,T., Adachi,E., Kawashima,S., Yoshiya,I., Hashimoto,P.H., Immunohistochemical distribution of calcium-activated neutral proteinases and endogenous CANP inhibitor in the rabbit hippocampus, *J. Comp Neurol.*, 302 (1990) 100-109.
68. Gary,D.S., Sooy,K., Chan,S.L., Christakos,S., Mattson,M.P., Concentration- and cell type-specific effects of calbindin D28k on vulnerability of hippocampal neurons to seizure-induced injury, *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 75 (2000) 89-95.
69. Geula,C., Nagykerly,N., Wu,C.K., Bu,J., Loss of calbindin-D<sub>28K</sub> from aging human cholinergic basal forebrain: Relation to plaques and tangles, *J Neuropathol Exp Neurol*, 62 (2003) 605-616.
70. Gomez,T.M., Snow,D.M., Letournau,P.C., Characterization of spontaneous calcium transients in nerve growth cones and their effect on growth cone migration, *Neuron*, 14 (1995) 1233-1246.

71. Gómez-Urquijo,S.M., Gutiérrez-Ibarluzea,I., Bueno-López,J.L., Reblet,C., Percentage incidence of gamma-aminobutyric acid neurons in the claustrum of the rabbit and comparison with the cortex and putamen, *Neurosci Lett*, 282 (2000) 177-180.
72. Gonchar,Y., Burkhalter,A., Three distinct families of GABAergic neurons in rat visual cortex, *Cereb Cortex*, 7 (1997) 347-358.
73. Gonchar,Y., Burkhalter,A., Connectivity of GABAergic calretinin-immunoreactive neurons in rat primary visual cortex, *Cereb. Cortex*, 9 (1999) 683-696.
74. Gonzalez-Soriano,J., Gonzalez-Flores,M.L., Contreras-Rodriguez,J., Rodriguez-Veiga,E., Martinez-Sainz,P., Calbindin D28k and parvalbumin immunoreactivity in the rabbit superior colliculus: An anatomical study, *Anat Rec*, 259 (2000) 334-346.
75. Graybiel,A.M., Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia, *Trends Neurosci*, 13 (1990) 244-254.
76. Hadjikhani,N., Roland,P.E., Cross-modal transfer of information between the tactile and the visual representations in the human brain: A positron emission tomographic study, *J Neurosci*, 18 (1998) 1072-1084.
77. Hartley,D.M., Neve,R.L., Bryan,J., Ullrey,D.B., Bak,S.Y., Lang,P., Geller,A.I., Expression of the calcium-binding protein, parvalbumin, in cultured cortical neurons using a HSV-1 vector system enhances NMDA neurotoxicity, *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 40 (1996) 285-296.
78. Heizmann,C.W., Parvalbumin, an intracellular calcium-binding protein; distribution, properties and possible roles in mammalian cells, *Experientia*, 40 (1984) 910-921.
79. Hendrickson,A.E., van Brederode,J.F., Mulligan,K.A., Celio,M.R., Development of the calcium-binding protein parvalbumin and calbindin in monkey striate cortex, *J. Comp Neurol.*, 307 (1991) 626-646.
80. Hendry,S.H.C., Jones,E.G., GABA neuronal subpopulations in cat primary auditory cortex: Co-localization with calcium binding proteins immunoreactivity, *Brain Res*, 543 (1991) 45-55.
81. Hendry,S.H.C., Jones,E.G., Emson,P.C., Lawson,D.E.M., Two classes of cortical GABA neurons defined by differential calcium binding proteins immunoreactivity, *Exp Brain Res*, 76 (1989) 467-472.
82. Hinova-Palova,D.V., Paloff,A., Christova,T., Ovtsharoff,W., Topographical distribution of NADPH-diaphorase-positive neurons in the cat's claustrum, *Eur J Morphol*, 35 (1997) 105-116.
83. Hinova-Palova,D.V., Paloff,A.M., Identification of degenerated synaptic boutons in the claustrum of cat after lesion of the parietal cortex, *Contemp Probl Neuromorphol (Sofia)*, 13-14 (1984) 154-160.
84. Hinova-Palova,D.V., Paloff,A.M., Usunoff,K.G., Dimova,R.N., Yossifov,T.Y., Ivanov,D.P., Reciprocal connections between the claustrum and the auditory

- cortical fields in the cat. An experimental study using light- and electron microscopic anterograde degeneration methods, and the horseradish peroxidase retrograde axonal transport, *J Hirnforsch*, 29 (1988) 255-278.
85. Hof, P.R., Cox, K., Young, W.G., Celio, M.R., Rogers, J., Morrison, J.H., Parvalbumin-immunoreactive neurons in the neocortex are resistant to degeneration in Alzheimer's disease, *J Neuropathol Exp Neurol*, 50 (1991) 451-462.
  86. Hof, P.R., Glezer, I.I., Condé, F., Flagg, R.A., Rubin, M.B., Nimchinsky, E.A., Weisenhorn, D.M.V., Cellular distribution of the calcium binding proteins parvalbumin, calbindin, and calretinin in the neocortex of mammals: phylogenetic and developmental patterns, *J Chem Neuroanat*, 16 (1999) 77-116.
  87. Hof, P.R., Morrison, J.H., Neocortical neuronal subpopulations labeled by a monoclonal antibody to calbindin exhibit differential vulnerability in Alzheimer's disease, *Exp Neurol*, 111 (1991) 293-301.
  88. Hof, P.R., Nimchinsky, E.A., Celio, M.R., Bouras, C., Morrison, J.H., Calretinin-immunoreactive neocortical interneurons are unaffected in Alzheimer's disease, *Neurosci. Lett.*, 152 (1993) 145-148.
  89. Hubbard, M.J., McHugh, N.J., Calbindin28kDa and calbindin30kDa (calretinin) are substantially localised in the particulate fraction of rat brain, *FEBS Lett.*, 374 (1995) 333-337.
  90. Hunziker, W., Schrickel, S., Rat brain calbindin D28: six domain structure and extensive amino acid homology with chicken calbindin D28, *Mol. Endocrinol.*, 2 (1988) 465-473.
  91. Hynd, M.R., Scott, H.L., Dodd, P.R., Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease, *Neurochem. Int.*, 45 (2004) 583-595.
  92. Iacopino, A., Christakos, S., German, D., Sonsalla, P.K., Altar, C.A., Calbindin-D28K-containing neurons in animal models of neurodegeneration: possible protection from excitotoxicity, *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 13 (1992) 251-261.
  93. Iacopino, A.M., Quintero, E.M., Miller, E.K., Calbindin-D28K a potential neuroprotective protein, *Neurodegeneration*, 3 (1994) 1-20.
  94. Ichimiya, Y., Emson, P.C., Mountjoy, C.Q., Lawson, D.E., Heizmann, C.W., Loss of calbindin-28K immunoreactive neurones from the cortex in Alzheimer-type dementia, *Brain Res.*, 475 (1988) 156-159.
  95. Irle, E., Markowitsch, H.J., Streicher, M., Cortical and subcortical, including sensory-related, afferents to the thalamic mediodorsal nucleus of the cat, *J Hirnforsch*, 25 (1984) 29-51.
  96. Isaacs, K.R., Wolpoe, M.E., Jacobowitz, D.M., Vulnerability to calcium-induced neurotoxicity in cultured neurons expressing calretinin, *Exp. Neurol.*, 163 (2000) 311-323.



97. Ishizuka,N., Weber,J., Amaral,D.G., Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat, *J Comp Neurol*, 295 (1990) 580-623.
98. Jacobowitz,D.M., Winsky,L., Immunocytochemical localization of calretinin in the forebrain of the rat, *J Comp Neurol*, 304 (1991) 198-218.
99. Juraniec,J., Narkiewicz,O., Wrzolkowa,T., Changes in axon terminals of the claustrum following cortical lesions--electron microscopic investigations, *Neuropat Pol*, 12 (1974) 1-11.
100. Juraniec,J., Wrzolkowa,T., Narkiewicz,O., Synaptic organization of some nuclei in the amygdaloid complex, *Ann Med Pol Acad Sci*, 19 (1974) 115-116.
101. Juraniec,J., Wrzolkowa,T., Narkiewicz,O., Types of synapses in the claustrum of the cat, *Acta Neurobiol Exp*, 34 (1974) 233-252.
102. Kawaguchi,Y., Kubota,Y., GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex, *Cereb Cortex*, 7 (1997) 476-486.
103. Kemppainen,S., Pitkänen,A., Distribution of parvalbumin, calretinin, and calbindin-D<sub>28k</sub> immunoreactivity in the rat amygdaloid complex and colocalization with gamma-aminobutyric acid, *J Comp Neurol*, 426 (2000) 441-467.
104. King,A.D., Walshe,J.M., Kendall,B.E., Chinn,R.J., Paley,M.N., Wilkinson,I.D., Halligan,S., Hall-Craggs,M.A., Cranial MR imaging in Wilson's disease, *Am J Roentgenol*, 167 (1996) 1579-1584.
105. Kiyama,H., Seto-Ohshima,A., Emson,P.C., Calbindin D28K as a marker for the degeneration of the striatonigral pathway in Huntington's disease, *Brain Res.*, 525 (1990) 209-214.
106. Kosaka,T., Katsumaru,H., Hama,K., Wy,J.-Y., Heizmann,C.W., GABAergic neurons containing the Ca<sup>2+</sup>-binding protein parvalbumin in the rat hippocampus and dentate gyrus, *Brain Res*, 419 (1987) 119-130.
107. Kotti,T., Tapiola,T., Riekkinen,P.J., Sr., Miettinen,R., The calretinin-containing mossy cells survive excitotoxic insult in the gerbil dentate gyrus. Comparison of excitotoxicity-induced neuropathological changes in the gerbil and rat, *Eur. J. Neurosci.*, 8 (1996) 2371-2378.
108. Kowiańska,J., Anatomia porównawcza przedmurza wybranych gatunków ssaków, Akademia Medyczna w Gdansk, Gdańsk, 1997, 107 pp.
109. Kowiański,P., Polaczenia przedmurza z kora somatosensoryczna i ruchowa u krolika - badania metodami wstecznego transportu aksonalnego, Akademia Medyczna w Gdansk, Gdansk, 1996, 143 pp.
110. Kowiański,P., Dziwiątkowski,J., Kowiańska,J., Moryś,J., Comparative anatomy of the claustrum in selected species: A morphometric analysis, *Brain Behav Evol*, 53 (1999) 44-54.

111. Kowiański,P., Moryś,J., Dziewiątkowski,J., Karwacki,Z., Bobek-Billewicz,B., Narkiewicz,O., Neurons of the claustrum projecting to the motor and somatosensory cortex in the rabbit - assessment with the method of retrograde transport of fluorescent tracers, *Folia Morphol (Warsz)*, 55 (1996) 350-352.
112. Kowiański,P., Moryś,J., Karwacki,Z., Dziewiątkowski,J., Narkiewicz,O., The cortico-related zones of the rabbit claustrum - study of the claustrrocortical connections based on the retrograde axonal transport of fluorescent tracers, *Brain Res*, 784 (1998) 199-209.
113. Kowiański,P., Moryś,J.M., Wójcik,S., Dziewiątkowski,J., Łuczyńska,A., Spodnik,E., Timmermans,J.-P., Moryś,J., Neuropeptide-containing neurons in the endopiriform region of the rat: morphology and colocalization with calcium-binding proteins and nitric oxide synthase, *Brain Res*, 996 (2004) 97-110.
114. Kowiański,P., Timmermans,J.-P., Moryś,J., Differentiation in the immunocytochemical features of intrinsic and cortically projecting neurons in the rat claustrum - combined immunocytochemical and axonal transport study, *Brain Res*, 905 (2001) 63-71.
115. Kretsinger,R.H., Nockolds,C.E., Carp muscle calcium-binding protein. II. Structure determination and general description, *J. Biol. Chem.*, 248 (1973) 3313-3326.
116. Krettek,J., Price,J.L., Projections from the amygdaloid complex to the cerebral cortex and thalamus in the rat and cat, *J Comp Neurol*, 172 (1977) 682-722.
117. Krettek,J.E., Price,J.L., Projections from the amygdaloid complex and adjacent olfactory structures to the entorhinal cortex and to the subiculum in the rat and cat, *J Comp Neurol*, 172 (1977) 723-752.
118. Krzywkowski,P., Jacobowitz,D.M., Lamour,Y., Calretinin-containing pathways in the rat forebrain, *Brain Res*, 705 (1995) 273-294.
119. Kubasik-Juraniec,J., Narkiewicz,O., Moryś,J., Relationship of corticoclaustral axon terminals to neurons of the claustrum in the cat, *Folia Morphol (Warsz)*, 53 (1994) 69-76.
120. Kubota,Y., Jones,E.G., Colocalization of two CaBps in GABA cells of rat piriform cortex, *Brain Res*, 600 (1993) 339-344.
121. Kuster,T., Staudenmann,W., Hughes,G.J., Heizmann,C.W., Parvalbumin isoforms in chicken muscle and thymus. Amino acid sequence analysis of muscle parvalbumin by tandem mass spectrometry, *Biochemistry*, 30 (1991) 8812-8816.
122. Leuba,G., Kraftsik,R., Saini,K., Quantitative distribution of parvalbumin, calretinin, and calbindin D-28k immunoreactive neurons in the visual cortex of normal and Alzheimer cases, *Exp Neurol*, 152 (1998) 278-291.
123. Leuba,G., Saini,K., Colocalization of parvalbumin, calretinin and calbindin D-28k in human cortical and subcortical visual structures, *J Chem Neuroanat*, 13 (1997) 41-52.

124. LeVay,S. and Sherk,H. Visual area of the cat claustrum 2: Structure, receptive fields and outputs. *Soc Neurosci* 6, 482. 1980.
125. LeVay,S., Sherk,H., The visual claustrum of the cat. I. Structure and connections, *J Neurosci*, 1 (1981) 956-980.
126. Lewis,D.A., Cruz,D.A., Melchitzky,D.S., Pierri,J.N., Lamina-specific deficits in parvalbumin-immunoreactive varicosities in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia: Evidence for fewer projections from the thalamus, *Am J Psychiatry*, 158 (2001) 1411-1422.
127. Li,Z.K., Takada,M., Hattori,T., Topographic organization and collateralization of claustrorocortical projections in the rat, *Brain Res Bull*, 17 (1986) 529-532.
128. Lipowska,M., Kowiański,P., Karwacki,Z., and Moryś,J. Connections between insular claustrum and endopiriform nucleus in the rat and rabbit. *Folia Morphol (Warsz)* 58[Suppl 1], 152. 1999.
129. Lipton,S.A., Rosenberg,P.A., Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders, *N. Engl. J. Med.*, 330 (1994) 613-622.
130. Loo,Y.T., The forebrain of the opossum, *Didelphis virginiana*. Part II. Histology, *J Comp Neurol*, 52 (1931) 1-148.
131. Loscher,W., Ebert,U., The role of the piriform cortex in kindling, *Prog. Neurobiol.*, 50 (1996) 427-481.
132. Lukas,W., Jones,K.A., Cortical neurons containing calretinin are selectively resistant to calcium overload and excitotoxicity in vitro, *Neuroscience*, 61 (1994) 307-316.
133. Macchi,G., Bentivoglio,M., Minciacchi,D., Molinari,M., Claustroneocortical projections studied in the cat by means of multiple retrograde fluorescent tracing, *J Comp Neurol*, 215 (1983) 121-134.
134. Maciejewska,B., Rozwoj i dojrzewanie neuronow przedmurza szczura w swietle badan morfometrycznych, *Akademia Medyczna w Gdansk*, 1994, 139 pp.
135. Maciejewska,B., Moryś,J., Berdel,B., Narkiewicz,O., Insular claustrum of the dog - a morphometric investigations of cellular structure, *Folia Morphol (Warsz)*, 53 (1994) 209-219.
136. Majak,K., Kowiański,P., Dziewiątkowski,J., Karwacki,Z., Łuczyńska,A., Moryś,J., Claustrorocingulate connections in the rabbit and rat - the stereological study, *Folia Morphol*, 59 (2000) 47-56.
137. Majak,K., Kowiański,P., Moryś,J., Spodnik,J., Karwacki,Z., Wisniewski,H.M., The limbic zone of the rabbit and rat claustrum: A study of the claustrorocingulate connections based on the retrograde axonal transport of fluorescent tracers, *Anat Embryol (Berl)*, 201 (2000) 15-25.
138. Mamos,L., Morphology of claustral neurons in the rat, *Folia Morphol (Warsz)*, 43 (1984) 73-78.

139. Mamos,L., Przedmurze i jego stosunek do głębokich warstw nowej kory u owadożernych., Akademia Medyczna w Gdańsku, Gdańsk, 1988.
140. Mamos,L., Narkiewicz,O., Moryś,J., Neurons of the claustrum in the cat; a Golgi study, *Acta Neurobiol Exp*, 46 (1986) 171-178.
141. McDonald,A.J., Neurons of the lateral and basolateral amygdaloid nuclei: A Golgi study in the rat, *J Comp Neurol*, 212 (1982) 293-312.
142. McDonald,A.J., Calbindin-D28k immunoreactivity in the rat amygdala, *J Comp Neurol*, 383 (1997) 231-244.
143. McDonald,A.J., Betette,R.L., Parvalbumin-containing neurons in the rat basolateral amygdala: Morphology and co-localization of calbindin-D<sub>28k</sub>, *Neuroscience*, 102 (2001) 413-425.
144. McDonald,A.J., Culberson,J.L., Neurons of the basolateral amygdala: A Golgi study in the opossum (*Didelphis virginiana*), *Am J Anat*, 162 (1981) 327-342.
145. McDonald,A.J., Mascagni,F., Colocalization of calcium-binding proteins and GABA in neurons of the rat basolateral amygdala, *Neuroscience*, 105 (2001) 681-693.
146. Medina,L., Legaz,I., Gonzalez,G., De Castro,F., Rubenstein,J.L., Puellas,L., Expression of Dbx1, Neurogenin 2, Semaphorin 5A, Cadherin 8, and Emx1 distinguish ventral and lateral pallial histogenetic divisions in the developing mouse claustramygdaloid complex, *J. Comp Neurol.*, 474 (2004) 504-523.
147. Meskenaite,V., Calretinin-immunoreactive local circuit neurons in area 17 of the cynomolgus monkey, *Macaca fascicularis*, *J Comp Neurol*, 379 (1997) 113-132.
148. Miettinen,M., Pitkänen,A., Miettinen,R., Distribution of calretinin-immunoreactivity in the rat entorhinal cortex: Coexistence with GABA, *J Comp Neurol*, 378 (1997) 363-378.
149. Miettinen,R., Gulyás,A.I., Baimbridge,K.G., Jacobowitz,D.M., Freund,T.F., Calretinin is present in non-pyramidal cells of the rat hippocampus. II. Coexistence with other calcium binding proteins and GABA, *Neuroscience*, 48 (1992) 29-43.
150. Millhouse,O.E., DeOlmos,J., Neuronal configurations in lateral and basolateral amygdala, *Neuroscience*, 10 (1983) 1269-1300.
151. Miodonski,R., The claustrum in the dog brain, *Acta. Anat.*, 91 (1975) 409-422.
152. Mohapel,P., Hannesson,D.K., Armitage,L.L., Gillespie,G.W., Corcoran,M.E., Claustral lesions delay amygdaloid kindling in the rat, *Epilepsia*, 41 (2000) 1095-1101.
153. Mohapel,P., Zhang,X., Gillespie,G.W., Chlan-Fourney,J., Hannesson,D.K., Corley,S.M., Li,X.M., Corcoran,M.E., Kindling of claustrum and insular cortex: comparison to perirhinal cortex in the rat, *Eur J Neurosci*, 13 (2001) 1501-1519.

154. Morin,F., Beaulieu,C., Lacaille,J.C., Selective loss of GABA neurons in area CA1 of the rat hippocampus after intraventricular kainate, *Epilepsy Res.*, 32 (1998) 363-369.
155. Moryś,J., Organizacja połączeń przedmurzowo-korowych w świetle niektórych uszkodzeń kory mózgu u człowieka, *Akademia Medyczna w Gdańsku*, 1991, 166 pp.
156. Moryś,J., Berdel,B., Kowiański,P., Majak,K., Tarnawski,M., Wisniewski,H.M., Relationship of calcium-binding proteins containing neurons and projective neurons in the rat basolateral amygdala, *Neurosci Lett*, 259 (1999) 91-94.
157. Moryś,J., Berdel,B., Maciejewska,B., Krol,J., Dziewiątkowski,J., Loss of neurons in the claustrum of aging brain, *Folia Neuropathol*, 34 (1996) 98-102.
158. Moryś,J., Berdel,B., Maciejewska,B., Sadowski,M., Sidorowicz,M., Kowianska,J., Narkiewicz,O., Division of the human claustrum according to its architectonics, morphometric parameters and cortical connections, *Folia Morphol (Warsz)*, 55 (1996) 69-82.
159. Moryś,J., Bobiński,M., Kozłowski,P.B., Dziewiątkowski,J., Switka,A., Wisniewski,H.M., Narkiewicz,O., The pathology of the claustrum in Galloway syndrome indicates the existence of claustro-entorhinal pathway, *Folia Morphol (Warsz)*, 52 (1993) 1-9.
160. Moryś,J., Bobiński,M., Wegiel,J., Wisniewski,H.M., Narkiewicz,O., Alzheimer's disease severely affects areas of the claustrum connected with the entorhinal cortex, *J Brain Res*, 37 (1996) 131-137.
161. Moryś,J., Narkiewicz,O., Wisniewski,H.M., Neuronal loss in the human claustrum following ulegyria, *Brain Res*, 616 (1993) 176-180.
162. Moryś,J., Słoniewski,P., Projections of the claustrum to some areas of the neocortex in the rat-an HRP study, *Folia Morphol (Warsz)*, 45 (1986) 175-181.
163. Moryś,J., Słoniewski,P., Karwacki,Z., Imielinski,B.L., Use of somatosensory evoked potentials for prognostic evaluation of patients with intracerebral hematoma, *Neurol Neurochir Pol*, 22 (1988) 233-239.
164. Moryś,J., Słoniewski,P., Narkiewicz,O., Somatosensory evoked potentials following lesions of the claustrum, *Acta Physiol Pol*, 39 (1988) 475-483.
165. Mugnaini,E. and Oertel,W.H., An atlas of the distribution of GABAergic neurons and terminals in the rat. In: Björklund,A., Hökfelt,T. (Eds.), *Handbook of Chemical Neuroanatomy*, Vol. 4, Elsevier, Amsterdam, 1985, pp. 436-608.
166. Narkiewicz,O., Degenerations in the claustrum after regional neocortical ablations in the cat, *J Comp Neurol*, 123 (1964) 335-356.
167. Narkiewicz,O., Connections of the claustrum with the cerebral cortex, *Folia Morphol (Warsz)*, 25 (1966) 517-523.

168. Narkiewicz,O., Mamos,L., The prepiriform claustrum and its connections, *Verh Anat Ges*, 81 (1987) 897-898.
169. Narkiewicz,O., Mamos,L., Relation of the insular claustrum to the neocortex in Insectivora, *J Hirnforsch*, 31 (1990) 623-633.
170. Narkiewicz,O., Nitecka,L., Mamos,L., Neurons with GABA-like immunoreactivity in the claustrum and adjacent cortex of the rat, *Verh Anat Ges*, 82 (1989) 209-210.
171. Narkiewicz,O., Nitecka,L., Mamos,L., Moryś,J., The pattern of the GABA-like immunoreactivity in the claustrum, *Folia Morphol (Warsz)*, 47 (1988) 21-30.
172. Nauta,W.J.H. and Whitlock,D.G., An anatomical analysis of the non-specific thalamic projection system. In: Delafraşnaye,J.F. (Ed.), *Brain mechanisms and consciousness*, Oxford University Press, Oxford, 1954, pp. 81-116.
173. Nelson,M.R., Chazin,W.J., Structures of EF-hand Ca(2+)-binding proteins: diversity in the organization, packing and response to Ca<sup>2+</sup> binding, *Biomaterials*, 11 (1998) 297-318.
174. Nitecka,L., Ben-Ari,Y., Distribution of GABA-like immunoreactivity in the rat amygdaloid complex, *J Comp Neurol*, 266 (1987) 45-55.
175. Norita,M., Hirata,Y., Some electron microscope findings of the claustrum of the cat, *Arch Histol Jpn*, 39 (1976) 33-49.
176. Olsen,R.B. and Flindt-Egebak,P. An autoradiographic study of the subcortical connections of the anterior claustrum and overlying cortex in the guinea-pig. *Neurosci Lett Suppl* 7, 409. 1981.
177. Olson,C.R., Graybiel,A.M., Sensory maps in the claustrum of the cat, *Nature*, 288 (1980) 479-481.
178. Ottersen,O.P., Storm-Mathisen,J., Glutamate- and GABA-containing neurons in the mouse and rat brain as demonstrated with a new immunocytochemical technique, *J Comp Neurol*, 229 (1984) 374-392.
179. Pauls,T.L., Cox,J.A., Berchtold,M.W., The Ca<sup>2+</sup>(-)-binding proteins parvalbumin and oncomodulin and their genes: new structural and functional findings, *Biochim. Biophys. Acta*, 1306 (1996) 39-54.
180. Paxinos,G. and Watson,C., *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Second Edition, Academic Press Inc., San Diego, CA, 1986, 262 pp.
181. Paxinos,G. and Watson,C., *The rat brain in stereotaxic coordinates*, Academic Press, San Diego, 1997, 78 pp.
182. Pitkänen,A., Amaral,D.G., The distribution of GABAergic cells, fibers, and terminals in the monkey amygdaloid complex: An immunohistochemical and in situ hybridization study, *J Neurosci*, 14 (1994) 2200-2224.
183. Prayer,L., Wimberger,D., Kramer,J., Grimm,G., Oder,W., Imhof,H., Cranial MRI in Wilson's disease, *Neuroradiology*, 32 (1990) 211-214.

184. Real, M.A., Dávila, J.C., Guirado, S., Expression of calcium-binding proteins in the mouse claustrum, *J. Chem. Neuroanat.*, 25 (2003) 151-160.
185. Redoute, J., Stoleru, S., Gregoire, M.-C., Costes, N., Cinotti, L., Lavenne, F., Le Bars, D., Forest, M.G., Pujol, J.F., Brain processing of visual sexual stimuli in human males, *Hum Brain Mapping*, 11 (2000) 162-177.
186. Reiner, A., Medina, L., Figueredo-Cardenas, G., Anfinson, S., Brainstem motoneuron pools that are selectively resistant in amyotrophic lateral sclerosis are preferentially enriched in parvalbumin: evidence from monkey brainstem for a calcium-mediated mechanism in sporadic ALS, *Exp. Neurol.*, 131 (1995) 239-250.
187. Reynhout, K., Baizer, J.S., Immunoreactivity for calcium-binding proteins in the claustrum of the monkey, *Anat Embryol*, 199 (1999) 75-83.
188. Roberts, G.W., Woodhams, P.L., Polak, J.M., Crow, T.J., Distribution of neuropeptides in the limbic system of the rat: The amygdaloid complex, *Neuroscience*, 7 (1982) 99-131.
189. Roberts, W.A., Eaton, S.A., Salt, T.E., Widely distributed GABA-mediated afferent inhibition processes within the ventrobasal thalamus of rat and their possible relevance to pathological pain states and somatotopic plasticity, *Exp. Brain Res.*, 89 (1992) 363-372.
190. Rogers, J.H., Immunohistochemical markers in rat brain: colocalization of calretinin and calbindin-D28k with tyrosine hydroxylase, *Brain Res*, 587 (1992) 203-210.
191. Rogers, J.H., Immunohistochemical markers in rat cortex: co-localization of calretinin and calbindin-D28k with neuropeptides and GABA, *Brain Res.*, 587 (1992) 147-157.
192. Rowniak, M., Sztejn, S., Robak, A., Klawon, M., The types of neurons in the claustrum of bison bonasus: Nissl and Golgi study, *Folia Morphol (Warsz)*, 53 (1994) 231-237.
193. Sadowski, M., Lokalizacja i charakterystyka neuronów przedmurza szczura rzutujących do różnych obszarów kory nowej, *Akademia Medyczna w Gdańsku*, 1996.
194. Sadowski, M., Moryś, J., Jakubowska-Sadowska, K., Narkiewicz, O., Rat's claustrum shows two main cortico-related zones, *Brain Res*, 756 (1997) 147-152.
195. Sadowski, M., Moryś, J., Jakubowska-Sadowska, K., Narkiewicz, O., Some claustral neurons projecting to various neocortical areas show morphological differences, *Folia Morphol (Warsz)*, 56 (1997) 65-76.
196. Satoh, J., Tabira, T., Sano, M., Nakayama, H., Tateishi, J., Parvalbumin-immunoreactive neurons in the human central nervous system are decreased in Alzheimer's disease, *Acta Neuropathol. (Berl)*, 81 (1991) 388-395.
197. Schanne, F.A., Kane, A.B., Young, E.E., Farber, J.L., Calcium dependence of toxic cell death: a final common pathway, *Science*, 206 (1979) 700-702.

198. Scharfman,H.E., Schwartzkroin,P.A., Protection of dentate hilar cells from prolonged stimulation by intracellular calcium chelation, *Science*, 246 (1989) 257-260.
199. Schierle,G.S., Gander,J.C., D'Orlando,C., Celio,M.R., Weisenhorn,D.M., Calretinin-immunoreactivity during postnatal development of the rat isocortex: A qualitative and quantitative study, *Cereb Cortex*, 7 (1997) 130-142.
200. Schurmans,S., Schiffmann,S.N., Gurden,H., Lemaire,M., Lipp,H.P., Schwam,V., Pochet,R., Imperato,A., Bohme,G.A., Parmentier,M., Impaired long-term potentiation induction in dentate gyrus of calretinin-deficient mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 94 (1997) 10415-10420.
201. Schwaller,B., Durussel,I., Jermann,D., Herrmann,B., Cox,J.A., Comparison of the Ca<sup>2+</sup>-binding properties of human recombinant calretinin-22k and calretinin, *J. Biol. Chem.*, 272 (1997) 29663-29671.
202. Schwaller,B., Tetko,I.V., Tandon,P., Silveira,D.C., Vreugdenhil,M., Henzi,T., Potier,M.C., Celio,M.R., Villa,A.E., Parvalbumin deficiency affects network properties resulting in increased susceptibility to epileptic seizures, *Mol. Cell Neurosci.*, 25 (2004) 650-663.
203. Seaton,B.A., Dedman,J.R., Annexins, *Biometals*, 11 (1998) 399-404.
204. Sheerin,A.H., Nylen,K., Zhang,X., Saucier,D.M., Corcoran,M.E., Further evidence for a role of the anterior claustrum in epileptogenesis, *Neuroscience*, 125 (2004) 57-62.
205. Sherk,H., The claustrum and the cerebral cortex. In: Jones,E.G., Peters,A. (Eds.), *Cerebral cortex. vol.5. Sensory-motor areas and aspects of cortical connectivity*, Plenum Press, New York, London, 1988, pp. 467-499.
206. Sherk,H., LeVay,S., Visual claustrum: topography and receptive field properties in the cat, *Science*, 212 (1981) 87-89.
207. Shima,K., Hoshi,E., Tanji,J., Neuronal activity in the claustrum of the monkey during performance of multiple movements, *J Neurophysiol*, 76 (1996) 2115-2119.
208. Simic,G., Mrzljak,L., Fucic,A., Winblad,B., Lovric,H., Kostovic,I., Nucleus subputaminalis (Ayala): the still disregarded magnocellular component of the basal forebrain may be human specific and connected with the cortical speech area, *Neuroscience*, 89 (1999) 73-89.
209. Sims,K.B., Hoffman,D.L., Said,S.I., Zimmerman,E.Z., Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in mouse and rat brain: An immunocytochemical study, *Brain Res*, 186 (1980) 165-183.
210. Słoniewski,P., Moryś,J., Pilgrim,Ch., Stimulation of glucose utilization in the rat claustrum by pain, *Folia Neuropathol*, 33 (1995) 163-168.
211. Słoniewski,P., Pilgrim,Ch., Claustro-neocortical connections in the rat as demonstrated by retrograde tracing with Lucifer Yellow, *Neurosci Lett*, 49 (1984) 29-32.



212. Słoniewski,P., Usunoff,K.G., Pilgrim,Ch., Diencephalic and mesencephalic afferents of the rat claustrum, *Anat Embryol (Berl)*, 173 (1986) 401-411.
213. Sloviter,R.S., Sollas,A.L., Barbaro,N.M., Laxer,K.D., Calcium-binding protein (calbindin-D28K) and parvalbumin immunocytochemistry in the normal and epileptic human hippocampus, *J Comp Neurol*, 308 (1991) 381-396.
214. Smith,Y., Paré,J.F., Paré,D., Differential innervation of parvalbumin-immunoreactive interneurons of the basolateral amygdaloid complex by cortical and intrinsic inputs, *J Comp Neurol*, 416 (2000) 496-508.
215. Solbach,S., Celio,M.R., Ontogeny of the calcium binding protein parvalbumin in the rat nervous system, *Anat. Embryol. (Berl)*, 184 (1991) 103-124.
216. Solodkin,A., Veldhuizen,S.D., VanHoesen,G.W., Contingent vulnerability of entorhinal parvalbumin-containing neurons in Alzheimer's disease, *J Neurosci*, 16 (1996) 3311-3321.
217. Sorvari,H., Miettinen,R., Soininen,H., Paljärvi,L.B., Karkola,K., Pitkänen,A., Calretinin-immunoreactive terminals make synapses on calbindin D28k-immunoreactive neurons in the lateral nucleus of the human amygdala, *Brain Res*, 783 (1998) 355-358.
218. Sorvari,H., Miettinen,R., Soininen,H., Pitkänen,A., Parvalbumin-immunoreactive neurons make inhibitory synapses on pyramidal cells in the human amygdala: A light and electron microscopic study, *Neurosci Lett*, 217 (1996) 93-96.
219. Spahn,B., Braak,H., Percentage of projection neurons and various types of interneurons in the human claustrum, *Acta. Anat.*, 122 (1985) 245-248.
220. Spitzer,N.C., Spontaneous  $Ca^{2+}$  spikes and waves in embryonic neurons: signaling systems for differentiation, *Trends Neurosci*, 17 (1994) 115-118.
221. Standage,G.P., Doetsch,G.S., Projections from cortical area SmII and claustrum to two functional subdivisions of SmI forepaw digit cortex of the raccoon, *Brain Res Bull*, 21 (1988) 207-213.
222. Stuhmer,T., Puelles,L., Ekker,M., Rubenstein,J.L., Expression from a *Dlx* gene enhancer marks adult mouse cortical GABAergic neurons, *Cereb. Cortex*, 12 (2002) 75-85.
223. Świtka,A., Scheuermann,D.W., Adiaensen,D., Timmermans,J.-P., and Narkiewicz,O., NADPH-diaphorase enzyme activity, serotonin and tyrosine hydroxylase immunocytochemistry in the claustrum of the domestic cat. In: Kühnel,W. (Ed.), *Verhandlungen der Anatomischen Gesellschaft*, Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart, 1994, pp. 182.
224. Toth,K., Freund,T.F., Calbindin D28k-containing nonpyramidal cells in the rat hippocampus: their immunoreactivity for GABA and projection to the medial septum, *Neuroscience*, 49 (1992) 793-805.

225. Updyke, B.V., A reevaluation of the functional organization and cytoarchitecture of the feline lateral posterior complex with observations on adjoining cell groups, *J Comp Neurol*, 219 (1983) 143-181.
226. VanBrederode, J.F., Mulligan, K.A., Hendrickson, A.E., Calcium binding proteins as markers for subpopulations of GABAergic neurons in monkey striate cortex, *J Comp Neurol*, 298 (1990) 1-22.
227. Wada, J.A., Kudo, T., Involvement of the claustrum in the convulsive evolution of temporal limbic seizure in feline amygdaloid kindling, *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 103 (1997) 249-256.
228. Waldvogel, H.J., Faull, R.L., Williams, M.N., Dragunow, M., Differential sensitivity of calbindin and parvalbumin immunoreactive cells in the striatum to excitotoxins, *Brain Res.*, 546 (1991) 329-335.
229. Wasilewska, B., Najdzion, J., Types of neurons of the claustrum in the rabbit - Nissl, Klüver-Barrera and Golgi studies, *Folia Morphol*, 60 (2001) 41-46.
230. Wasserman, R.H., Corradino, R.A., Taylor, A.N., Vitamin D-dependent calcium-binding protein. Purification and some properties, *J. Biol. Chem.*, 243 (1968) 3978-3986.
231. Weiss, J.H., Koh, J., Baimbridge, K.G., Choi, D.W., Cortical neurons containing somatostatin- or parvalbumin-like immunoreactivity are atypically vulnerable to excitotoxic injury in vitro, *Neurology*, 40 (1990) 1288-1292.
232. Whitfield, J.F., Bird, R.P., Chakravarthy, B.R., Isaacs, R.J., Morley, P., Calcium - Cell cycle regulator, differentiator, killer, chemopreventor, and maybe, tumor promoter, *J Cell Biochem*, 58 (1995) 74-91.
233. Wilhite, B.L., Teyler, T.J., Hendricks, C., Functional relation of rodent claustral-entorhinal-hippocampal system, *Brain Res*, 365 (1986) 54-60.
234. Winsky, L., Kuznicki, J., Antibody recognition of calcium-binding proteins depends on their calcium-binding status, *J Neurochem*, 66 (1996) 764-771.
235. Winsky, L., Kuznicki, J., Distribution of calretinin, calbindin D28k, and parvalbumin in subcellular fractions of rat cerebellum: Effects of calcium, *J Neurochem*, 65 (1995) 381-388.
236. Wójcik, S., Podobieństwa i różnice w rozwoju przedmurza i zespołu podstawno-bocznego ciała migdałowatego królika w badaniach stereologicznych, *Akademia Medyczna w Gdańsku*, Gdańsk, 2002, 204 pp.
237. Wójcik, S., Dziewiątkowski, J., Spodnik, E., Ludkiewicz, B., Domaradzka-Pytel, B., Kowiański, P., Moryś, J., Analysis of calcium binding protein immunoreactivity in the claustrum and the endopiriform nucleus of the rabbit, *Acta Neurobiol. Exp. (Wars. )*, 64 (2004) 449-460.
238. Yan, Y.H., van Brederode, J.F., Hendrickson, A.E., Transient co-localization of calretinin, parvalbumin, and calbindin-D28K in developing visual cortex of monkey, *J. Neurocytol.*, 24 (1995) 825-837.

239. Zhang,X., Hannesson,D.K., Saucier,D.M., Wallace,A.E., Howland,J., Corcoran,M.E., Susceptibility to kindling and neuronal connections of the anterior claustrum, *J Neurosci*, 21 (2001) 3674-3687.
240. Zhu,X., Wang,Y., Ogawa,O., Lee,H.G., Raina,A.K., Siedlak,S.L., Harris,P.L., Fujioka,H., Shimohama,S., Tabaton,M., Atwood,C.S., Petersen,R.B., Perry,G., Smith,M.A., Neuroprotective properties of Bcl-w in Alzheimer disease, *J. Neurochem.*, 89 (2004) 1233-1240.