

ANNALES
ACADEMIAE MEDICAE
GEDANENSIS
TOM XXXVI
2005
SUPPLEMENT 5

AKADEMIA MEDYCZNA W GDAŃSKU

Przemysław Kowiański

**Neuromodulatory i białka wiążące wapń w dojrzewaniu
neuronów przedmurza szczura –
badania immunocytochemiczne, morfometryczne
oraz oparte na wstecznym transporcie aksonalnym**

*Neuromodulators and calcium binding proteins in maturation
of the claustral neurons in the rat – immunocytochemical,
morphometric and based on the retrograde axonal transport studies*

Rozprawa habilitacyjna

Zakład Anatomii i Neurobiologii
Akademii Medycznej w Gdańsku
Kierownik: prof. dr hab. med. Janusz Moryś

GDAŃSK 2005

Wydano za zgodą
Senackiej Komisji Wydawnictw Akademii Medycznej w Gdańsku

REDAKTOR NACZELNY
PRESIDENT OF THE EDITORIAL BOARD

prof. dr Roman Kaliszan

KOMITET REDAKCYJNY
EDITORIAL BOARD

prof. dr Marek Grzybiak (sekretarz), prof. dr Andrzej Hellmann,
dr hab. Józef Jordan, prof. nadzw. AMG, prof. dr Janusz Limon,
prof. dr Zbigniew Machaliński, prof. dr Stefan Raszeja

ADRES REDAKCJI
ADDRESS OF EDITORIAL OFFICE
Annales Academiae Medicae Gedanensis
ul. Marii Skłodowskiej-Curie 3a,
80-210 Gdańsk, Poland
e-mail: annales@amg.gda.pl

Artykuły opublikowane w Annales AMG
są zamieszczane w bazie EMBASE
Articles published In Annales AMG are covered
by the Excerpta Medica database (EMBASE)

PL ISSN 0303-4135

Akademia Medyczna w Gdańsku

Wyrażam serdeczne podziękowania:

*Panu Profesorowi Januszowi Morysiowi
za zachętę do podjęcia badań, stworzenie sprzyjających warunków do
ich realizacji oraz życzliwe uwagi merytoryczne udzielone w trakcie
przygotowywania tej pracy.*

*Panu Profesorowi Olgierdowi Narkiewiczowi
za cenne rady i wskazówki umożliwiające nadanie właściwej formy
mojej pracy.*

*Dr n. med. Joannie Moryś
za pomoc w przygotowaniu materiału badawczego.*

*Dr n. med. Jerzemu Dziewiątkowskiemu
oraz dr n. med. Sławomirowi Wójcikowi
za cenne rady oraz życzliwą pomoc okazaną w trakcie opracowywania
wyników badań.*

*Mgr Sylwii Scisłowskiej
za nieocenioną pomoc w przygotowaniu szaty graficznej.*

*Ponadto, wyrażam podziękowania wszystkim Koleżankom i Kolegom
z Zakładu Anatomii i Neurobiologii Akademii Medycznej w Gdańsku,
z których wsparcia i pomocy wielokrotnie korzystałem.*

*Moim Najbliższym dziękuję za wyrozumiałość i cierpliwość okazaną
podczas przygotowywania tej pracy.*

SPIS TREŚCI

1. WSTĘP	11
1.1. WŁAŚCIWOŚCI BIOLOGICZNE WYBRANYCH NEUROMODULATORÓW ORAZ BIAŁEK WIĄŻĄCYCH WAPŃ	12
1.1.1. <i>Neuropeptydy w neuronach ośrodkowego układu nerwowego</i>	12
1.1.2. <i>Tlenek azotu</i>	15
1.1.3. <i>Białka wiążące wapń</i>	15
1.2. PRZEDMURZE, POŁOŻENIE I BUDOWA	17
1.3. NEUROPRZEKAŹNIKI, NEUROMODULATORY ORAZ BIAŁKA WIĄŻĄCE WAPŃ W NEURONACH PRZEDMURZA	20
1.4. POŁĄCZENIA PRZEDMURZA	21
1.5. POCHODZENIE PRZEDMURZA	21
1.6. ROZWÓJ I DOJRZEWANIE PRZEDMURZA	22
1.7. ZASADNICZE ZNACZENIE CZYNNOŚCIOWE PRZEDMURZA.....	25
1.7.1. <i>Funkcja kontrolna w stosunku do kory mózgu</i>	25
1.7.2. <i>Udział przedmurza w tzw. integracji wielomodalnej</i>	26
1.7.3. <i>Udział przedmurza w rozprzestrzenianiu pobudzeń padaczkowych</i>	27
2. CELE PRACY	28
3. MATERIAŁ I METODY	30
3.1. MATERIAŁ	30
3.2. METODY	30
3.2.1. <i>Metody immunocytochemiczne</i>	30
3.2.2. <i>Metody oparte na wstecznym transporcie aksonalnym</i>	32
3.2.3. <i>Badania jakościowe i ilościowe</i>	34
3.2.4. <i>Metody morfometryczne</i>	35
3.2.5. <i>Ocena zawartości białka SNAP-25 metodą „Western blotting”</i>	38
3.2.6. <i>Ocena statystyczna wyników</i>	38
4. WYNIKI	40
4.1. OCENA MORFOLOGICZNA DOJRZEWANIA POPULACJI NEURONÓW ZAWIERAJĄCYCH NEUROPEPTYDY W PRZEDMURZU	40
4.1.1. <i>Neuropeptyd Y</i>	40
4.1.2. <i>Somatostatyna</i>	44
4.1.3. <i>Wazoaktywny peptyd jelitowy</i>	48
4.2. OCENA MORFOLOGICZNA DOJRZEWANIA POPULACJI NEURONÓW ZAWIERAJĄCYCH BIAŁKA WIĄŻĄCE WAPŃ W PRZEDMURZU.....	52
4.2.1. <i>Kalbindyna D28k</i>	52
4.2.2. <i>Kalretynina</i>	56
4.2.3. <i>Parwalbumina</i>	60
4.3. PODSUMOWANIE WYNIKÓW DOTYCZĄCYCH WYSTĘPOWANIA NEUROPEPTYDÓW ORAZ BIAŁEK WIĄŻĄCYCH WAPŃ W NEURONACH PRZEDMURZA W OKRESIE DOJRZEWANIA	64

4.4.	KOLOKALIZACJA NEUROPEPTYDÓW Z BIAŁKAMI WIĄŻĄCYMI WAPŃ LUB SYNTAZĄ TLENKU AZOTU W OKRESIE DOJRZEWANIA PRZEDMURZA	66
4.4.1.	<i>Kolokalizacje z udziałem neuropeptydu Y</i>	66
4.4.2.	<i>Kolokalizacje z udziałem somatostatyny</i>	81
4.4.3.	<i>Kolokalizacje z udziałem wazoaktywnego peptydu jelitowego</i>	89
4.5.	PODSUMOWANIE WYNIKÓW DOTYCZĄCYCH KOLOKALIZACJI NEUROPEPTYDÓW Z BIAŁKAMI WIĄŻĄCYMI WAPŃ LUB SYNTAZĄ TLENKU AZOTU W OKRESIE DOJRZEWANIA PRZEDMURZA.	93
4.6.	OCENA DOJRZEWANIA POPULACJI NEURONÓW PROJEKCYJNYCH PRZEDMURZA W OPARCIU O METODĘ WSTECZNEGO TRANSPORTU AKSONALNEGO.....	95
4.7.	PODSUMOWANIE WYNIKÓW DOTYCZĄCYCH DOJRZEWANIA POPULACJI NEURONÓW PROJEKCYJNYCH PRZEDMURZA	99
4.8.	WYSTĘPOWANIE BIAŁKA SYNAPTYCZNEGO SNAP-25 W NEURONACH PRZEDMURZA W OKRESIE POURODZENIOWYM.....	99
5.	DYSKUSJA	101
5.1.	OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA ZMIAN ZACHODZĄCYCH PODCZAS DOJRZEWANIA PRZEDMURZA.....	101
5.2.	CHARAKTERYSTYKA DYNAMIKI DOJRZEWANIA PRZEDMURZA	102
5.3.	CHARAKTERYSTYKA ZMIAN MORFOLOGICZNYCH NEURONÓW ZAWIERAJĄCYCH BADANE SUBSTANCJE	109
5.4.	CECHY PROCESU DOJRZEWANIA NEURONÓW	111
5.5.	KOLOKALIZACJA NEUROPEPTYDÓW Z BIAŁKAMI WIĄŻĄCYMI WAPŃ LUB SYNTAZĄ TLENKU AZOTU W OKRESIE DOJRZEWANIA PRZEDMURZA	112
5.6.	POTENCJALNE ZNACZENIE CZYNNOŚCIOWE POPULACJI NEURONÓW ZAWIERAJĄCYCH BADANE SUBSTANCJE W PROCESIE DOJRZEWANIA PRZEDMURZA	115
5.6.1.	<i>Znaczenie czynnościowe neuropeptydów</i>	115
5.6.2.	<i>Znaczenie czynnościowe białek wiążących wapń</i>	116
5.6.3.	<i>Znaczenie czynnościowe tlenku azotu</i>	117
5.7.	OCENA DOJRZEWANIA POPULACJI NEURONÓW PROJEKCYJNYCH W OPARCIU O METODĘ WSTECZNEGO TRANSPORTU AKSONALNEGO	118
6.	PODSUMOWANIE WYNIKÓW I WNIOSKI	121
7.	STRESZCZENIE.....	123
8.	SUMMARY	126
9.	PIŚMIENNICTWO	129

Wykaz stosowanych skrótów

ac	– spoidło przednie (ang. <i>anterior commissure</i>)
Acb	– jądro półleżące (ang. <i>nucleus accumbens</i>)
Amg	– ciało migdałowe (ang. <i>amygdaloid body</i>)
BDNF	– czynnik wzrostowy pochodzenia mózgowego (ang. <i>brain-derived neurotrophic factor</i>)
CB	– kalbindyna (ang. <i>calbindin</i>)
CBP	– białka wiążące wapń (ang. <i>calcium binding proteins</i>)
cc	– ciało modzelowate (ang. <i>corpus callosum</i>)
CCr	– rezerwuar korowo-przedmurzowy (ang. <i>cortico-claustral reservoir</i>)
Cl	– przedmurze (ang. <i>claustrum</i>)
CPu –	– prążkowie (ang. <i>striatum</i>)
CR	– kalretynina (ang. <i>calretinin</i>)
Cy ³	– indokarbocyjanina (ang. <i>indocarbocyanine</i>)
ec	– torebka zewnętrzna (ang. <i>external capsule</i>)
EDn	– jądro śródgruszkowe (ang. <i>endopiriform nucleus</i>)
FG	– Fluoro-Gold
FITC	– fitocyjanina (ang. <i>fitocyanine</i>)
GABA	– kwas γ -aminomasłowy (ang. <i>γaminobutyric acid</i>)
GP	– gałka błada (ang. <i>globus pallidus</i>)
Hip	– hipokamp (ang. <i>hippocampus</i>)
IC	– kora wyspowa (ang. <i>insular cortex</i>)
ic	– torebka wewnętrzna (ang. <i>internal capsule</i>)
j.m.	– jednostka międzynarodowa
MA	– neuron bezkolcowy średniej wielkości (ang. <i>medium size, aspiny neuron</i>)
MS I	– neurony kolcowy, z długim dendrytem głównym (ang. <i>medium size, spiny neuron, with long, main dendrite</i>)
MS II	– neuron kolcowy, z krótkim dendrytem głównym (ang. <i>medium size, spiny neuron, with short, main dendrite</i>)
MS III	– neuron kolcowy, pozbawiony dendrytu głównego (ang. <i>medium size, spiny neuron, without main dendrite</i>)
NOS	– syntaza tlenu azotu (ang. <i>nitric oxide synthase</i>)
NPY	– neuropeptyd Y (ang. <i>neuropeptide Y</i>)
OUN	– ośrodkowy układ nerwowy (ang. <i>central nervous system</i>)
PBS	– roztwór buforu fosforanowego (ang. <i>phosphate-buffered saline</i>)
Pir	– kora gruszkowata (ang. <i>piriform cortex</i>)
PV	– parwalbumina (ang. <i>parvalbumin</i>)
Rh	– bruzda węchowa (ang. <i>rhinal sulcus</i>)
SA	– mały neuron bezkolcowy (ang. <i>small aspiny neuron</i>)
SNAP-25	– białko związane z synaptosomem (ang. <i>synaptosome-associated protein</i>)
SOM	– somatostatyna (ang. <i>somatostatin</i>)
Th	– wzgórze (ang. <i>thalamus</i>)
VIP	– wazoaktywny peptyd jelitowy (ang. <i>vasoactive intestinal peptide</i>)

1. WSTĘP

Dynamiczny rozwój neuroanatomii i neurobiologii w ciągu ostatnich kilkadziesiąt lat umożliwił przeniesienie zainteresowań badawczych z zakresu morfologii opisowej w kierunku poznania przebiegu określonych procesów fizjologicznych i zrozumienia funkcji badanych struktur. Udoskonalenie metod immunocytochemicznych, morfometrycznych, w połączeniu z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej, a także rozwój biologii molekularnej, umożliwiają realizację tych zadań.

Pomimo zaawansowanych badań, rozwój i dojrzewanie wielu struktur ośrodkowego układu nerwowego (OUN) nie zostały dotychczas w pełni poznane i stanowią przedmiot dalszego zainteresowania naukowego. W kresomózgowiu ssaków jest coraz mniej struktur, których pochodzenie i funkcja pozostają tak słabo poznane jak w przypadku przedmurza.

Wzrastająca w ciągu ostatnich kilku lat liczba publikacji dotyczących przedmurza jest rezultatem wykazania jego udziału w koordynacji działania wielu obszarów korowych [61, 62, 126, 175], a także zaangażowania w proces epileptogenezy [315, 418, 497]. Wiele problemów związanych z budową i funkcją przedmurza zdołano wyjaśnić na podstawie badań przeprowadzonych u dojrzałych przedstawicieli wielu gatunków ssaków. Odpowiedzi na wiele otwartych pytań należy jednak szukać w rozwoju ontogenetycznym.

Od momentu powstania populacji komórkowej tworzącej przedmurze, do chwili osiągnięcia przez tę strukturę cech morfologicznych oraz immunocytochemicznych właściwych dla okresu dojrzałego, upływa długi okres, obejmujący końcową część rozwoju prenatalnego, jak i dojrzewanie w okresie postnatalnym. Ze względu na fragmentaryczny charakter informacji dotyczących procesów przebiegających w tym czasie, istotne wydaje się poznanie zmian zachodzących w przedmurzu po urodzeniu. Zmiany te dotyczą między innymi cech morfologicznych neuronów przedmurza, charakterystyki immunocytochemicznej, tworzenia połączeń z innymi strukturami oraz odpowiedniego kształtowania układu synaptycznego.

W populacji neuronów przedmurza, podobnie jak wielu innych struktur ośrodkowego układu nerwowego, rozróżnić można neurony projekcyjne, zapewniające połączenia z innymi strukturami oraz interneurony, czyli neurony pośredniczące, wywierające wpływ na pozostałe komórki nerwowe badanej struktury. W obu populacjach spotyka się charakterystyczne neuroprzekaźniki. W pierwszej z nich zasadniczą rolę odgrywa kwas glutaminowy, jako neuroprzekaźnik pobudzający [377], w drugiej – kwas γ -aminomasłowy (GABA), będący neuroprzekaźnikiem hamującym [153, 338, 339]. Oprócz wymienionych

klasycznych neuroprzekazników, istotne znaczenie posiadają liczne neuromodulatory, wśród których spotyka się neuropeptydy oraz związki nieorganiczne, jak tlenek azotu. Ponadto, ważną funkcję regulacyjną procesów metabolicznych spełniają białka wiążące wapń. Obecność tych substancji, w połączeniu z charakterystycznymi cechami morfologicznymi oraz zróżnicowaną czynnością bioelektryczną stanowi, zdaniem wielu autorów, użyteczne kryterium podziału populacji interneuronów [67, 68, 220, 221, 224].

Wśród interneuronów hamujących liczną grupę stanowią neurony zawierające parwalbuminę [12, 72, 73, 98, 195, 222, 248]. Kolejną grupę tworzą neurony zawierające somatostatynę [221]. Część z nich wykazuje kolokalizację z neuropeptydem Y oraz kalbindyną D28k [183, 184, 393], a także z syntazą tlenu azotu [246]. W odrębnej grupie występują neurony zawierające wazoaktywny peptyd jelitowy, których część wykazuje kolokalizację z kalretyniną [222]. Ponadto, spotyka się stosunkowo liczną populację interneuronów wykazujących obecność cholecystokininy [249].

Duże zróżnicowanie populacji interneuronów zapewnia możliwość precyzyjnego oddziaływania zarówno na pozostałe neurony pośredniczące, jak i na neurony projekcyjne. Oddziaływanie to jest możliwe po zakończeniu procesu dojrzewania obu populacji neuronalnych, jak również układu synaptycznego.

Przeprowadzone dotychczas badania procesów rozwoju i dojrzewania neuronów przedmurza mają charakter fragmentaryczny. Nie pozwalają one na dokonanie oceny zróżnicowania populacji tych neuronów pod względem morfologicznym oraz immunocytochemicznym. Nie pozwalają również na ocenę dynamiki rozwoju i dojrzewania określonych subpopulacji neuronalnych. Uzasadnia to próbę dokonania oceny charakteru zmian zachodzących w przedmurzu, w najwcześniejszym okresie po urodzeniu szczura.

1.1. Właściwości biologiczne wybranych neuromodulatorów oraz białek wiążących wapń

1.1.1. Neuropeptydy w neuronach ośrodkowego układu nerwowego

Neuropeptydy stanowią najliczniejszą grupę substancji wśród neuromodulatorów spotykanych w neuronach ośrodkowego układu nerwowego. Biorą one udział w regulacji procesów metabolicznych oraz umożliwiają komunikację między komórkami nerwowymi. Mogą one działać jako neurohormony, neuroprzekazniki lub neuromodulatory [256, 363, 381].

Działanie neuromodulacyjne neuropeptydów polega na zmianie właściwości elektrycznych komórki nerwowej, mogących wpływać na zdolność jej odpowiedzi na uprzednio lub następczo działający neuroprzekaznik [289, 397, 495].

Działanie neuromodulatorów jest zazwyczaj dłuższe, niż działanie klasycznego neuroprzekaźnika, ze względu na pobudzenie receptorów związanych z białkami G oraz uruchomienie systemu wtórnych przekaźników. Działanie neuromodulatorów nie jest ograniczone jedynie do układu synaptycznego, lecz może odbywać się drogą tzw. transmisji objętościowej, umożliwiając rozprzestrzenianie na znacznym obszarze i jednocześnie oddziaływanie na większą liczbę neuronów [60, 143, 410, 472]. Poszczególne neuropeptydy mogą spełniać wiele funkcji i dlatego bardzo trudno jest przypisać każdemu z nich specyficzne działanie w określonej strukturze ośrodkowego układu nerwowego.

Neuropeptydy występują licznie w wielu okolicach mózgowia. Szczególnie duża ich ilość znajduje się w podwzgórzu [457]. Ponadto, spotyka się je w korze mózgu, strukturach układu pozapiramidowego i limbicznego oraz pniu mózgowia. Neuropeptydy występują zarówno w populacji interneuronów, jak i neuronów projekcyjnych [100, 133, 140, 176, 183, 201, 246, 295, 393, 493].

Neuropeptyd Y

Neuropeptyd Y (NPY) jest zbudowany z 36 aminokwasów [447, 448]. Działanie biologiczne NPY zachodzi za pośrednictwem pięciu typów receptorów: Y1, Y2, Y4, Y5, Y6 [187, 257, 258, 275, 276, 367]. Należą one do kategorii receptorów związanych z białkami G [424]. Obecność dwóch spośród nich (Y1 i Y2), została stwierdzona w przedmurzu [368].

NPY jest ważnym regulatorem procesu przyjmowania pokarmu [186] i homeostazy energetycznej [30, 31, 262-264, 478, 479]. Wpływa on na regulację ciśnienia krwi i przepływu naczyniowego [170, 306, 424] oraz uczestniczy w procesie angiogenezy [260, 503, 504]. NPY wykazuje działanie anksjolityczne [13, 151] oraz wpływa na regulację rytmów dobowych [262, 478]. Ponadto, neuropeptyd ten wykazuje działanie przeciwdrgawkowe [41, 44, 206, 228]. W wielu strukturach ośrodkowego układu nerwowego NPY współwystępuje z GABA i somatostatyną [28, 150, 246, 302].

Neurony NPY-ir pojawiają się w trzynastym i czternastym dniu życia płodowego w pniu mózgowia i w międzymózgowiu szczura [9, 487]. Obserwuje się wzrost ekspresji NPY w okresie przed- i pourodzeniowym w korze mózgu małpy oraz w siatkówce szczura [29, 130].

Somatostatyna

U ssaków spotyka się dwie formy somatostatyny (SOM), zawierające odpowiednio 14 oraz 28 aminokwasów (SOM-14 oraz SOM-28). W neuronach dominuje forma SOM-14. Somatostatyna działa za pośrednictwem pięciu typów receptorów (SST1 – SST5), w większości (z wyjątkiem prawdopodobnie SST2) związanych z białkami G [33, 128, 177]. Somatostatyna oddziaływując na

cyklazę adenylową wpływa na zawartość cAMP oraz jonów Ca^{++} w komórce [131, 155, 156, 265, 371, 451].

Somatostatyna działa hamująco na uwalnianie hormonu wzrostu [269], a także wpływa na wielkość uwalniania dopaminy, asparagianu i GABA [178]. Spełnia ona funkcje neuromodulatora oraz neuroprzekaźnika hamującego [379], rzadziej może działać jako neuroprzekaźnik pobudzający [299-301]. W hipokampie somatostatyna moduluje transmisję cholinergiczną, regulując funkcje poznawcze [123, 124]. Ponadto, wykazuje ona działanie zabezpieczające przed wystąpieniem napadowej czynności bioelektrycznej [211, 445, 456, 461, 470]. W wielu strukturach OUN wykazano kolokalizację SOM z GABA [221-223, 246], a także z NPY [365].

Neurony zawierające somatostatynę są jednymi z najwcześniej pojawiających się w rozwoju prenatalnym wielu struktur OUN [10, 20, 129, 347, 386, 502]. Na podstawie badań przeprowadzonych na mózgach myszy, szczura i świni, stwierdzono wzrost ekspresji SOM mRNA, a także peptydu, występującego w końcowym okresie rozwoju płodowego i we wczesnym okresie postnatalnym [58, 113, 135, 138, 382].

Wazoaktywny peptyd jelitowy

Wazoaktywny peptyd jelitowy (VIP) jest zbudowany z 28 aminokwasów [403]. VIP działa za pośrednictwem receptorów: VPAC1, VPAC2 oraz PAC1, związanych z białkami G [168, 212, 218, 253]. Mechanizm działania dotyczy wpływu na aktywację cyklazy adenylowej i fosfolipazy C [351]. Działanie VIP wiąże się ze wzmocnieniem hamowania zależnego od GABA [469].

Podstawowe funkcje fizjologiczne VIP w ośrodkowym układzie nerwowym obejmują regulację procesów przemiany materii [280, 281, 283, 323], regulację przepływu krwi w naczyniach mózgowych [180, 459], indukowanie syntezy i wydzielania czynników neuroprotektynowych [53, 132, 152, 160, 190, 323], wpływ na ekspresję czynnika wzrostowego pochodzenia mózgowego (BDNF) [282, 376]. Ponadto, VIP zabezpiecza neurony przed uszkodzeniem wywołanym przez nadmierne pobudzenie receptorów NMDA [53, 54, 164].

W wielu strukturach ośrodkowego układu nerwowego wykazano kolokalizację VIP z GABA [26, 27, 221, 222], cholecystokininą [294, 415], acetylocholiną [26, 76] oraz kalretyniną [98, 195].

Obecność VIP mRNA w mózgu szczura stwierdzono w szesnastym dniu rozwoju płodowego [70, 161]. Neurony kory mózgu szczura zawierające VIP powstają w okresie między E17 a E21 [70]. Obecność VIP w tych neuronach zaobserwowano w ciągu pierwszego tygodnia po urodzeniu [159, 499], a cechy dojrzałości morfologicznej osiągają one w okresie drugiego i trzeciego tygodnia życia.

1.1.2. Tlenek azotu

Tlenek azotu (NO) jest jedną z najmniejszych cząsteczek zaangażowanych w komunikacji międzykomórkowej [52, 145, 146, 148]. Pełni on rolę neuromodulatora transmisji synaptycznej [2, 417].

NO jest syntetyzowany w strukturach ośrodkowego układu nerwowego przez trzy izomeryczne formy enzymatyczne syntazy tlenku azotu: nNOS (neuronalną formę syntazy NO – typ I, konstytutywną, zależną od jonów Ca^{++} i kalmoduliny), iNOS (indukowaną formę syntazy NO – typ II, indukowaną przez cytokiny, niezależną od jonów Ca^{++}) oraz eNOS (śródbłonkową formę syntazy NO – typ III, konstytutywną, zależną od jonów Ca^{++} i kalmoduliny) [8, 94, 230, 254, 291-293, 332, 432, 441, 486].

Rezultatem działania NO jest pobudzenie cykazy guanylowej i wzrost stężenia cGMP [93, 95, 196, 373]. Do najważniejszych funkcji fizjologicznych tlenku azotu zaliczyć należy pośredni wpływ na uwalnianie neuroprzekazników (np. glutamianu), regulację wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{++} oraz rolę modulującą w stosunku do kanałów wapniowych i potasowych [51, 94, 95, 147], udział w procesach długotrwałego wzmocnienia lub hamowania synaptycznego [15, 43, 46, 87, 149] oraz udział w przebiegu procesów behawioralnych [345]. Ponadto, tlenek azotu jest jednym z najważniejszych endogennych czynników rozszerzających naczynia krwionośne [55, 127, 444]. W zależności od warunków matabolicznych, tlenek azotu może wykazywać działanie zarówno neuroprotektoryjne, jak i neurotoksyczne [93, 96, 270, 271].

Ekspresja NOS mRNA trzech izoform w mózgowiu szczura rozpoczyna się w dziesiątym dniu rozwoju płodowego [225]. W obszarach tworzących następnie korę mózgu u szczura, ekspresja nNOS pojawia się w piętnastym dniu życia płodowego [406]. Pierwsze neurony NOS-ir w korze mózgu szczura pojawiają się w okresie prenatalnym [452]. Ekspresja nNOS w wielu obszarach mózgowia rozwija się ze zróżnicowaną dynamiką, związaną z okresami tworzenia synaps i stabilizacji połączeń [82, 354].

1.1.3. Białka wiążące wapń

Białka wiążące wapń (CaBP) są liczną grupą substancji, która dzięki obecności charakterystycznej formacji przestrzennej, odpowiada za regulację stężenia jonów wapniowych we wnętrzu komórki oraz regulację przebiegu wielu procesów fizjologicznych [12, 17, 72, 195]. W ośrodkowym układzie nerwowym ssaków, obok kalmoduliny, stwierdzono częste występowanie trzech białek tej grupy: kalbindyny D28k, kalretyniny i parwalbuminy [12, 17, 71-74, 98].

Neurony zawierające trzy wymienione białka należą przeważnie do niewykazujących wzajemnych kolokalizacji populacji komórkowych [4, 17, 98, 195]. Znaczna część neuronów zawierających omawiane białka wykazuje kolokalizację z GABA [12, 73, 100, 101, 185].

Pomimo działania buforującego jony wapniowe, rola tych białek chroniąca neurony w przebiegu procesów patologicznych, jak choroby zwyrodnieniowe czy niedokrwienie, nie jest jednoznacznie potwierdzona [12, 141, 181, 219, 229].

Pojawianie się białek wiążących wapń w różnych okolicach mózgowia ma miejsce w precyzyjnie określonych momentach w rozwoju. Występowanie tych białek w określonych miejscach w trakcie rozwoju i dojrzewania nie odpowiada jednak ich rozmieszczeniu u osobnika dorosłego [5-7, 182, 195]. Złożony charakter ekspresji tych białek uniemożliwia, jak do tej pory, przypisanie im ściśle określonej funkcji w procesie dojrzewania mózgowia.

Kalbindyna

Kalbindyna (CB) występuje w postaci kilku form o różnej masie cząsteczkowej (6 kDa, 8 kDa i 9 kDa, 11 kDa, 28 kDa). Forma o masie 28 kDa występuje w dużej ilości w neuronach [12, 205]. Neurony zawierające kalbindynę reprezentują około 5% całkowitej liczby neuronów kory mózgu szczura [12, 71]. Kalbindyna może występować zarówno w neuronach projekcyjnych, jak i interneuronach ośrodkowego układu nerwowego [71]. Początek występowania tego białka ma zazwyczaj miejsce po około dwóch dniach od zakończenia podziałów komórkowych i rozpoczęcia wzrostu dendrytów i aksonów [121]. Ekspresja kalbindyny w okresie przedurodzeniowym została stwierdzona między innymi w międzymózgowiu oraz korze somatosensorycznej szczura [121, 404, 494].

Kalretynina

Kalretynina (CR) jest strukturalnie blisko spokrewniona z kalbindyną [362, 394]. Białko to jest związane z regulacją procesów migracyjnych [416], spełnia rolę neuroprotekcijną, buforując wewnątrzkomórkowy poziom Ca^{++} już w najwcześniejszym okresie dojrzewania [407]. W okresie rozpoczęcia czynności bioelektrycznej komórki i pojawienia się transmisji synaptycznej, obserwuje się koncentrację kalretyniny w pobliżu błony komórkowej [174]. Takie umiejscowienie jest uważane za adaptację do ograniczenia przestrzennego napływu jonów Ca^{++} . Kalretynina jest białkiem, które zdaniem wielu autorów pojawia się najwcześniej spośród trzech omawianych w rozwoju osobniczym [195, 462, 463].

Parwalbumina

Parwalbumina (PV) występuje w postaci dwóch form (α i β) różniących się sekwencją aminokwasów [74, 75]. W strukturach ośrodkowego układu nerwowego ssaków spotykana jest forma alfa [74]. Neurony zawierające PV stanowią

około 10% populacji wszystkich neuronów korowych [12, 71]. Pojawienie się parwalbuminy i wzrost jej ekspresji odpowiada osiągnięciu dojrzałości czynnościowej neuronów [182, 346, 433]. W korze mózgu i hipokampie ma to miejsce po rozpoczęciu wytwarzania kwasu γ -aminomasłowego w populacji interneuronów [36, 346, 433].

Parwalbumina pojawia się najpóźniej spośród omawianych białek wiążących wapń w rozwoju osobniczym [12]. W korze mózgu oraz hipokampie u szczura ekspresję PV mRNA oraz białka zaobserwowano w drugim tygodniu po urodzeniu [97, 473]. Proces dojrzewania neuronów PV-ir u szczura trwa do 8 tygodnia [122].

1.2. Przedmurze, położenie i budowa

Przedmurze położone jest w kresomózgowiu większości ssaków. Torebka zewnętrzna oddziela je od strony przyśrodkowej od prążkowania, a dalej ku tyłowi – od ciała migdałowego (ryc. 1A-C). Ku dołowi przedmurze sąsiaduje z jądrem śródgruszkowym [32, 119, 337, 419].

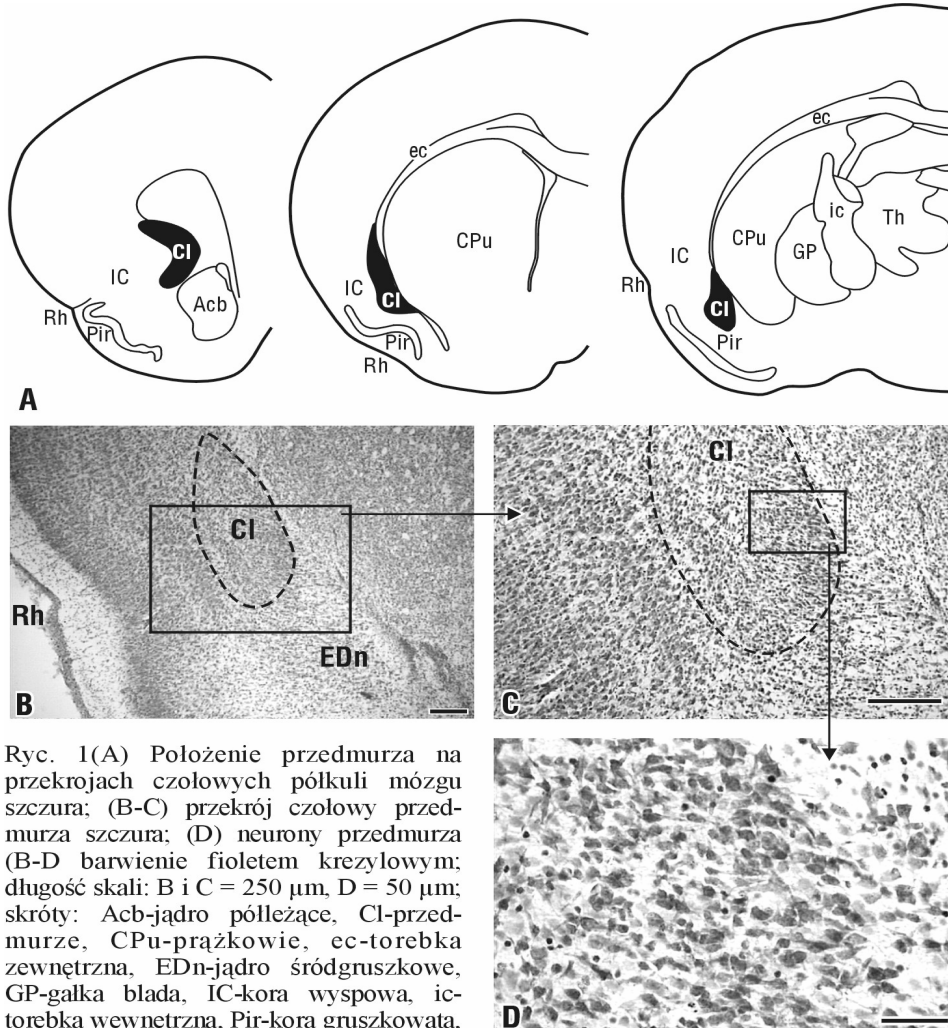
Ukształtowanie przedmurza jest bardzo zróżnicowane u wielu gatunków ssaków [39, 104, 106, 108, 235, 267, 325, 336, 420]. Różnice w kształtach przedmurza, stopień jego wyodrębnienia w stosunku do struktur sąsiadujących, a także różnice gęstości tworzących je neuronów, pozwoliły na wyróżnienie pięciu typów morfologicznych omawianej struktury [235]. Przedmurza szczura, a także ssaków owadożernych, zaliczone zostały do typu pierwszego. Kolejne typy morfologiczne reprezentowane są przez przedmurza zajęczaków i części gryzoni (typ II), ssaków drapieżnych (typ III) oraz naczelnych (typ IV i V). Zdaniem niektórych autorów nie można jednoznacznie wykazać obecności przedmurza i jądra śródgruszkowego u stekowców [59].

Budowa komórkowa przedmurza

Przedmurze charakteryzuje się znacznym zróżnicowaniem morfologicznym tworzących je neuronów (ryc. 1D). Można rozróżnić w nim neurony kolcowe, uznawane za projekcyjne, a także bezkolcowe, będące neuronami pośredniczącymi (interneuronami) [48, 50, 104, 267, 287, 288, 325, 399, 476]. Stwierdzono różnice międzygatunkowe dotyczące kształtów ciał komórek nerwowych oraz morfologii układu akso-dendrytycznego.

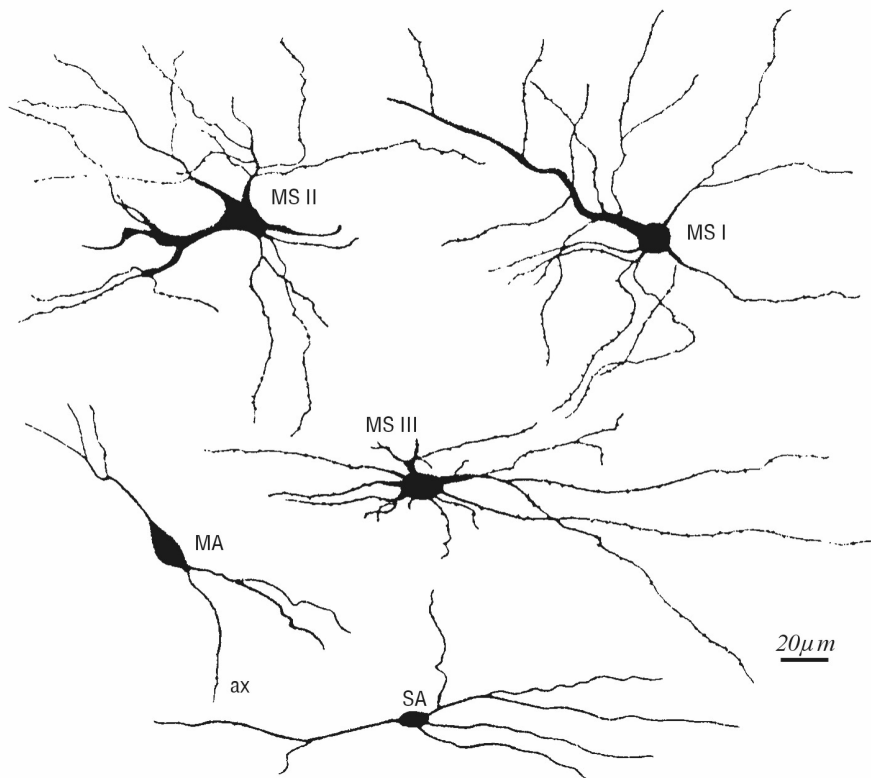
W przedmurzu szczura rozróżniono trzy zasadnicze typy neuronów (ryc. 2) [287, 338]. Najliczniej reprezentowane są neurony średniej wielkości, z licznymi kolcami dendrytycznymi (typ MS). W obrębie tego typu występują trzy dodatkowe podtypy: neurony o ciałach trójkątnych i owalnych z pojedynczym, długim dendrytem (MS I); neurony okrągłe i owalne, z krótkim pojedynczym dendrytem

(MS II); neurony okrągłe i owalne, nieposiadające głównego dendrytu (MS III). Kolejny typ morfologiczny (MA) stanowią neurony kształtu wrzecionowatego, średniej wielkości, posiadające dwa dendryty rozpoczynające się na przeciwnych biegunach. Komórki te nie posiadają kolców dendrytycznych. Ostatni typ morfologiczny (SA) stanowią małe neurony, kształtu okrągłego lub owalnego, pozbawione kolców dendrytycznych.



Ryc. 1(A) Położenie przedmurza na przekrojach czołowych półkuli mózgu szczura; (B-C) przekrój czołowy przedmurza szczura; (D) neurony przedmurza (B-D barwienie fioletem kryzylowym; długość skali: B i C = 250 μ m, D = 50 μ m; skróty: Acb-jądro pólleżące, Cl-przedmurze, CPu-prążkowie, ec-torebka zewnętrzna, EDn-jądro śródgruszkowe, GP-galka błada, IC-kora wyspowa, ic-torebka wewnętrzna, Pir-kora gruszkowata, Rh- bruzda węchowa, Th-wzgórze).

Fig. 1(A) Localization of the claustrum in the coronal sections of the rat hemisphere; (B-C) coronal section of the rat claustrum; (D) neurons of the claustrum (B-D cresyl violet staining; scale bar: B and C = 250 μ m, D = 50 μ m; abbreviations: Acb-nucleus accumbens, Cl-claustrum, CPu-striatum, ec-external capsule, EDn-endopiriform nucleus, GP-globus pallidus, IC-insular cortex, ic-internal capsule, Pir-piriform cortex, Rh-rhinal sulcus, Th-thalamus).



Ryc. 2. Typy morfologiczne neuronów przedmurza szczura według klasyfikacji Mamos i Narkiewicza: MS I - neurony kolcowe, z długim dendrytem głównym; MS II - neurony kolcowe, z krótkim dendrytem głównym; MS III - neurony kolcowe, pozbawione dendrytu głównego; MA - średniej wielkości neurony bezkońcowe; SA - małe neurony bezkońcowe (wzorowane na: Mamos L. i Narkiewicz O., 1984).

Fig. 2. Morphological types of the claustral neurons in the rat (according to Mamos and Narkiewicz): MS I - medium size, spiny neurons, with long, main dendrite; MS II - medium size, spiny neurons, with short, main dendrite; MS III - medium size, spiny neurons, without main dendrite; MA - medium size, aspiny neurons; SA - small aspiny neurons (adapted from: Mamos L. and Narkiewicz O., 1984).

Badania ludzkiego przedmurza wykazały występowanie znacznie przewagi neuronów projekcyjnych (93%) nad populacją interneuronów przedmurza (7%) [48, 437]. Odsetek interneuronów hamujących obliczony na podstawie badań przeprowadzonych w przedmurzu królika wynosi 12% [153]. W różnych częściach przedmurza stwierdzono obecność neuronów reprezentujących zróżnicowane cechy morfologiczne [325].

Budowa synaptyczna przedmurza charakteryzuje się znaczną przewagą synaps asymetrycznych [213-216, 350]. Wśród nich najczęściej występują synapsy akso-kolcowe (64,1%) lub akso-dendrytyczne, utworzone na powierzchni małych dendrytów (25,1%), rzadziej średnich i dużych dendrytów (6,8%). Najczęściej napotymano synapsy na powierzchni innych części neuronów (0,5%) lub na powierzchni kilku struktur postsynaptycznych (3,5%) [244, 245]. Morfologicznie odpowiadają one synapsom pobudzającym. Tylko 10% synaps przedmurza stanowią hamujące synapsy symetryczne.

1.3. Neuroprzekaźniki, neuromodulatory oraz białka wiążące wapń w neuronach przedmurza

Neurony przedmurza stanowią populację komórkową o zróżnicowanej charakterystyce immunocytochemicznej [116]. Należy podkreślić, iż najczęściej charakterystyka cytochemiczna neuronów przedmurza nie była głównym celem większości publikacji, lecz informacje dotyczące występowania określonych substancji w neuronach przedmurza podawano na marginesie charakterystyki populacji neuronalnych innych struktur ośrodkowego układu nerwowego. Podstawowym neuroprzekaźnikiem neuronów projekcyjnych przedmurza jest glutaminian [377]. Interneurony przedmurza zawierają kwas γ -aminomasłowy jako główny neuroprzekaźnik hamujący [110, 153, 339].

Stosunkowo liczne badania, przeprowadzone na przedstawicielach różnych gatunków ssaków, wykazały obecność białek wiążących wapń, a wśród nich parwalbuminy, kalbindyny D28K oraz kalretyniny w neuronach przedmurza [110, 390, 484]. Odsetek neuronów zawierających CaBP w przedmurzu myszy jest niewielki i nie przekracza 12% [387].

W przedmurzu osobników dorosłych różnych gatunków ssaków opisano obecność szeregu neuropeptydów – neuropeptydu Y, somatostatyny, cholecystokininy i wazoaktywnego peptydu jelitowego [117, 242, 425, 426]. W przedmurzu stwierdzono ponadto występowanie włókien serotonergicznych [18, 443], oraz zawierających hydroksylazę tyrozyny [443]. Wykazano występowanie w jego neuronach NADPH-diaforazy [193, 443], oraz syntazy tlenu azotu, zarówno w okresie dojrzewania, jak i w wieku dojrzałym [40, 241, 242, 392].

Ocena kolokalizacji wymienionych substancji w neuronach przedmurza jest, jak dotychczas, bardzo fragmentaryczna. Wykazano współwystępowanie syntazy tlenu azotu w neuronach zawierających neuropeptyd Y oraz somatostatynę w przedmurzu dojrzałego szczura [242]. Ponadto, stwierdzono obecność syntazy tlenu azotu w neuronach zawierających kalbindynę i parwalbuminę, u osobnika dorosłego i w okresie dojrzewania [240].

1.4. Połączenia przedmurza

Przedmurze jest strukturą posiadającą bogate połączenia, przede wszystkim z wieloma obszarami kory nowej [64, 108, 172, 210, 238, 238, 251, 267, 327, 329, 335, 358, 401, 402, 419, 427-429, 438, 466]. Obecność tych połączeń została po raz pierwszy wykazana metodami zwyrodnieniowymi u kota [334] i królika [64].

Połączenia korowe przedmurza charakteryzują się uporządkowaniem topograficznym, które upoważnia do wyróżnienia w obrębie tej struktury charakterystycznych stref projekcyjnych, związanych między innymi z korą somatosensoryczną [236, 356, 439], ruchową [79, 88, 89, 217], słuchową [194, 267, 344, 356, 359], wzrokową [192, 210, 267, 268, 349, 438] oraz limbiczną [284-286, 290].

Położenie poszczególnych stref w obrębie przedmurza, a także stopień ich wzajemnego nakładania się, są zróżnicowane i charakterystyczne dla poszczególnych gatunków zwierząt [79, 209, 237, 402].

Cechą charakterystyczną połączeń przedmurza z korą nową jest ich dwukierunkowy charakter. Umożliwiło to wprowadzenie pojęcia tzw. przedmurzowo-korowej pętli neuronalnej, określającej związek czynnościowy obu tych struktur [334, 335, 458]. Jak wykazały dotychczasowe badania, neurony wysyłające aksony do kory położone są w przeważającej większości przypadków w tym samym rejonie przedmurza, co zakończenia korowych neuronów projekcyjnych [419]. Projekcja przedmurzowo-korowa osiąga przede wszystkim warstwę IV kory nowej, podczas gdy neurony korowe wysyłające połączenia do przedmurza położone są w warstwach VI i V [233, 419]. Połączenia przedmurzowo-korowe mają charakter ipsi- oraz kontralateralny [277, 312, 348, 402].

Oprócz połączeń z obszarami kory nowej, najbardziej charakterystyczne i istotne czynnościowo są połączenia przedmurza z elementami układu limbicznego [243, 284-286, 290, 480, 482], z prążkowiem [107] oraz ze wzgórzem i podwzgórzem [80, 104, 136, 208, 243, 330, 331, 340, 366, 429, 430].

1.5. Pochodzenie przedmurza

W piśmiennictwie dotyczącym pochodzenia przedmurza występują trzy teorie. Zgodnie z pierwszą z nich przedmurze wywodzi się z tych samych struktur, z których pochodzi kora mózgu [56, 103, 305, 326, 336]. Puellas i wsp. [383] na podstawie analizy porównawczej rozwoju płaszcza korowego (pallium) u gadów, ptaków i ssaków, popartej oceną ekspresji genów występujących w rozwoju przodomózgowia, a także na podstawie analizy połączeń tych

obszarów, wysunęli hipotezę o pochodzeniu przedmurza z brzusznej i bocznej części płaszcza. Zdaniem Striedera, grzbietowa część płaszcza korowego gadów odpowiada korze nowej oraz przedmurzu u ssaków [440]. Obserwowane u gadów zgrubienie grzbietowej części płaszcza korowego jest prawdopodobnie strukturą homologiczną do przedmurza u ssaków. Teoria powyższa, wywodząca przedmurze ze struktur będących zaczątkiem kory mózgu, zyskuje aktualnie największą liczbę zwolenników.

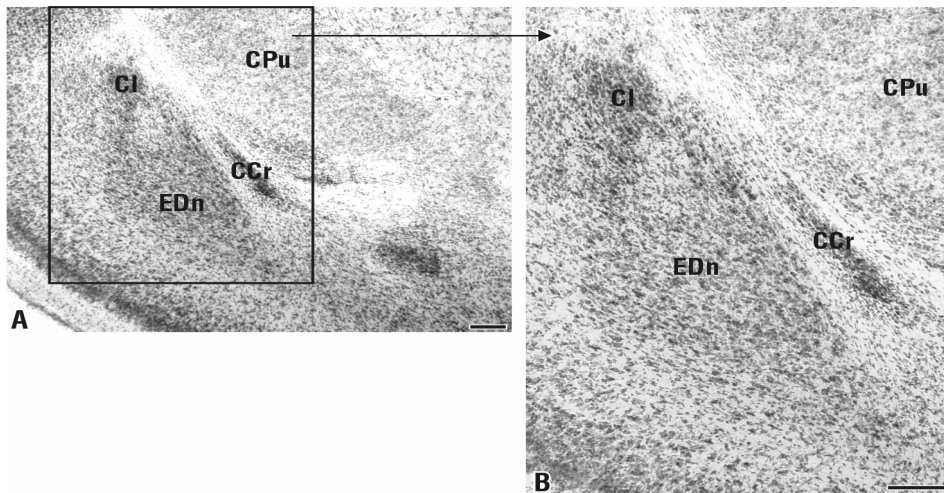
Druga teoria wskazuje na wspólne pochodzenie przedmurza z jądrami kresomózgowia [115, 255]. Zgodnie z nią neurony przedmurza mają wywodzić się z wyniosłości zwojowej.

Zwolennikami trzeciej teorii, mówiącej o mieszanym, korowo-podkorowym pochodzeniu przedmurza są Filimonoff oraz Rose [134, 395, 396].

1.6. Rozwój i dojrzewanie przedmurza

Neurony tworzące przedmurze powstają w neuroepitelium tworzącym korę nową, w okresie od piętnastego do szesnastego dnia życia płodowego szczura [23, 24]. Stosunkowo długi okres powstawania tej populacji komórkowej tłumaczy występowanie gradientu neurogenetycznego, zorientowanego w kierunku poziomym – część tylna przedmurza jest starsza, a część przednia – młodsza [23, 449, 450]. Neurony tworzące przedmurze osiedlają się w ciągu pięciu dni po okresie szczytowej neurogenezy. W tym czasie dochodzi do migracji niedojrzałych jedno- i dwubiegunowych neuronów w tzw. bocznym strumieniu korowym i wnikięcia ich do brzuszno-bocznej części płyty korowej oraz głębokich warstw kory gruszkowatej. Przedmurze staje się widoczne w dwudziestym dniu życia płodowego [23, 278, 279]. W tym czasie część komórek migrujących gromadzi się w tzw. rezerwuarze korowo-przedmurzowym, będącym strukturą przejściową, obecną do końca pierwszego tygodnia życia po urodzeniu (ryc. 3A, B). Jest on swego rodzaju „stacją pośrednią” na drodze migracji do obszarów brzuszno-bocznej części kory i struktur podkorowych, takich jak przedmurze i jądro śródgruszkowe, kora gruszkowata, masy wtrącone ciała migdałowego [278]. Do zaniku tej struktury dochodzi najprawdopodobniej na skutek migracji tworzących ją neuronów oraz śmierci części jej komórek, między innymi na drodze apoptozy.

Po dotarciu neuronów do miejsca docelowego, w przedmurzu dochodzi do wykształcenia drzewa dendrytycznego i ostatecznego ukształtowania perykariotenu, przejawiającego się zwiększeniem objętości cytoplazmy oraz uwidocznieniem tigroidu i neurofibrylli.



Ryc. 3 Rezerwuar korowo-przedmurzowy (CCr) na przekroju czołowym dolnej części półkuli mózgu szczura w grupie P0; widoczne przekroje przedmurza (Cl), jądra śródgruszkowego (EDn), a także prążkownia (CPu; barwienie fioletem krezylowym). Długość skali: A, B = 250 μ m.

Fig. 3 Cortico-claustral reservoir (CCr) on the coronal section of the inferior part of the rat hemisphere at P0; cross-sections of the claustrum (Cl), endopiriform nucleus (EDn) and striatum (CPu; cresyl violet staining). Scale bar: A, B = 250 μ m.

W chwili urodzenia przedmurze jest zbudowane z gęsto ułożonych neuronów. Na tym etapie rozwoju charakteryzują się one zespołem cech właściwych dla populacji dojrzewającej. Są stosunkowo małe, przeważnie okrągłe lub owalne, zawierają niewielką ilość intensywnie wybarwionej cytoplazmy. Ponadto, posiadają stosunkowo duże, dobrze widoczne jądro oraz nieliczne i bardzo krótkie wypustki, o poszerzonych początkowych odcinkach.

Proces dojrzewania przedmurza jest kontynuowany we wczesnym okresie pourodzeniowym. Dotyczy to między innymi zmian morfologicznych neuronów [278]. W ciągu pierwszych dwóch tygodni życia obserwuje się zmniejszenie gęstości neuronalnej, wzrost wielkości pola przekroju neuronów oraz wzrost objętości przedmurza. Ponadto, w przedmurzu obserwuje się zmniejszenie całkowitej liczby neuronów sięgające około 30%, które może być, przynajmniej częściowo, spowodowane apoptozą.

Przeprowadzone dotychczas badania immunocytochemiczne dojrzewających neuronów przedmurza, dotyczyły populacji komórek nerwowych zawierających kwas γ -aminomasłowy, kalbindynę, kalretyninę oraz parwalbuminę u myszy [92], a także syntazę tlenu azotu w neuronach przedmurza myszy i szczura [171, 241].

Populacje neuronów zawierające trzy omawiane białka wiążące wapń w przedmurzu myszy charakteryzują się zróżnicowanym przebiegiem dojrzewania. Neurony zawierające kalbindynę pojawiają się bardzo wcześnie w okresie płodowym (E13-E14) i są najliczniejsze, natomiast po urodzeniu ich liczebność zmniejsza się. Neurony zawierające kalretyninę pojawiają się nieco później (E16-E18), a ich liczebność wzrasta po urodzeniu. Neurony zawierające parwalbuminę pojawiają się w przedmurzu w czwartym dniu po urodzeniu myszy. W okresie postnatalnym ich liczebność wyraźnie wzrasta [92].

Oceniając zmiany zachodzące w populacji neuronów NOS-ir w przedmurzu szczura w okresie pourodzeniowym stwierdzono wzrost ich gęstości numerycznej, z jednoczesnym wzrostem udziału neuronów wielobiegunowych [241]. Cechy morfologiczne, występujące u osobnika dojrzałego, osiągane są w 3 tygodniu po urodzeniu. W przedmurzu myszy w okresie dojrzewania wyróżniono dwie populacje neuronów NOS-ir [171]. Pierwsza z nich należy najprawdopodobniej do interneuronów, druga może odpowiadać populacji neuronów projekcyjnych.

Metodą podwójnego znakowania immunocytochemicznego wykazano w trakcie dojrzewania przedmurza szczura kolokalizację syntazy tlenu azotu z parwalbuminą oraz z kalbindyną [240]. Nie stwierdzono natomiast kolokalizacji syntazy tlenu azotu z kalretyniną. Neurony podwójnie wyznakowane NOS/CB pojawiają się wcześniej (P4), podczas gdy neurony wykazujące kolokalizację NOS/PV są obecne po zakończeniu drugiego tygodnia życia. Populacje neuronów podwójnie znakowanych stają się liczniejsze wraz z wiekiem. Pod względem morfologicznym wszystkie badane populacje odpowiadają neuronom niepiramidowym.

W literaturze brak jest oceny rozwoju połączeń przedmurzowo-korowych w okresie prenatalnym. Można przypuszczać, że rozwój tych połączeń przebiega w sposób podobny do innych znanych tego rodzaju procesów zachodzących w OUN [38, 78, 157, 158, 200, 203, 227, 307, 308, 422]. Można wyróżnić trzy zasadnicze fazy rozwojowe: 1/ wzrostu i wydłużania aksonów, 2/ wytwarzania rozgałęzień oraz 3/ tworzenia zakończeń aksonalnych i wytwarzania połączeń synaptycznych.

Ocena dojrzewania połączeń przedmurzowo-korowych w okresie pourodzeniowym dokonana została u królika [234]. Stwierdzono zmniejszenie intensywności połączeń przedmurzowo-korowych, przejawiające się zmniejszeniem gęstości wyznakowanych neuronów projekcyjnych oraz zmniejszeniem ich całkowitej liczby w trakcie dojrzewania, mogące odzwierciedlać proces dostosowania przedmurza do jego funkcji modulującej w stosunku do kory mózgu.

Jakkolwiek w literaturze brak jest dokładnego opisu zjawiska synaptogenezy w przedmurzu, to jednak można założyć, że kształtowanie synaps przebiega w sposób zbliżony do opisanego w innych strukturach ośrodkowego układu

nerwowego. Wytworzenie pierwszych połączeń synaptycznych przypada na okres poprzedzający urodzenie i wczesny okres pourodzeniowy [47]. Prawidłowe funkcjonowanie układu synaptycznego wymaga osiągnięcia dojrzałości przez wszystkie struktury synaptyczne oraz białka błony synaptycznej i błony pęcherzyka synaptycznego, a wśród nich synaptobrewiny, syntaksyny, synaptotagminy oraz SNAP-25 (ang. *synaptosome-associated protein*) [21, 65, 179, 360, 434, 435]. Białka te biorą udział w przyłączeniu pęcherzyka synaptycznego do błony presynaptycznej, przed uwolnieniem jego zawartości do szczeliny synaptycznej [83, 231, 252, 385, 398, 434]. Ekspresja białka SNAP-25 rozpoczyna się już w okresie życia płodowego i osiąga maksymalny poziom w okresie synaptogenezy i dojrzewania komórek nerwowych, po zakończeniu ich proliferacji i migracji [42, 45, 65, 297]. Zmiany ekspresji tego białka mogą stanowić dobry wyznacznik procesu dojrzewania połączeń pomiędzy strukturami OUN oraz kształtowania synaps.

1.7. Zasadnicze znaczenie czynnościowe przedmurza

Pod względem czynnościowym najistotniejsze wydaje się zaangażowanie przedmurza jako 1/ struktury kontrolującej aktywność licznych obszarów korowych, poprzez system dwukierunkowych połączeń, 2/ struktury biorącej udział w procesach tzw. integracji wielomodalnej, 3/ struktury, której zaburzenia czynności bioelektrycznej są podłożem napadów padaczkowych.

Funkcja przedmurza, jakkolwiek niewyjaśniona do końca, wydaje się być związana z trzema wymienionymi wyżej zagadnieniami.

1.7.1. Funkcja kontrolna w stosunku do kory mózgu

Zgodnie z rosnącą ilością doniesień na temat roli dwukierunkowych połączeń przedmurza z wieloma obszarami korowymi, wydaje się coraz bardziej uzasadnione przyjęcie hipotezy o funkcji tej struktury jako układu kontrolującego w stosunku do licznych obszarów korowych. Zgodnie z tą hipotezą przedmurze działa na zasadzie sprzężenia zwrotnego w stosunku do obszarów korowych, stanowiąc jednocześnie rodzaj filtra ograniczającego przepływ informacji przez odpowiednie obszary korowe.

Neurony przedmurza reagują w sposób nieselektywny na różne formy aktywności ruchowej [423]. Zachodzące w ten sposób pobudzenie dużej populacji neuronów przedmurza może za pośrednictwem połączeń przedmurzowo-korowych wywierać efekt hamujący na wielkość pobudzenia neuronów ruchowych kory mózgu. Podobnie, po pobudzeniu kory wzrokowej, dochodzi do aktywacji neuronów wzrokowej strefy projekcyjnej przedmurza i ich

oddziaływania wstecznego na neurony tej kory [267, 421]. Charakter tego oddziaływania może być hamujący [419] lub pobudzający [458].

Zgodnie z coraz liczniejszymi wynikami badań, można stwierdzić, że połączenia przedmurzowo-korowe w swej większości mają charakter pobudzający. Świadczą o tym wyniki skojarzonych badań immunocytochemicznych oraz przeprowadzonych przy pomocy wstecznego transportu aksonalnego, które nie wykazały w neuronach projekcyjnych obecności typowych markerów neuronów hamujących, jak białka wiążące wapń, czy neuropeptydy. Wykazano w nich natomiast obecność glutaminianu i asparaginianu [377]. Sugeruje to, że w przeciwieństwie do dawniej rozpowszechnionych poglądów [419], bezpośrednio działanie projekcji przedmurzowej na neurony korowe ma charakter pobudzający, a efekt hamowania musi być osiągnięty za pośrednictwem włączonych w ten układ hamujących interneuronów korowych [458].

1.7.2. Udział przedmurza w tzw. integracji wielomodalnej

Wzrastająca w ciągu ostatnich kilku lat liczba publikacji wskazuje na rolę przedmurza w procesie tzw. integracji wielomodalnej [19, 61, 63, 85, 126]. Zjawisko to polega na zaangażowaniu populacji neuronalnej przedmurza w procesach pobudzenia licznych ośrodków związanych z percepcją określonych form informacji czuciowej, bądź ruchowej, a nawet wzrokowych bodźców seksualnych [388]. Szczególne znaczenie ma aktywacja neuronów przedmurza informacjami o charakterze sensorycznym – dotykowym, wzrokowym i słuchowym [19, 63, 175], a także pobudzenie na skutek aktywacji określonych obszarów związanych z funkcją ruchową. Zaangażowanie przedmurza w integracji wielomodalnej jest zrozumiałe biorąc pod uwagę występowanie licznych połączeń przede wszystkim ze strukturami korowymi [79, 310, 312, 329, 402, 419, 428]. Obecność odpowiednich stref projekcyjnych łączących się z tymi obszarami została wykazana u bardzo wielu gatunków ssaków, w tym u człowieka [325, 328]. Charakterystyczny dla poszczególnych gatunków sposób nakładania się stref projekcyjnych, a także połączenia pojedynczych neuronów przedmurza z kilkoma obszarami korowymi jednocześnie, wykazane u niektórych gatunków [277, 311, 312], tłumaczą anatomiczne uwarunkowania umożliwiające zaangażowanie przedmurza w procesie integracji wielomodalnej.

1.7.3. Udział przedmurza w rozprzestrzenianiu pobudzeń padaczkowych

Przedmurze może spełniać funkcje struktury pośredniczącej w przekazywaniu i rozprzestrzenianiu czynności napadowej ze struktur układu limbicznego do rozległych obszarów korowych [250, 314, 315, 474]. Odgrywa ono istotną rolę zarówno w procesie tzw. kindlingu, jak i w rozprzestrzenianiu nieprawidłowych pobudzeń powstałych na skutek kindlingu w ciele migdałowatym [418, 474]. Proces kindlingu w przedmurzu prowadzi do rozwoju uogólnionych, klonicznych napadów padaczkowych [314, 315]. Dzięki rozległym połączeniom mogą być one szybko rozprzestrzenione. Uważa się, że przedmurze jest jednym z najważniejszych elementów łączących struktury układu limbicznego z korowymi obszarami odpowiedzialnymi za uogólnienie czynności padaczkowej.

2. CELE PRACY

Przedmurze jest strukturą związaną z wieloma obszarami korowymi systemem bogatych dwukierunkowych połączeń. Obok neuronów projekcyjnych, populacja neuronów przedmurza utworzona jest także z bardzo zróżnicowanej pod względem cech morfologicznych oraz charakterystyki immunocytochemicznej subpopulacji interneuronów. Neurony te uzupełniają pętlę przedmurzowokorową, zapewniając możliwości modyfikowania i integrowania funkcji neuronów projekcyjnych. Działanie to jest możliwe dzięki prawidłowemu funkcjonowaniu układu synaptycznego między dwiema wymienionymi populacjami komórek nerwowych. Dojrzałe funkcjonowanie przedmurza jest więc możliwe po osiągnięciu dojrzałości czynnościowej przez: populację interneuronów, populację neuronów projekcyjnych, układ synaptyczny.

Większość danych dotyczących budowy i funkcjonowania przedmurza oparta jest na wynikach badań przeprowadzonych u osobników dojrzałych wielu gatunków ssaków. Zagadnienia rozwoju i dojrzewania populacji komórkowych przedmurza wyjaśnione zostały dotychczas jedynie fragmentarycznie. Uzasadnia to próbę prześledzenia zmian morfologicznych zachodzących w przedmurzu w okresie pierwszych czterech miesięcy życia szczura. Podjęte badania mają na celu ocenę zjawisk zachodzących w: 1/ populacji interneuronów zawierających wybrane neuromodulatory (neuropeptyd Y, somatostatynę, wazoaktywny peptyd jelitowy oraz tlenek azotu) oraz białka wiążące wapń (kalbindynę D28k, kalretyninę, parwalbuminę), występujące pojedynczo, jak i w odpowiednich kolokalizacjach, 2/ populacji neuronów projekcyjnych przedmurza, związanych z korą somatosensoryczną, 3/ układzie synaptycznym.

W związku z tym celem pracy jest próba uzyskania odpowiedzi na następujące pytania:

1. W jakim stopniu przedmurze w chwili urodzenia jest strukturą ukształtowaną pod względem cech morfologicznych tworzących je populacji komórkowych oraz ukształtowania neuropilu?
2. Które z obserwowanych zmian w badanych populacjach komórkowych są kontynuacją procesów zapoczątkowanych w okresie przedurodzeniowym, a które pojawiają się w okresie pourodzeniowym?
3. Czy wśród badanych populacji komórkowych, zróżnicowanych pod względem charakterystyki immunocytochemicznej, można wskazać różnice w dynamice dojrzewania w okresie postnatalnym?

-
4. Czy wśród badanych populacji neuronalnych można wskazać typy wyróżniające się współwystępowaniem (kolokalizacją) określonych substancji?
 5. Czy w okresie obserwacji można stwierdzić występowanie zmian jakościowych i ilościowych w populacji neuronów projekcyjnych przedmurza?
 6. Czy na podstawie oceny charakteru zachodzących zmian w badanych populacjach komórkowych w okresie pourodzeniowym można określić moment osiągnięcia dojrzałości morfologicznej przez badaną strukturę?

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. Materiał

Materiał badawczy stanowiła grupa 245 szczurów rasy Wistar, obojga płci, pochodzących z hodowli Instytutu Medycyny Pracy w Łodzi. Zastosowana 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 [57]. Ponadto, projekt badań uzyskał akceptację lokalnej Komisji do Spraw Etyki. Badane zwierzęta podzielono na grupy wiekowe liczące od 5 do 7 sztuk. Do celów badań immunocytochemicznych wyodrębniono grupy wiekowe: P0, P7, P14, P21, P28, P60, P90, P120 (P – dzień życia zwierzęcia). W części badań opartych na metodzie wstecznego transportu aksonalnego zwierzęta podzielono na grupy wiekowe: P7, P14, P21, P45, P90. Badania zawartości białka synaptycznego SNAP-25 metodą Western Blotting przeprowadzono w grupach wiekowych: P0, P2, P7, P10, P14, P21, P28, P60, P120.

3.2. Metody

3.2.1. Metody immunocytochemiczne

Utrwalanie materiału

Szczury znieczulano głęboko przy pomocy podawanego dootrzewnowo pentobarbitalu sodowego (Nembutal, w dawce 60 mg/kg wagi ciała), następnie perfundowano przezsercowo 0,9% roztworem NaCl (od 50 do 250 ml, w zależności od wieku) z dodatkiem 5000 j.m. heparyny, a następnie utrwalano 4% roztworem paraformaldehydu w buforze fosforanowym (PBS, pH 7,4) w ilości od 100 do 500 ml, w zależności od wieku. Po dekapitacji i wydobyciu z czaszki, mózgowia umieszczano na okres 2 godzin w roztworze utrwalacza, a następnie kolejno w 15% i 30% roztworze sacharozy w 0,1 M roztworze buforu fosforanowego, przez 24 godziny. Następnie mózgowia cięto w płaszczyźnie czołowej na skrawki o grubości 30 µm na kryostacie Jung CM1800 (Leica, Niemcy).

Barwienia immunocytochemiczne

Skrawki płukano w 0,01 M roztworze buforu fosforanowego (PBS) i inkubowano przez 1 godzinę w mieszaninie zawierającej: 0,1% roztwór albuminy w surowicy wołowej (Sigma Chemical Company, USA), 10% roztwór surowicy koziej (Jackson ImmunoResearch, USA), 0,01% roztwór azydku sodowego oraz

0,05% roztwór thimerosalu. Skrawki inkubowano z przeciwciałami przeciw: neuropeptydowi Y, somatostatynie, wazoaktywnemu peptydowi jelitowemu lub przeciw białkom wiążącym wapń: kalbindynie D28k, parwalbuminie lub kalretyninie przez noc w temperaturze pokojowej. Ponadto, w barwieniach podwójnych użyto przeciwciała przeciw neuronalnej formie syntazy tlenu azotu. Specyfikację użytych przeciwciał przedstawiono w tabeli (tab. 1). Następnie po wypłukaniu skrawków w 0,01 M roztworze PBS, inkubowano je z przeciwciałem wtórnym sprzężonym z fitocyjaniną (FITC) lub indokarbocyaniną (Cy³) przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Po wypłukaniu skrawków w 0,01 M roztworze PBS, umieszczano je na szkiełkach podstawowych i po wysuszeniu przykrywano szkiełkami nakrywkowymi, stosując Vectasheld (Vector Laboratories, Inc., USA).

Tab. 1. Przeciwciała pierwotne i wtórne użyte do badań.
Tab. 1. Primary and secondary antibodies used in the study.

Przeciwciało <i>Antibody</i>	Rozcieńczenie <i>Concentration</i>	Producent <i>Manufacturer</i>
<i>Rabbit polyclonal antibody to Neuropeptide tyrosine (NPY)</i>	1:500	Affiniti, W. Brytania
<i>Anti-Somatostatin polyclonal antibody (rabbit)</i>	1:500	Euro-Diagnostica AB, Szwecja
<i>Vasoactive Intestinal Peptide (Anti-VIP) Polyclonal Antibody (rabbit)</i>	1:800	Cappel, ICN Pharmaceuticals, Inc., USA
<i>Monoclonal Anti-Calbindin-D28k, Clone CB-955 (mouse)</i>	1:1000	Sigma Chemical Company, USA
<i>Goat Anti-Calretinin Polyclonal Antibody</i>	1:1000	Chemicon International, USA
<i>Monoclonal Anti-Parvalbumin Clone Parv-19 (mouse)</i>	1:1000	Sigma-Aldrich Inc., USA
<i>Monoclonal Anti-Nitric Oxide Synthase-Brain (bNOS) Clone NOS-B1 (mouse)*</i>	1:500	Sigma Chemical Company, USA
<i>Cy3-conjugated goat anti-rabbit, goat anti-mouse, donkey anti-goat Antibodies</i>	1:800	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., USA
<i>Fluorescein (FITC)-conjugated goat anti-rabbit, goat anti-mouse, donkey anti-goat Antibodies</i>	1:800	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., USA

* używano jedynie w barwieniach podwójnych, w celu oceny kolokalizacji

W celu wykazania kolokalizacji wybranych neuropeptydów z białkami wiążącymi wapń lub syntazą tlenu azotu skrawki inkubowano z mieszaniną odpowiednich przeciwciał w tych samych stężeniach jak w barwieniach pojedynczych.

Kontrola swoistości reakcji

W celu sprawdzenia swoistości reakcji immunocytochemicznej, skrawki poddawano opisanej wyżej procedurze immunocytochemicznej, z pominięciem inkubacji z pierwotnym lub wtórnym przeciwciałem. W przypadku barwień podwójnych, w celu wykluczenia reakcji krzyżowej pomiędzy użytymi w mieszaninie przeciwciałami pierwotnymi, a nieodpowiadającymi im przeciwciałami wtórnymi, stosowano pominięcie jednego z przeciwciał pierwotnych. Wszystkie próby potwierdziły swoistość reakcji immunocytochemicznych.

3.2.2. Metody oparte na wstecznym transporcie aksonalnym

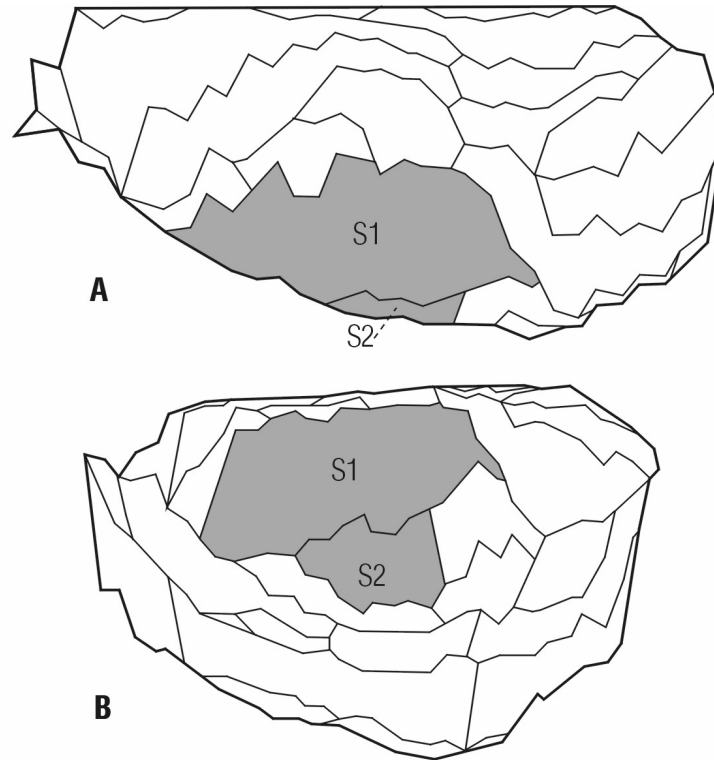
Procedura operacyjna podania znacznika fluorescencyjnego oraz przygotowanie preparatów

Zwierzęta znieczulano mieszaniną ketaminy (Ketanest, 20 mg/kg wagi ciała) i ksylazyny (Sedazin, 3 mg/kg wagi ciała) w stosunku objętościowym 7:1 w dawce 1 ml/kg wagi ciała. Zwierzęta umieszczano w aparacie stereotaktycznym. W warunkach aseptycznych nacinano skórę i odsłaniano powierzchnię kości czaszki w okolicy ciemieniowej. Następnie po nawierceniu otworu trepanacyjnego nacinano oponę twardą i odsłaniano powierzchnię kory mózgu. Po wyznaczeniu współrzędnych na podstawie atlasów stereotaktycznych [374, 375] umieszczano szklaną mikrokapilarę w korze okolicy somatosensorycznej na głębokości do 1,5 mm (ryc. 4, ryc. 32A). Następnie podawano 3% wodny roztwór znacznika fluorescencyjnego Fluoro-Gold (Fluorochrome Inc., USA) przy pomocy strzykawki Hamiltona, umieszczonej w automatycznej pompie do mikroiniekcji, połączonej z mikrokapilarą drenem polietylenowym (World Precision Instruments; Niemcy).

Weryfikacji prawidłowego położenia mikrokapilary i miejsca iniekcji w korze somatosensorycznej dokonywano oceniając budowę cytoarchitektoniczną kory [500, 501], a także sprawdzając obecność wyznakowanych wstecznie neuronów we właściwych jądrach wzgórza. U każdego ze zwierząt podano 2 µl roztworu znacznika. Czas podania wynosił 10 minut. Po zakończeniu iniekcji mikrokapilarę pozostawiano na miejscu przez 5 minut w celu ograniczenia wycieku znacznika przez miejsce uszkodzenia kory mózgu. Po usunięciu mikrokapilary i opanowaniu krwawienia ranę operacyjną zamykano szwem ciągłym, w warunkach aseptycznych. Po operacji zwierzęta pozostawiano w warunkach swobod-

nego dostępu do pożywienia i wody przez okres 7 dni, a następnie dokonywano perfuzji przezsercowej, zgodnie z uprzednio opisaną procedurą. Mózgowia po wyjęciu z czaszek utrwalano dodatkowo zanurzając na dwie godziny w 4% roztworze paraformaldehydu, a następnie odwadniano kolejno w 15% i 30% roztworze sacharozy w 0,1 M roztworze buforu fosforanowego przez 24 godziny.

Mózgowia krojono seryjnie w płaszczyźnie czołowej na skrawki o grubości 40 μm na kryostacie, układano na szkiełkach podstawowych i suszono. Co 10 skrawek barwiono fioletem krezyłowym.



Ryc. 4 Podział pól korowych u szczura; powierzchnia grzbietowa (A) oraz boczna (B) półkuli mózgu, z zaznaczonymi obszarami pierwszorzędowej (S1) i drugorzędowej (S2) kory somatosensorycznej (wzorowane na: Zilles K. et al. 1980).

Fig. 4 Division of the cortical areas in the rat; dorsal (A) and lateral (B) surfaces of the cerebral hemisphere, with marked primary (S1) and secondary (S2) somatosensory cortical areas (adapted from: Zilles K. et al. 1980).

3.2.3. Badania jakościowe i ilościowe

Przedmiotem oceny jakościowej oraz ilościowej były wybrane parametry morfologiczne, charakteryzujące populacje neuronów pojedynczo znakowanych oraz wykazujących kolokalizację w barwieniach immunocytochemicznych. W każdej z badanych populacji neuronów, pojedynczo- lub podwójnie znakowanych, oceniano takie cechy morfologiczne jak: stosunek wielkości cytoplazmy do wielkości jądra komórkowego, ukształtowanie początkowych odcinków dendrytów i aksonów oraz biegunowość neuronów. Ponadto, oceniano wybrane parametry morfologiczne neuropilu, jak: gęstość oraz intensywność jego znakowania, obecność żyłakowatości i punktów immunoreaktywnych oraz wyznakowanych rozgałęzień. W przypadku kolokalizacji, te same cechy oceniano w odniesieniu do podwójnie wyznakowanych składników neuropilu.

O dojrzałości morfologicznej neuronów świadczą: zwiększenie względnej objętości cytoplazmy w stosunku do objętości jądra komórkowego, pojawienie się wysmukłych, początkowych odcinków włókien nerwowych, zmniejszenie udziału neuronów jednobiegunowych w całej badanej populacji. W przypadku oceny neuropilu, cechami świadczącymi o jego dojrzeniu są: zwiększająca się gęstość oraz intensywność znakowania, pojawienie się lub zwiększenie ilości żyłakowatości oraz punktów immunoreaktywnych, pojawienie się lub zwiększenie ilości wyznakowanych miejsc podziału włókien nerwowych.

W celu dokonania porównywalnej oceny ilościowej poszczególnych populacji neuronalnych przyjęto przedstawione poniżej kryteria. W przypadku oceny biegunowości neuronów rozróżniono typy morfologiczne komórek: jednobiegunowych (w tabelach oznaczone cyfrą 1), dwubiegunowych (oznaczone cyfrą 2) oraz wielobiegunowych (oznaczone cyfrą 3). Oceniając gęstość neuropilu, stwierdzano: jego całkowity brak (–), niską gęstość (+) lub obecność dobrze rozwiniętego neuropilu (++) . Oceniając intensywność znakowania neuropilu stwierdzano: słabą intensywność (+) lub dużą intensywność znakowania (++) . W przypadku oceny żyłakowatości i punktów immunoreaktywnych, a także wyznakowanych rozgałęzień, wyróżniono ich brak (–) lub obecność (+). Oceniając kolokalizację badanych substancji w ciałach neuronów stwierdzano jej brak (–) lub obecność (+).

W przypadku neuronów wyznakowanych metodą wstecznego transportu aksonalnego oceniano położenie strefy projekcyjnej w przedmurzu oraz cechy morfologiczne dojrzewających neuronów.

Ocenę jakościową wyznakowanych wstecznie neuronów w przedmurzu, a także wstępną ocenę jakościową preparatów barwionych immunocytochemicznie, przeprowadzono przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego Olympus B-X51 (Olympus, Japonia).

Zasadniczej oceny preparatów barwionych immunocytochemicznie dokonano używając mikroskopu fluorescencyjnego Eclipse E600 (Nikon, Japonia), współpracującego z systemem konfokalnym MicroRadiance (Bio-Rad, W. Brytania), wyposażonym w laser argonowy – Argon Ion (25 mW). Laser ten przy zastosowaniu odpowiednich filtrów emituje światło monochromatyczne o długości fali 514 nm, wzbudzające znacznik Cy³ lub o długości fali 488 nm wzbudzające znacznik FITC. Dokumentacja materiału w postaci zdjęć została wykonana przy pomocy systemu LaserSharp 2000 v. 2.1 (Bio-Rad; W. Brytania) i programu graficznego LaserPix v. 4.0 (Bio-Rad; W. Brytania). Kontrola selektywności wzbudzenia znaczników wykazała pozytywny wynik.

3.2.4. Metody morfometryczne

Charakterystyka badanych parametrów

Badania morfometryczne dotyczyły zarówno populacji interneuronów wyznakowanych metodą immunocytochemiczną, jak i populacji neuronów projekcyjnych, znakowanych metodą wstecznego transportu aksonalnego.

Ocenę ilościową przeprowadzono stosując obiektywne metody morfometryczne. Analiza ilościowa w przypadku pojedynczych barwień immunocytochemicznych obejmowała ocenę: 1/ rozkładu kształtów neuronów, 2/ gęstości numerycznej, 3/ wielkości pól przekroju neuronów.

Badania ilościowe populacji neuronów podwójnie znakowanych immunocytochemicznie dotyczyły oceny: 1/ rozkładu kształtów neuronów, 2/ współczynnika kolokalizacji, będącego stosunkiem liczby podwójnie wyznakowanych neuronów do wszystkich wyznakowanych neuronów w danej kombinacji barwień, 3/ stosunku liczby podwójnie wyznakowanych neuronów do pojedynczo wyznakowanych neuronów w danej kombinacji barwień, 4/ wielkości pól przekroju neuronów.

Badania ilościowe neuronów projekcyjnych, znakowanych metodą wstecznego transportu aksonalnego we wszystkich grupach wiekowych obejmowały ocenę: 1/ rozkładu wyznakowanych neuronów w obrębie strefy projekcyjnej, 2/ rozkładu kształtów neuronów, 3/ gęstości numerycznej.

Ocena rozkładu kształtów neuronów wyznakowanych immunocytochemicznie oraz metodą wstecznego transportu aksonalnego

Ocenę rozkładu kształtów neuronów przeprowadzono wykorzystując skrawki pochodzące z przedniej, środkowej i tylnej części przedmurza. W tym celu wybrano skrawki, na których pojawiały się odpowiednio przekroje: spoidła wielkiego, spoidła przedniego i hipokampa. U osobnika dorosłego odpowiadają

one przekrojom mózgowia na poziomach wyznaczonych w stosunku do punktu bregma (B): B + 1,6 mm, B – 0,26 mm, B – 1,6 mm (ryc. 5) [375].

Po wyznaczeniu granic przedmurza w powiększeniu 4x, zmieniano wielkość powiększenia na 40x i liczone komórki nerwowe o danym kształcie. W populacji interneuronów oraz neuronów projekcyjnych, rozróżniono pięć typów kształtów komórek: wrzecionowate, owalne, okrągłe, trójkątne, wieloboczne. W każdym przypadku analizowano populację zawierającą przynajmniej 100 neuronów. Procedurę tę stosowano zarówno w przypadku barwień pojedynczych jak i podwójnych.

Badania przeprowadzono używając systemu do analizy stereologicznej (C.A.S.T. Grid system; Olympus, Dania). W celu uzupełnienia oceny morfologicznej rozróżniono dodatkowo neurony jedno-, dwu- i wielobiegunowe, chociaż ten podział nie został poddany ocenie ilościowej.

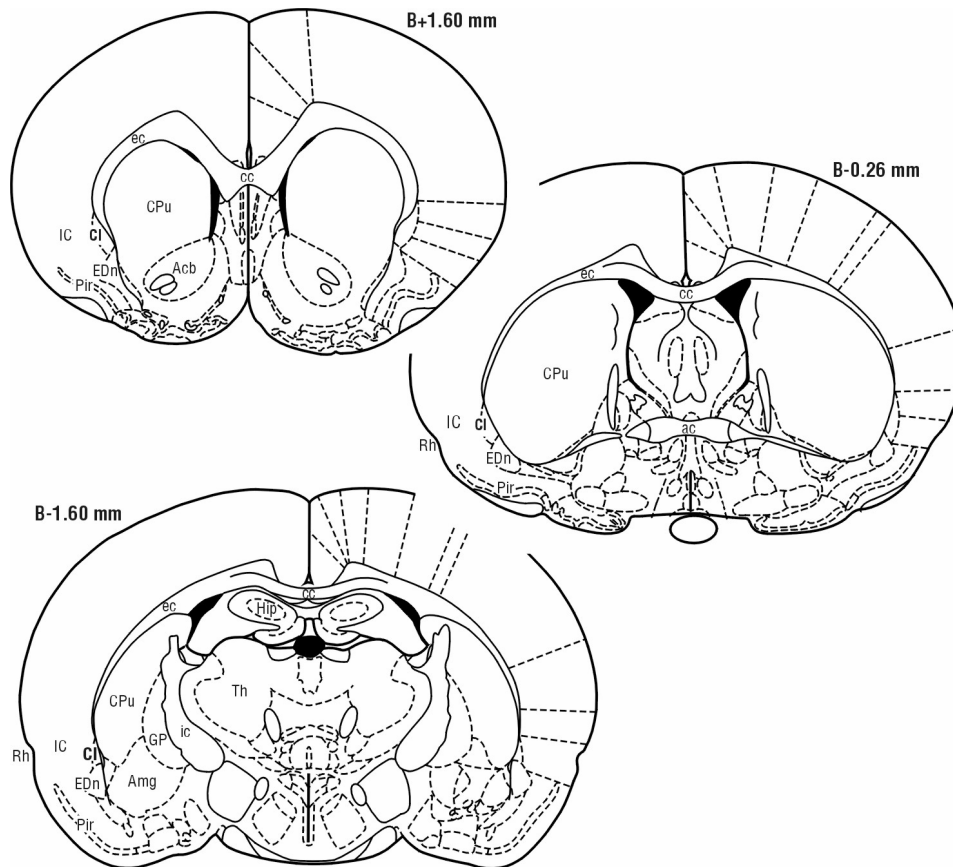
Ocena gęstości numerycznej neuronów znakowanych immunocytochemicznie oraz metodą wstecznego transportu aksonalnego

Oceny gęstości neuronów dokonano na skrawkach zawierających przekroje przedmurza w części przedniej, środkowej i tylnej, ciętych w płaszczyźnie czołowej, używając systemu do analizy stereologicznej (C.A.S.T. Grid system; Olympus, Dania), wraz z oprogramowaniem, zainstalowanego na komputerze współpracującym z mikroskopem BX-51 (Olympus, Japonia).

Po wyznaczeniu granic obszaru zajętego przez przedmurze w powiększeniu 4x, zmieniano wielkość powiększenia na 40x i stosując systematyczne losowe próbkowanie, przeprowadzano procedurę liczenia wyznakowanych ciał neuronów w ramce próbkującej, której położenie zmieniano automatycznie, ruchem meandrowym pokrywając stały dla wszystkich skrawków odsetek powierzchni przekroju przedmurza.

Ocena pól przekroju neuronów wyznakowanych immunocytochemicznie

Oceny pól przekroju neuronów znakowanych metodą pojedynczych i podwójnych barwień immunocytochemicznych dokonano przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego Eclipse E600 (Nikon, Japonia), współpracującego z systemem konfokalnym MicroRadiance (Bio-Rad, W. Brytania). W powiększeniu 60x oceniano pola powierzchni przekroju neuronów stosując oprogramowanie LaserPix v. 4.0 (Bio-Rad; W. Brytania). Wyznakowane neurony pochodziły z przedniej, środkowej oraz tylnej części przedmurza. W każdym przypadku pomiarów dokonano na populacji liczniejszej niż 100 neuronów.



Ryc. 5 Przekroje czołowe półkuli mózgu szczura zawierające odpowiednio przednią, środkową oraz tylną część przedmurza; odległość w stosunku do punktu bregma (B) wyrażona została w milimetrach; skróty: ac - spoidło przednie, Acb - jądro półleżące, Amg - ciało migdałowate, cc - spoidło wielkie, Cl - przedmurze, CPu - prążkowie, ec - torebka zewnętrzna, EDn - jądro śródgruszkowe, GP - galka biała, Hip - hipokamp, IC - kora wyspowa, ic - torebka wewnętrzna, Pir - kora gruszkowata, Rh - bruzda węchowa, Th - wzgórze (wzorowane na: Paxinos G. i Watson C. 1997).

Fig. 5 Coronal sections of the cerebral hemisphere of the rat with anterior, middle and posterior parts of the claustrum; distance from the bregma (B) is given in mm; abbreviations: ac - anterior commissure, Acb - nucleus accumbens, Amg - amygdaloid body, cc - corpus callosum, Cl - claustrum, CPu - striatum, ec - external capsule, EDn - endopiriform nucleus, GP - globus pallidus, Hip - hippocampus, IC - insular cortex, ic - internal capsule, Pir - piriform cortex, Rh - rhinal fissure, Th - thalamus (adapted from: Paxinos G. and Watson C. 1997).

3.2.5. Ocena zawartości białka SNAP-25 metodą „Western blotting”

W celu uzyskania tkanki nerwowej zwierzęta uśmiercano letalną dawką Nembutalu (60 mg/kg wagi ciała), a następnie wydobywano mózgowia i krojono je w płaszczyźnie czołowej na skrawki grubości 3–4 mm. Pod mikroskopem preparacyjnym w powiększeniu 12x izolowano tkankę nerwową z okolicy przedmurza i zamrażano do temperatury -80°C w celu przechowania. Następnie po rozmrożeniu, przygotowaną tkankę homogenizowano w buforze z dodatkiem inhibitorów proteaz. Stężenie całkowite wyizolowanego białka oznaczano metodą Lowry’ego.

Do studzienek żelu poliakrylamidowego nakładano próbki o takim samym stężeniu całkowitym białka. Po rozdziale elektroforetycznym białka przenoszono z żelu na błonę nitrocelulozową za pomocą transferu półsuchego. Prawidłowość transferu białek sprawdzano poprzez odwracalne barwienie membrany Ponceau S. Niespecyficzne miejsca wiązania białek na błonie nitrocelulozowej blokowano przez inkubację w roztworze odtłuszczonego mleka. Następnie membranę inkubowano przez noc z mysimi monoklonalnymi przeciwciałami pierwotnymi przeciwko szczurzemu SNAP-25 (Chemicon International, USA) w rozcieńczeniu 1:1000. Po przemyciu membranę inkubowano z wtórnymi przeciwciałami króliczymi przeciwko przeciwciałom mysim sprzężonymi z peroksydazą chrzanową (Sigma, USA), w rozcieńczeniu 1:40000. Do uwidocznienia prążków na kliszy autoradiograficznej używano chemiluminescencyjnego substratu dla peroksydazy chrzanowej (Pierce, USA). Po analizie wyników, przeciwciała usuwano z membrany (Restore Stripping Buffer, Pierce, USA).

Całą procedurę immunoblotingu i detekcji chemiluminescencyjnej powtarzano dla białka referencyjnego β -aktyny z innym zestawem przeciwciał. Jako przeciwciała pierwotne stosowano monoklonalne przeciwciała mysie przeciwko szczurzemu białku β -aktyny (Sigma, USA) w rozcieńczeniu 1:5000, natomiast jako przeciwciała wtórne użyto przeciwciała królicze przeciwko przeciwciałom mysim sprzężone z peroksydazą chrzanową (Sigma, USA) w rozcieńczeniu 1:40000.

W celu dokonania oceny ilościowej uzyskanych wyników klisze autoradiograficzne skanowano, a uzyskane obrazy poddano ocenie densytometrycznej przy pomocy programu LaserPix v. 4.0 (Bio-Rad; W. Brytania).

3.2.6. Ocena statystyczna wyników

Dane dotyczące liczebności komórek w polach testowych, liczebności komórek należących do poszczególnych typów morfologicznych, lub parametrów morfologicznych neuronów zostały wprowadzone do arkusza kalkulacyjnego, gdzie dla każdego zwierzęcia obliczono średnie charakteryzujące dane populacje

neuronów, oraz sumaryczne liczby komórek w określonych przedziałach klasowych.

Analizie statystycznej zostały poddane: 1/ dane zawierające średnie wartości parametrów morfometrycznych oraz 2/ uśrednione (w danej grupie wiekowej) rozkłady liczby komórek w określonych przedziałach klasowych. Ze względu na charakter analizowanych zjawisk oraz często występujące duże różnice pomiędzy wielkościami badanych parametrów wykonano analizy metodami nieparametrycznymi, niewymagającymi spełnienia założeń normalności rozkładów oraz równości odchyłeń standardowych.

Wykonano dwie grupy analiz statystycznych. Pierwsza grupa dotyczyła analizy istotności zmian zachodzących w szeregach czasowych (pomiędzy badanymi grupami zwierząt). Druga grupa analiz koncentrowała się na różnicach pomiędzy badanymi subpopulacjami neuronalnymi przedmurza, dotycząc ogólnej ich charakterystyki (pomiędzy badanymi populacjami neuronalnymi).

Dane dotyczące liczebności komórek w poszczególnych przedziałach klasowych porównywano testem Chi kwadrat. Częstości występowania poszczególnych kolokalizacji porównano testem Q dla frakcji.

Dane dotyczące parametrów morfometrycznych komórek (gęstość, wielkość) porównywano nieparametryczną analizą wariancji (testem Kruskala-Wallisa), lub też, szczególnie dla oceny tendencji określonych zjawisk, wykonywano test Jonckheera.

W większości badanych testów nie wykonywano tzw. testów niezaplanowanych dla wskazania szczegółowych różnic pomiędzy wszystkimi badanymi grupami. Zdecydowano się bowiem ograniczyć analizy do wskazania najbardziej istotnych dla danego parametru tendencji i zmian.

Wszystkie analizy statystyczne wykonano w programie Statistica v. 6.0 (Statsoft, Polska) oraz w arkuszu kalkulacyjnym z wykorzystaniem uprzednio przygotowanych procedur obliczeniowych, które zostały zaczerpnięte z piśmiennictwa [496]. We wszystkich analizach przyjęto poziom istotności $p < 0,05$.

Po wykonaniu analiz statystycznych ostateczne dane dotyczące średnich i odchyłeń standardowych wartości badanych parametrów w grupach wiekowych oraz liczebności w poszczególnych przedziałach klasowych posłużyły do wykonania tabel i wykresów.

4. WYNIKI

4.1. Ocena morfologiczna dojrzewania populacji neuronów zawierających neuropeptydy w przedmurzu

4.1.1. Neuropeptyd Y

Neurony zawierające neuropeptyd Y

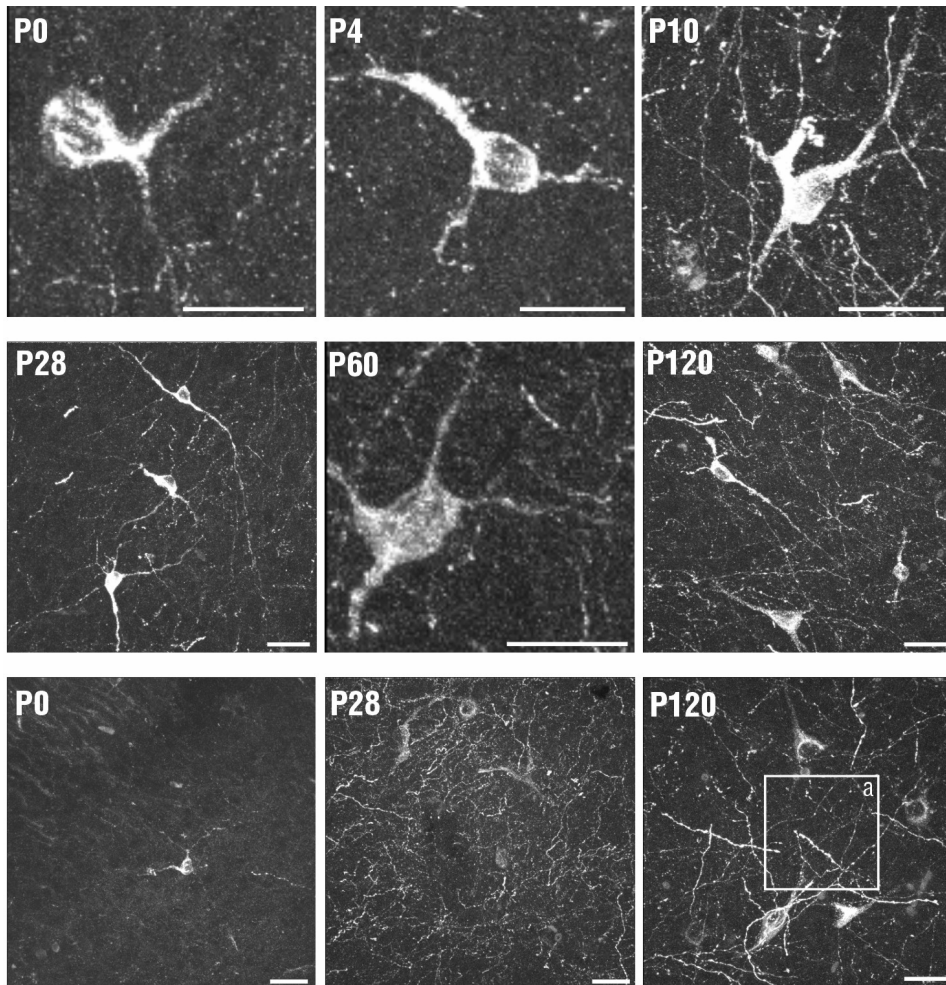
Neurony NPY-ir widoczne są w całym badanym okresie. W pierwszym tygodniu są to przeważnie neurony o stosunkowo niewielkiej objętości cytoplazmy, z nielicznymi, poszerzonymi w początkowych częściach wypustkami (ryc. 6). Po upływie czterech tygodni życia zwiększa się objętość cytoplazmy oraz liczba wypustek odchodzących od ciała neuronu.

W najmłodszej grupie wiekowej spotyka się przeważnie neurony jedno- i dwubiegunowe (tab. 2). W grupach wiekowych P4 – P21, występują neurony o różnych typach morfologicznych – od jedno- do wielobiegunowych. Udział poszczególnych typów jest zróżnicowany, w zależności od wieku. Po upływie pierwszego miesiąca życia dominują neurony wielo- i dwubiegunowe. Ich przewaga utrzymuje się do końca okresu obserwacji. Od ciała neuronów odchodzi zazwyczaj od 2 do 5 dendrytów, dzielących się dychotomicznie w dalszych odcinkach swego przebiegu.

Ocena kształtów ciał komórek nerwowych wskazuje, że w grupie P0 występują przeważnie neurony owalne i wrzecionowate (ryc. 7A). Wszystkie posiadają krótkie odcinki wyznakowanych wypustek. W grupie P4 zwiększa się udział neuronów wielobocznych, a mniej jest komórek o kształcie wrzecionowatym. Widoczne są dłuższe odcinki wyznakowanych wypustek. W kolejnych grupach wiekowych dominują komórki o ciałach owalnych lub wrzecionowatych, najczęściej o intensywnym zabarwieniu.

Ocena gęstości numerycznej neuronów NPY-ir wykazuje wzrost w ciągu pierwszych dwóch tygodni życia (ryc. 7B). Następnie, zaznacza się stabilizacja gęstości neuronów, utrzymująca się do końca okresu obserwacji. Średnia wartość gęstości numerycznej w tej populacji w całym badanym okresie wynosi 48 ± 13 neuronów na mm^2 .

Średnie wielkości pól przekrojów neuronów NPY-ir wzrastają w ciągu dwóch tygodni po urodzeniu (ryc. 7C). W dalszym okresie obserwacji nie wykazują one istotnych różnic. Średnia wartość pola przekroju neuronu w tej populacji, w całym badanym okresie wynosi $147,8 \pm 47,1 \mu\text{m}^2$.



Ryc. 6 Ciała komórek nerwowych (rzęd górny i środkowy) oraz neuropil (rzęd dolny) zawierające NPY (NPY-ir) w przedmurzu szczura; neurony jedno- i dwubiegunowe o ciałach owalnych i wrzecionowatych (grupy P0 i P4); neurony wielobiegunowe, o dużej różnorodności kształtów (grupy P10-P120); wzrost gęstości i intensywność znakowania neuropilu NPY-ir w okresie obserwacji (grupy P0-P120); NPY-ir włókna na powierzchni niewyznakowanych komórek (P120a). Długość skali = 20 μm .

Fig. 6 NPY-ir neuronal cell bodies (superior and middle rows) and neuropil (inferior row) in the rat claustrum; unipolar and bipolar neurons of oval and fusiform shapes (groups P0 and P4); multipolar neurons of differentiated shapes (groups P10-P120); increase of neuropil density and intensity of staining during the study period (groups P0-P120); NPY-ir fibers on the surface of unlabeled cells (P120a). Scale bar = 20 μm .

Tab. 2. Ocena jakościowa i ilościowa wybranych parametrów morfologicznych neuronów oraz neuropilu przedmurza zawierających neuropeptyd Y.

Tab. 2. *Qualitative and semiquantitative assessment of the selected morphological parameters of the claustral neurons and neuropil immunoreactive to neuropeptide Y.*

Grupa wiekowa	Biegunowość neuronów	Gęstość neuropilu	Intensywność znakowania neuropilu	Żyłakowatości i punkty immunoreaktywne	Wyznakowane rozgałęzienia
<i>Age group</i>	<i>Neuronal polarity</i>	<i>Density of neuropil</i>	<i>Intensity of neuropil staining</i>	<i>Varicosities and immunoreactive points</i>	<i>Immunoreactive ramifications</i>
P0	1, 2	+	+	+	–
P4	2, 1, 3	+	+	+	–
P7	2, 1, 3	+	+	+	–
P10	2, 1, 3	+	+	+	+
P14	2, 3, 1	+	+	+	+
P21	2, 3, 1	+	+	+	+
P28	3, 2	++	++	+	+
P60	3, 2	++	++	+	+
P120	3, 2	++	++	+	+

Objaśnienia oznaczeń użytych w tabelach:

Biegunowość neuronów: (1) – jednobiegunowe, (2) – dwubiegunowe, (3) – wielobiegunowe.

Gęstość neuropilu: (–) brak wyznakowania neuropilu, (+) niska gęstość neuropilu, (++) wysoka gęstość, dobrze rozwinięty neuropil.

Intensywność znakowania neuropilu: (+) niska intensywność, (++) wysoka intensywność znakowania.

Żyłakowatości i punkty immunoreaktywne: (–) niewidoczne, (+) obecne.

Wyznakowane rozgałęzienia włókien nerwowych: (–) brak, (+) obecne.

Explanations of the tables:

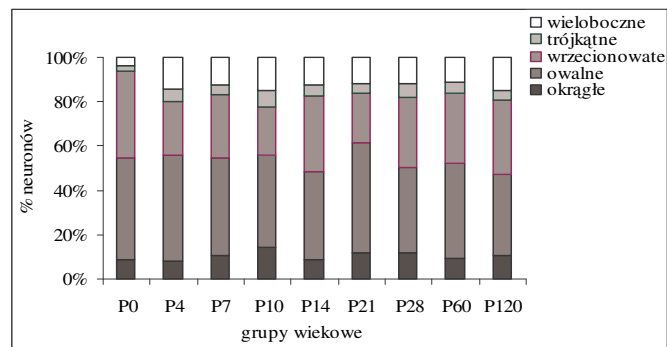
Polarity of neurons: (1) – unipolar, (2) – bipolar, (3) – multipolar.

Density of neuropil: (–) lack of neuropil staining, (+) low density of neuropil, (++) high density, well developed neuropil.

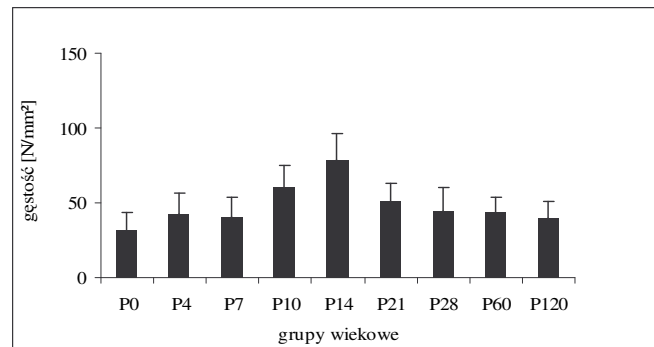
Intensity of neuropil staining: (+) low intensity, (++) high intensity of staining.

Varicosities and immunoreactive points: (–) lacking, (+) present.

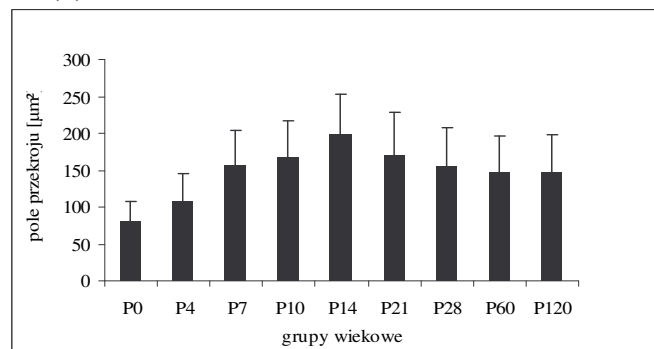
Immunostained ramifications of neuronal fibers: (–) lacking, (+) present.



(A)



(B)



(C)

Ryc. 7. Populacja neuronów NPY-ir w okresie obserwacji (P0 – P120):

(A) rozkład kształtów neuronów;

(B) średnie wartości gęstości numerycznej neuronów;

(C) średnie wielkości pól przekroju neuronów.

Fig. 7. Population of NPY-ir neurons in the period of observation (P0 – P120):

(A) distribution of neuronal shapes;

(B) mean values of the numerical density of neurons;

(C) mean values of the neuronal cross-section areas.

Neuropil zawierający neuropeptyd Y

W grupie wiekowej P0 neuropil NPY-ir jest słabo rozwinięty (ryc. 6). Tworzą go krótkie wypustki neuronów oraz bardzo nieliczne punkty immunoreaktywne. W kolejnych grupach wiekowych zaznacza się stopniowy wzrost gęstości wyznakowanych włókien i punktów immunoreaktywnych, jednak jest ona nadal mniejsza niż u osobników dorosłych (tab. 2). Można zidentyfikować nieco dłuższe odcinki wyznakowanych włókien. W dziesiątym dniu po urodzeniu pojawiają się wyznakowane miejsca podziału włókien nerwowych. Włókna NPY-ir są w tym okresie cienkie i posiadają żyłakowatości.

Po zakończeniu pierwszego miesiąca życia gęstość neuropilu zawierającego NPY nie ulega już dalszemu wzrostowi. Immunoreaktywne włókna nerwowe tworzą gęstą sieć we wszystkich rejonach przedmurza. Występują intensywnie wyznakowane punkty immunoreaktywne. Spotyka się dość liczne zakończenia aksonów oraz włókna NPY-ir na powierzchni niewyznakowanych neuronów (ryc. 6). Intensywność wyznakowania neuropilu osiąga maksimum w grupie wiekowej P28.

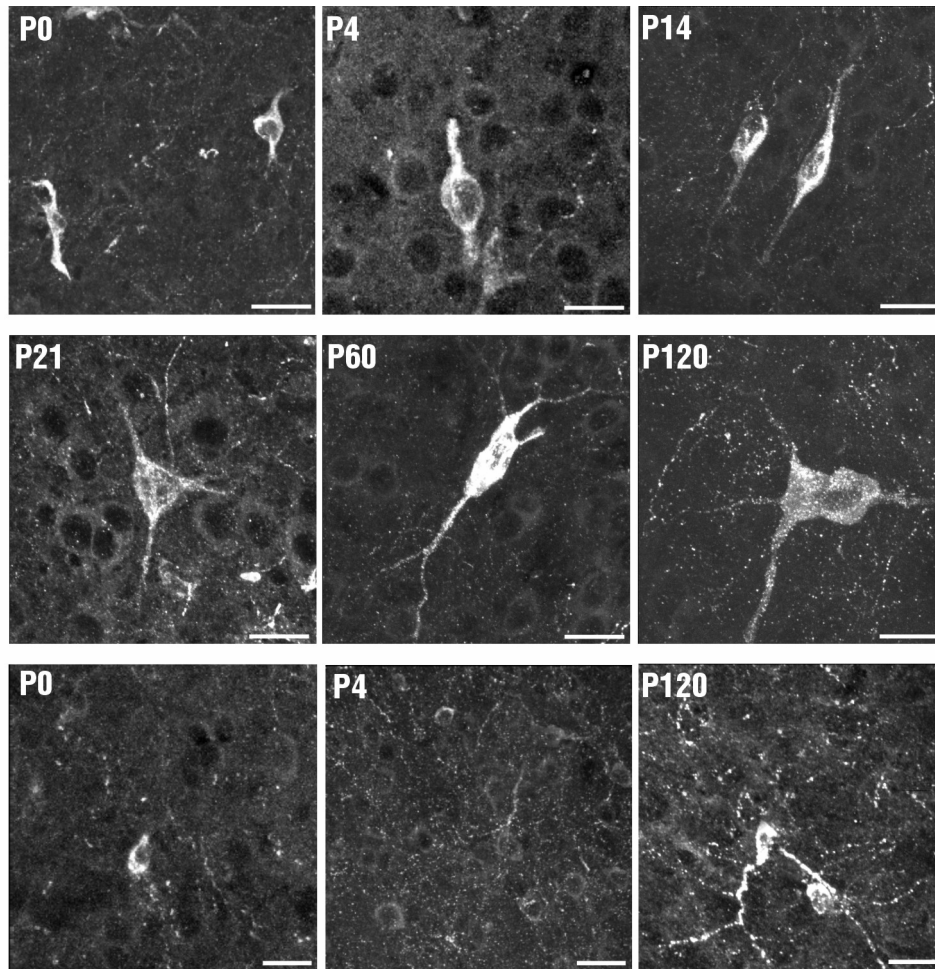
Podsumowując, zakończenie zmian morfologicznych, zachodzących w ciążach neuronów oraz neuropilu wykazujących immunoreaktywność w stosunku do NPY, ma miejsce w grupie wiekowej P28.

4.1.2. Somatostatyna

Neurony zawierające somatostatynę

W grupach wiekowych P0 i P4, dominują neurony posiadające stosunkowo niewielką objętość cytoplazmy oraz krótkie i nieco poszerzone odcinki wyznakowanych wypustek (ryc. 8). W kolejnych grupach wiekowych spotyka się neurony o zróżnicowanej intensywności wyznakowania cytoplazmy, o liczniejszych, dłuższych i zazwyczaj nieposzerzonych wypustkach.

Oceniając typy morfologiczne neuronów, w grupach wiekowych P0 i P4 stwierdzono obecność dwu- i jednobiegunowych neuronów SOM-ir (tab. 3). Do końca trzeciego tygodnia życia spotyka się neurony reprezentujące wszystkie typy morfologiczne, o zróżnicowanym udziale, w zależności od wieku. Poczynając od grupy P28 do końca okresu obserwacji w badanej populacji występują neurony dwu- lub wielobiegunowe.



Ryc. 8 Ciała komórek nerwowych (rzęd górny i środkowy) oraz neuropil (rzęd dolny) zawierające SOM (SOM-ir) w przedmurzu szczura; neurony dwubiegunowe, o ciałach okrągłych lub owalnych i poszerzonych początkowych odcinkach dendrytów (grupy P0 i P4); zwiększenie zróżnicowania kształtów neuronów w grupach P14-P120, widoczne neurony dwu- i wielobiegunowe, owalne, wrzecionowate, trójkątne i wieloboczne z wyznakowanymi dłuższymi i wysmukłymi odcinkami dendrytów; wzrost gęstości neuropilu w badanym okresie (grupy P0-P120). Długość skali = 20 μm .

Fig. 8 SOM-ir neuronal cell bodies (superior and middle rows) and neuropil (inferior row) in the rat claustrum; bipolar neurons, of round or oval cell bodies and thicker proximal fragments of dendrites (groups P0 and P4); increase in differentiation of neuronal shapes in groups P14-P120, bipolar and multipolar neurons of oval, fusiform, triangular and multiangular shapes, with longer and thinner fragments of stained dendrites; increase of neuropil density in period of study (groups P0-P120). Scale bar = 20 μm .

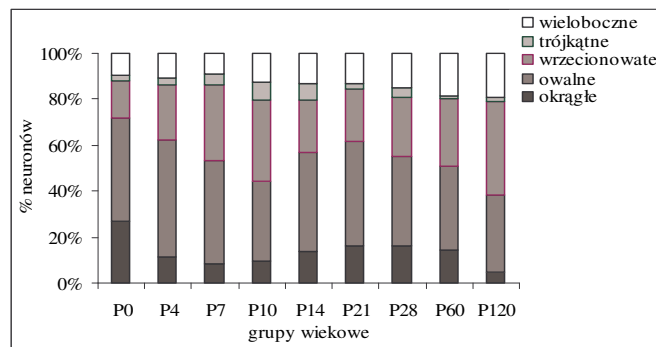
Tab. 3. Ocena jakościowa i ilościowa wybranych parametrów morfologicznych neuronów i neuropilu przedmurza zawierających somatostatynę.

Tab. 3. *Qualitative and semiquantitative assessment of the selected morphological parameters of the claustral neurons and neuropil immunoreactive to somatostatin.*

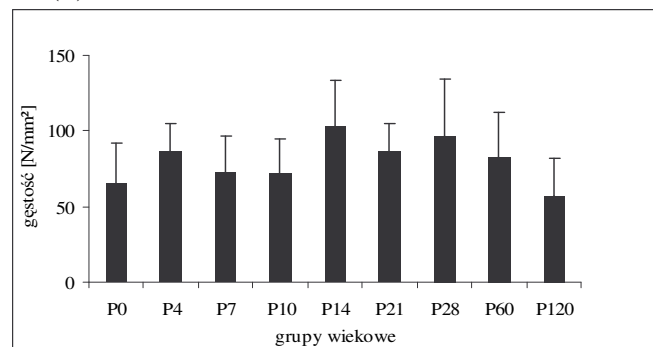
Grupa wiekowa	Biegunowość neuronów	Gęstość neuropilu	Intensywność znakowania neuropilu	Żyłakowatości i punkty immunoreaktywne	Wyznakowane rozgałęzienia
<i>Age group</i>	<i>Neuronal polarity</i>	<i>Density of neuropil</i>	<i>Intensity of neuropil staining</i>	<i>Varicosities and immunoreactive points</i>	<i>Immunoreactive ramifications</i>
P0	2, 1	+	+	+	–
P4	2, 1	+	+	+	+
P7	2, 1, 3	+	+	+	+
P10	2, 1, 3	+	+	+	+
P14	2, 3, 1	+	+	+	+
P21	2, 3, 1	+	+	+	+
P28	2, 3	++	++	+	+
P60	2, 3	++	++	+	+
P120	2, 3	++	++	+	+

Udziały neuronów reprezentujących badane kształty są zróżnicowane w zależności od wieku. W grupie wiekowej P0 dominują neurony owalne, okrągłe lub wrzecionowate (ryc. 9A). Posiadają one bardzo krótkie wypustki. W kolejnej grupie (P4) zmniejsza się udział neuronów okrągłych. Najliczniejsze są komórki o ciałach owalnych i wrzecionowatych. W całym badanym okresie spotyka się neurony reprezentujące wszystkie badane kształty. Wraz z wiekiem, zwiększa się udział neuronów wrzecionowatych i wielobocznych, przy jednoczesnym zmniejszaniu się udziału neuronów okrągłych.

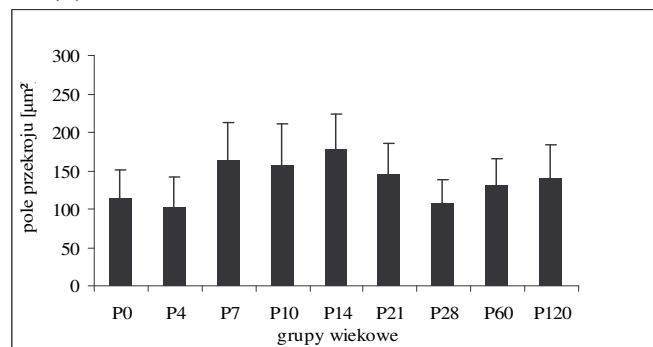
Gęstość neuronów SOM-ir wykazuje wysokie wartości w ciągu całego okresu obserwacji (ryc. 9B). Nie zaobserwowano jednak istotnych zmian jej wartości w badanym okresie. Średnia wartość gęstości numerycznej w tej populacji w całym badanym okresie wynosi 80 ± 26 neuronów na mm^2 .



(A)



(B)



(C)

Ryc. 9. Populacja neuronów SOM-ir w okresie obserwacji (P0 – P120):
 (A) rozkład kształtów neuronów;
 (B) średnie wartości gęstości numerycznej neuronów;
 (C) średnie wielkości pól przekroju neuronów.

*Fig. 9. Population of SOM-ir neurons in the period of observation (P0 – P120):
 (A) distribution of neuronal shapes;
 (B) mean values of the numerical density of neurons;
 (C) mean values of the neuronal cross-section areas.*

Nie stwierdzono różnic w wielkości średnich pól przekrojów neuronów SOM-ir w badanym okresie (ryc. 9C). Średnia wartość pola przekroju neuronu w tej populacji w całym badanym okresie wynosi $137,9 \pm 41,2 \mu\text{m}^2$.

Neuropil zawierający somatostatynę

W grupie wiekowej P0 neuropil zawierający somatostatynę jest bardzo słabo rozwinięty (ryc. 8; tab. 3). Nielicznie występują punkty immunoreaktywne. W przedziale obejmującym grupy wiekowe P4 – P21 gęstość neuropilu zwiększa się bardzo nieznacznie. Delikatne włókna SOM-ir są wyznakowane na krótkich odcinkach. Sporadycznie spotyka się wyznakowane rozgałęzienia włókien nerwowych. Pojawiają się drobne żyłakowatości na przebiegu włókien. W grupie P21 widoczna jest delikatna sieć wyznakowanych włókien oraz nieco liczniejsze niż poprzednio punkty immunoreaktywne. Poczynając od grupy wiekowej P28 ukształtowanie i zagęszczenie neuropilu SOM-ir osiąga charakter spotykany u zwierząt dojrzałych. Intensywność wyznakowania neuropilu staje się największa w grupie wiekowej P28.

Podsumowując, całość zmian morfologicznych obserwowanych w omawianej populacji kończy się w grupie wiekowej P28.

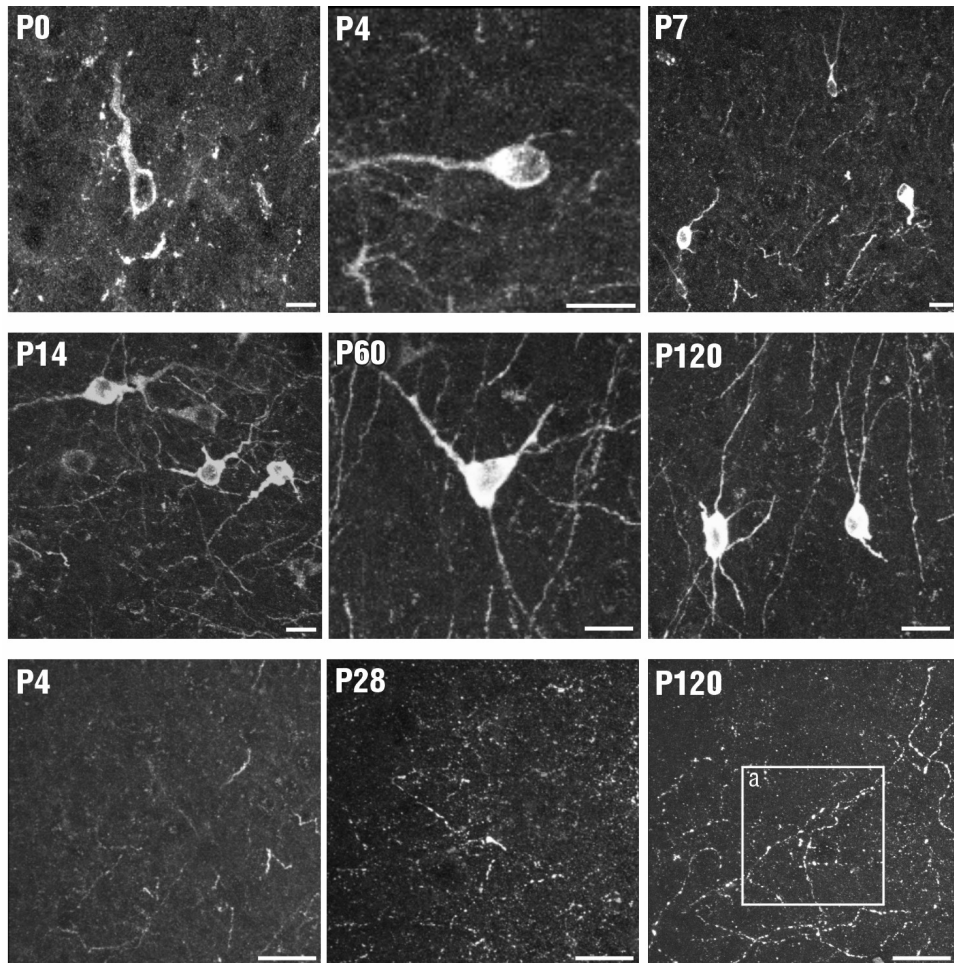
4.1.3. Wazoaktywny peptyd jelitowy

Neurony zawierające wazoaktywny peptyd jelitowy

Neurony zawierające VIP występują w przedmurzu przez cały badany okres. W przedziale grup P0 – P10 bardzo często spotyka się neurony mające poszerzone początkowe odcinki wypustek (ryc. 10). Ciały tych neuronów charakteryzują się stosunkowo niewielką objętością cytoplazmy. W okresie obserwacji zwiększa się intensywność znakowania ciał komórek nerwowych oraz wzrasta objętość cytoplazmy. Widoczne są przeważnie wąskie, początkowe odcinki wypustek.

Ocena typów morfologicznych neuronów wykazuje obecność komórek jedno- i dwubiegunowych w grupie P0 (tab. 4). W dalszym przedziale czasu, obejmującym grupy P4 – P21, spotyka się już neurony o zróżnicowanej liczbie biegunów, jednak ich udział jest odmienny od udziału w populacji dojrzałej. W grupach wiekowych P28 – P120 przeważają neurony wielo- i dwubiegunowe.

Wśród neuronów zawierających VIP, w badanym okresie, zaznacza się przewaga komórek nerwowych o kształcie owalnym, wrzecionowatym lub okrągłym (ryc. 11A). Bardzo nieliczne są neurony trójkątne i wieloboczne.



Ryc. 10 Ciała komórek nerwowych (rzęd górny i środkowy) oraz neuropil (rzęd dolny) zawierające VIP (VIP-ir) w przedmurzu szczura; neurony jedno- i dwubiegunowe, o ciałach owalnych i wrzecionowatych (grupy P0-P7); neurony o większym zróżnicowaniu kształtów i dłuższych odcinkach wyznakowanych dendrytów (grupy P14-P120); gęstość neuropilu VIP-ir jest niska w grupie P4 i wzrasta w okresie obserwacji (grupy P28, P120); widoczne zakończenia aksonalne VIP-ir na powierzchni niewyznakowanych komórek (P120a). Długość skali = 20 μm .

Fig. 10 VIP-ir neuronal cell bodies (superior and middle rows) and neuropil (inferior row) in the rat claustrum; unipolar and bipolar neurons, of oval and fusiform bodies (groups P0-P7); neurons of more differentiated shapes and longer fragments of labeled dendrites (groups P14-P120); density of VIP-ir neuropil is low at P4 and increase during the period of study (groups P28, P120); VIP-ir axonal terminals on the surface of unlabeled cells (P120a). Scale bar = 20 μm .

Tab. 4. Ocena jakościowa i ilościowa wybranych parametrów morfologicznych neuronów i neuropilu przedmurza zawierających wazoaktywny peptyd jelitowy.

Tab. 4. Qualitative and semiquantitative assessment of the selected morphological parameters of the claustral neurons and neuropil immunoreactive to vasoactive intestinal peptide.

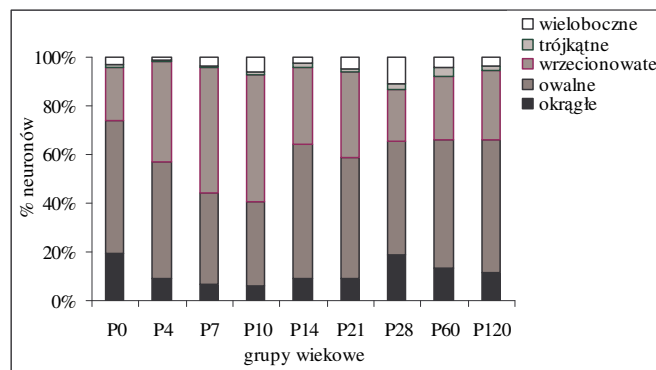
Grupa wiekowa	Biegunowość neuronów	Gęstość neuropilu	Intensywność znakowania neuropilu	Żyłakowatości i punkty immunoreaktywne	Wyznakowane rozgałęzienia
<i>Age group</i>	<i>Neuronal polarity</i>	<i>Density of neuropil</i>	<i>Intensity of neuropil staining</i>	<i>Varicosities and immunoreactive points</i>	<i>Immunoreactive ramifications</i>
P0	1, 2	+	+	+	-
P4	1, 2, 3	+	+	+	+
P7	2, 3, 1	+	+	+	+
P10	2, 3, 1	+	+	+	+
P14	2, 3, 1	+	+	+	+
P21	3, 2, 1	+	+	+	+
P28	3, 2	+	++	+	+
P60	3, 2	++	++	+	+
P120	3, 2	++	++	+	+

Ocena gęstości numerycznej neuronów VIP-ir wykazuje przejściowy wzrost, osiągający maksymalną wartość w grupie wiekowej P21 (ryc. 11B). Średnia wartość gęstości numerycznej w tej populacji w całym badanym okresie wynosi 33 ± 11 neuronów na mm^2 .

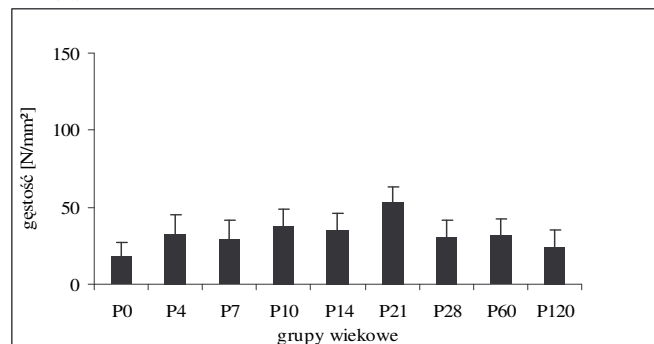
Wartości średnich pól przekrojów neuronów VIP-ir nie wykazują istotnych zmian w badanym okresie (ryc. 11C). Średnia wartość pola przekroju neuronu w tej populacji w całym badanym okresie wynosi $123,7 \pm 35,8 \mu\text{m}^2$.

Neuropil zawierający wazoaktywny peptyd jelitowy

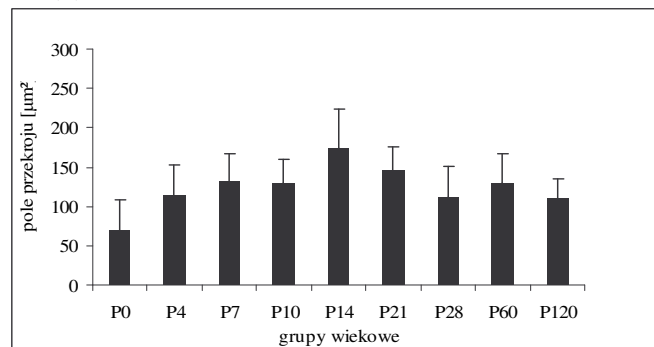
W grupie P0 neuropil tworzą nieliczne, bardzo krótkie i rzadko rozmieszczone włókna, a także nieliczne punkty immunoreaktywne (ryc. 10).



(A)



(B)



(C)

Ryc. 11. Populacja neuronów VIP-ir w okresie obserwacji (P0 – P120):

- (A) rozkład kształtów neuronów;
 (B) średnie wartości gęstości numerycznej neuronów;
 (C) średnie wielkości pól przekroju neuronów.

Fig. 11. Population of VIP-ir neurons in the period of observation (P0 – P120):

- (A) distribution of neuronal shapes;
 (B) mean values of the numerical density of neurons;
 (C) mean values of the neuronal cross-section areas.

W kolejnych grupach wiekowych gęstość neuropilu zwiększa się stopniowo. Uwidacznia się coraz więcej punktów immunoreaktywnych. Widoczne są coraz dłuższe odcinki wyznakowanych włókien nerwowych. Na ich przebiegu stają się widoczne drobne żyłakowatości. Poczynając od grupy wiekowej P4 spotyka się wyznakowane rozgałęzienia. W grupie P60 gęstość neuropilu osiąga charakter spotykany u zwierząt dojrzałych (tab. 4). Neuropil tworzą bardzo delikatne włókna oraz punkty immunoreaktywne. W grupach wiekowych P60 i P120 znaleziono zakończenia aksonalne oraz włókna VIP-ir położone na powierzchni niewyznakowanych ciał komórek nerwowych (ryc. 10).

Intensywność wyznakowania neuropilu jest najniższa we wczesnym okresie dojrzewania (grupy P0 – P4) i wzrasta stopniowo w kolejnych grupach wiekowych (P7 – P21). Największą intensywność wyznakowania neuropilu obserwuje się w po upływie czterech tygodni życia zwierzęcia.

4.2. Ocena morfologiczna dojrzewania populacji neuronów zawierających białka wiążące wapń w przedmurzu

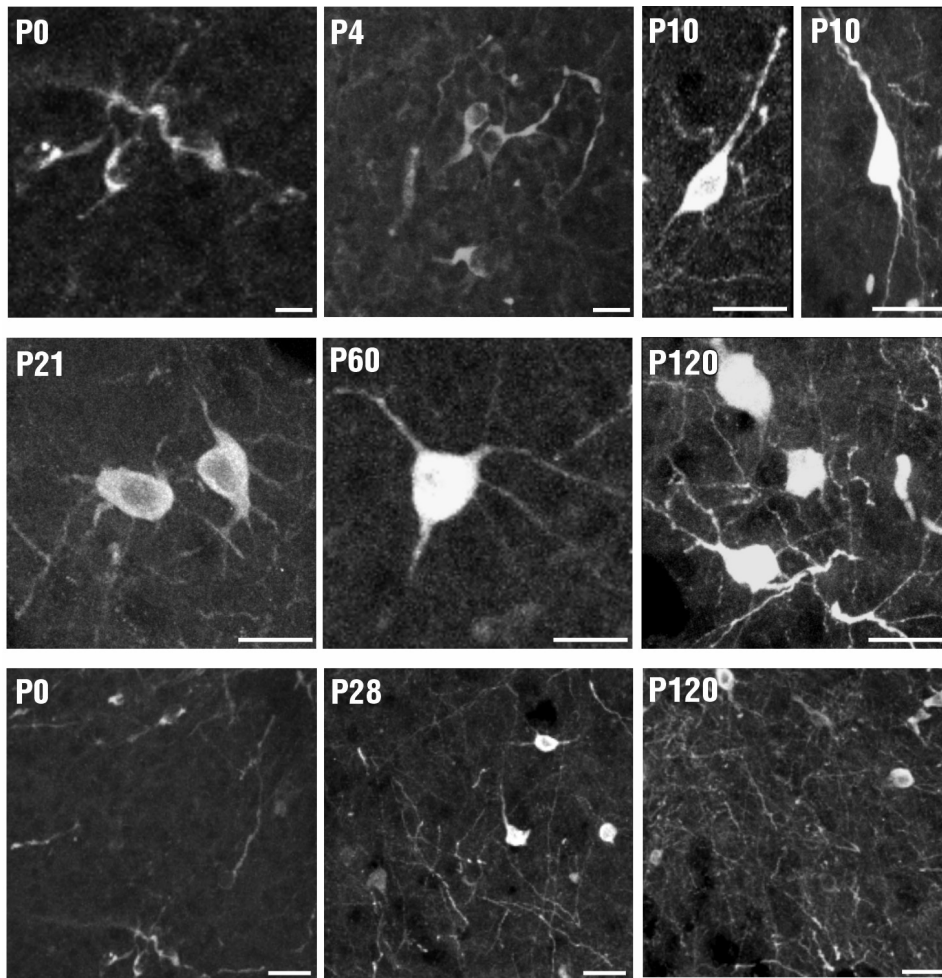
4.2.1. Kalbindyna D28k

Neurony zawierające kalbindynę D28k

Neurony zawierające kalbindynę D28k znajdują się w przedmurzu szczyra już w dniu urodzenia. W ciągu pierwszego tygodnia życia (grupy P0 – P7) obserwuje się neurony o mniejszej intensywności znakowania niż w starszych grupach wiekowych (ryc. 12). Charakteryzują się one niewielką objętością cytoplazmy, a także poszerzonymi początkowymi odcinkami wypustek.

Ocena typów morfologicznych wskazuje na występowanie neuronów jedno- i dwubiegunowych w grupie P0 (tab. 5). W kolejnych grupach wiekowych (P4 – P14) reprezentowane są wszystkie typy morfologiczne, przy czym zmniejsza się udział neuronów jednobiegunowych. Po upływie trzech tygodni życia przeważają neurony wielo- i dwubiegunowe.

Ocena kształtów neuronów CB-ir wskazuje na przeważający udział komórek o ciałach owalnych i wrzecionowatych we wszystkich grupach wiekowych (ryc. 13A). W młodszych grupach (P0 – P14) najliczniejsze są neurony wrzecionowate.



Ryc. 12 Ciała komórek nerwowych (rząd górny i środkowy) oraz neuropil (rząd dolny) zawierające CB (CB-ir) w przedmurzu szczura; owalne i wrzecionowate neurony dwubiegunowe o niskiej intensywności znakowania (grupy P0 i P4); intensywnie wyznakowane neurony dwubiegunowe, o kształcie wrzecionowatym (grupa P10); neurony dwu- i wielobiegunowe, o zróżnicowanych kształtach (grupy P21-P120); nieliczne włókna CB-ir oraz punkty immunoreaktywne (grupa P0); wzrost gęstości neuropilu w okresie obserwacji (grupy P28-P120). Długość skali = 20 μm .

Fig. 12 CB-ir neuronal cell bodies (superior and middle rows) and neuropil (inferior row) in the rat claustrum; weakly stained bipolar neurons, of oval and fusiform cell bodies (groups P0 and P4); intensively stained bipolar neurons, of fusiform shapes (group P10); bipolar and multipolar neurons of more differentiated shapes (groups P21-P120); single CB-ir neuronal fibers and immunoreactive points (group P0); increase of neuropil density during the period of observation (groups P28-P120). Scale bar = 20 μm .

Tab. 5. Ocena jakościowa i ilościowa wybranych parametrów morfologicznych neuronów i neuropilu przedmurza zawierających kalbindynę D28k.

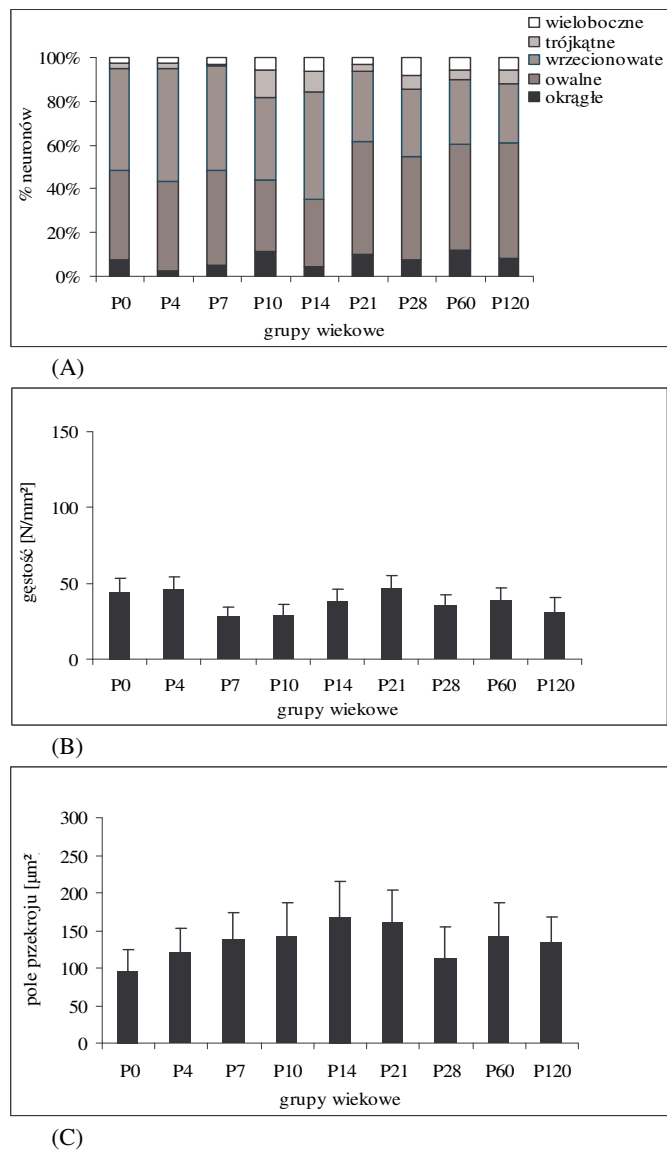
Tab. 5. *Qualitative and semiquantitative assessment of the selected morphological parameters of the claustral neurons and neuropil immunoreactive to calbindin D28k.*

Grupa wiekowa	Biegunowość neuronów	Gęstość neuropilu	Intensywność znakowania neuropilu	Żyłakowatości i punkty immunoreaktywne	Wyznakowane rozgałęzienia
<i>Age group</i>	<i>Neuronal polarity</i>	<i>Density of neuropil</i>	<i>Intensity of neuropil staining</i>	<i>Varicosities and immunoreactive points</i>	<i>Immunoreactive ramifications</i>
P0	1, 2	+	+	–	–
P4	1, 2, 3	+	+	+	+
P7	2, 1, 3	+	+	+	+
P10	2, 1, 3	+	++	+	+
P14	2, 3, 1	+	++	+	+
P21	3, 2	+	++	+	+
P28	3, 2	++	++	+	+
P60	3, 2	++	++	+	+
P120	3, 2	++	++	+	+

Po upływie trzech tygodni zwiększa się udział neuronów o kształcie owalnym. Ponadto, występują neurony reprezentujące pozostałe kształty.

Ocena gęstości numerycznej neuronów CB-ir wykazuje charakterystyczny przebieg w badanym okresie. W dwóch najmłodszych grupach wiekowych gęstość neuronów CB-ir jest wysoka (ryc. 13B). W przedziale czasu obejmującym grupy P7 – P10 występuje spadek gęstości neuronów CB-ir, po którym zaznacza się przejściowy wzrost oraz osiągnięcie wartości spotykanych u osobników dojrzałych. Średnia wartość gęstości numerycznej w tej populacji w całym badanym okresie wynosi 37 ± 8 neuronów na mm^2 .

Nie stwierdza się zmian wartości średnich pól przekrojów neuronów CB-ir w badanym okresie (ryc. 13C). Średnia wartość pola przekroju neuronu w tej populacji w całym badanym okresie wynosi $134,5 \pm 39,5 \mu\text{m}^2$.



Ryc. 13. Populacja neuronów CB-ir w okresie obserwacji (P0 – P120):
 (A) rozkład kształtów neuronów;
 (B) średnie wartości gęstości numerycznej neuronów;
 (C) średnie wielkości pól przekroju neuronów.

*Fig. 13. Population of CB-ir neurons in the period of observation (P0 – P120):
 (A) distribution of neuronal shapes;
 (B) mean values of the numerical density of neurons;
 (C) mean values of the neuronal cross-section areas.*

Neuropil zawierający kalbindynę D28k

W ciągu pierwszego tygodnia życia zwierzęcia neuropil CB-ir jest słabo rozwinięty, jednak można wyróżnić rzadko ułożone, dość krótkie odcinki wyznakowanych włókien i niezbyt liczne ziarnistości (ryc. 12). Spotyka się nieliczne, wyznakowane miejsca podziału włókien. Do końca pierwszego miesiąca życia (P10 – P28) zachodzi stopniowy wzrost gęstości neuropilu (tab. 5). Widoczne są fragmenty nieco grubszych włókien oraz coraz liczniejsze punkty immunoreaktywne. Po upływie pierwszego miesiąca życia gęstość immunoreaktywnego neuropilu nie ulega dalszym zmianom i ma cechy spotykane u osobników dorosłych. Neuropil jest utworzony przez długie, rozgałęzione włókna i delikatne punkty immunoreaktywne. Intensywność znakowania neuropilu jest wysoka już w grupie wiekowej P10.

Całość zmian morfologicznych, obserwowanych w badanym okresie, prowadzi do powstania dojrzałej populacji neuronów oraz neuropilu CB-ir w grupie wiekowej P28.

4.2.2. Kalretynina

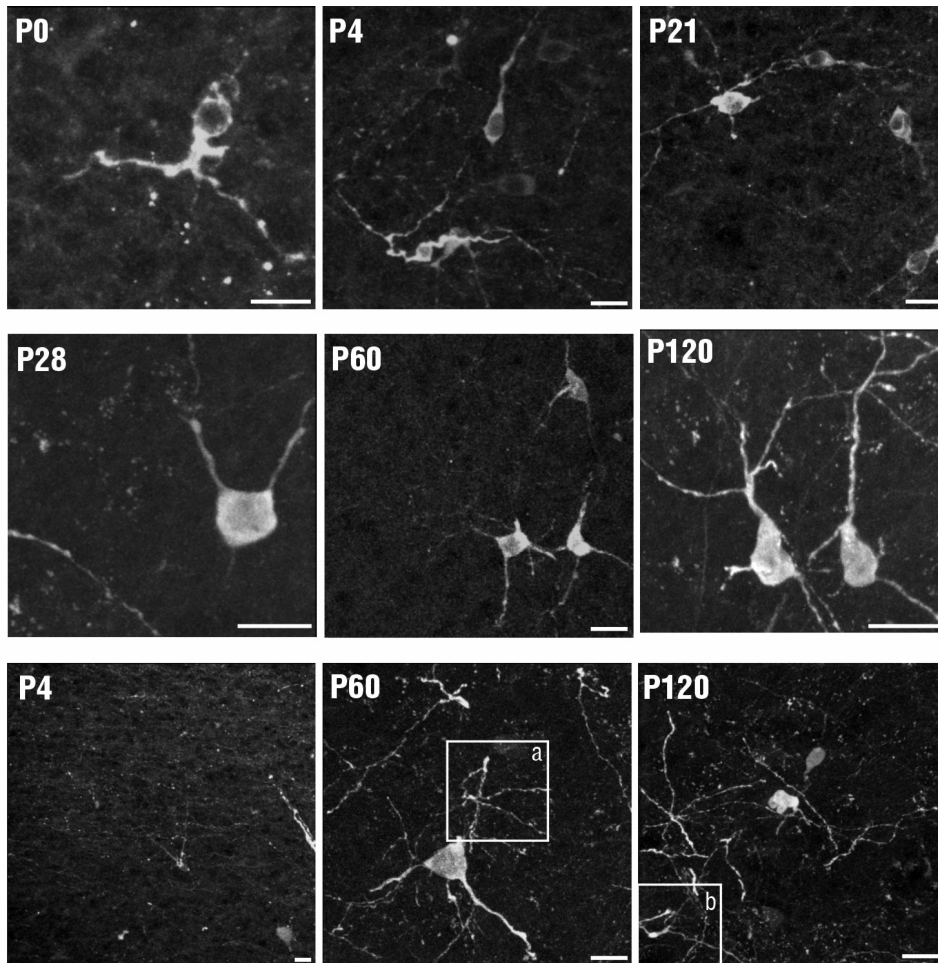
Neurony zawierające kalretyninę

W pierwszym tygodniu życia spotyka się neurony CR-ir o poszerzonych początkowych odcinkach wypustek oraz o stosunkowo małej ilości cytoplazmy (ryc. 14). W kolejnych grupach wiekowych występują neurony o większej zawartości cytoplazmy oraz bardziej wysmukłych początkowych odcinkach wypustek.

Oceniając typy morfologiczne neuronów CR-ir stwierdza się występowanie komórek jedno-, dwu- i wielobiegunowych w ciągu trzech pierwszych tygodni życia (tab. 6). Udział poszczególnych typów zmienia się z wiekiem. Dojrzałość morfologiczna przejawiająca się stabilizacją udziału typów morfologicznych neuronów wielo- i dwubiegunowych jest osiągnięta po upływie czterech tygodni życia.

Ocena kształtów ciał neuronów CR-ir wskazuje, że w całym badanym okresie najliczniej reprezentowane są komórki owalne i wrzecionowate (ryc. 15A). Mniej liczne są neurony o innych kształtach ciał komórkowych.

Gęstość numeryczna neuronów CR-ir wzrasta w ciągu trzech pierwszych tygodni życia (ryc. 15B). Nie wykazano istotnych zmian wartości tego parametru w dalszym okresie obserwacji. Średnia wartość gęstości numerycznej w tej populacji w całym badanym okresie wynosi 34 ± 10 neuronów na mm^2 .



Ryc. 14 Ciała komórek nerwowych (rzęd górną i środkową) oraz neuropil (rzęd dolną) zawierające CR (CR-ir) w przedmurzu szczura; jedno-biegunowe i dwubiegunowe neurony okrągłe i owalne (grupy P0 i P4); dwubiegunowe neurony owalne i wrzecionowate o zróżnicowanej intensywności wyznakowania (grupa P21); neurony wielobiegunowe, o zróżnicowanych kształtach (grupy P28-P120); wzrost gęstości neuropilu w okresie obserwacji (grupy P4-P120); włókna CR-ir na powierzchni niewyznakowanych komórek (P60a, P120b). Długość skali = 20 μm .

Fig. 14 CR-ir neuronal cell bodies (superior and middle rows) and neuropil (inferior row) in the rat claustrum; unipolar and bipolar neurons, of round and oval bodies (groups P0 and P4); bipolar neurons of oval and fusiform shapes and differentiated intensity of staining (group P21); multipolar neurons of differentiated shapes (groups P28-P120); increase of neuropil density during the period of observation (groups P4-P120); CR-ir fibers on the surface of unlabeled cells (P60a, P120b). Scale bar = 20 μm .

Tab. 6. Ocena jakościowa i ilościowa wybranych parametrów morfologicznych neuronów i neuropilu przedmurza zawierających kalretyninę.

Tab. 6. *Qualitative and semiquantitative assessment of the selected morphological parameters of the claustral neurons and neuropil immunoreactive to calretinin.*

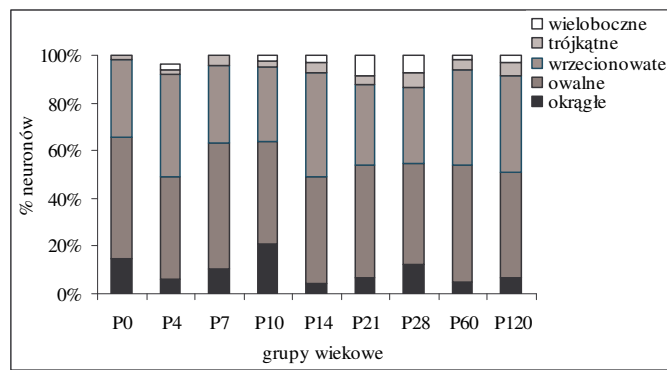
Grupa wiekowa	Biegunowość neuronów	Gęstość neuropilu	Intensywność znakowania neuropilu	Żyłakowatości i punkty immunoreaktywne	Wyznakowane rozgałęzienia
<i>Age group</i>	<i>Neuronal polarity</i>	<i>Density of neuropil</i>	<i>Intensity of neuropil staining</i>	<i>Varicosities and immunoreactive points</i>	<i>Immunoreactive ramifications</i>
P0	1, 2, 3	+	+	+	+
P4	2, 1, 3	+	+	+	+
P7	2, 1, 3	+	+	+	+
P10	2, 3, 1	+	+	+	+
P14	2, 3, 1	+	+	+	+
P21	2, 3, 1	+	+	+	+
P28	3, 2	++	++	+	+
P60	3, 2	++	++	+	+
P120	3, 2	++	++	+	+

Nie stwierdzono zmian wartości średnich pól przekrojów neuronów CR-ir w badanym okresie (ryc. 15C). Średnia wartość pola przekroju neuronu w tej populacji w całym badanym okresie wynosi $138,3 \pm 46,1 \mu\text{m}^2$.

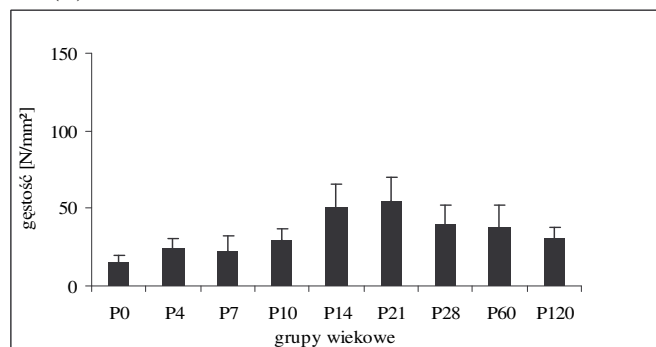
Neuropil zawierający kalretyninę

W grupach wiekowych P0 i P4 neuropil jest bardzo słabo rozwinięty i złożony przeważnie z bardzo nielicznych, wyznakowanych na krótkich odcinkach włókien z żyłakowatościami oraz z punktów immunoreaktywnych (ryc. 14). Miejsca podziału włókien są widoczne po raz pierwszy w grupie P0 (tab. 6). Gęstość neuropilu zwiększa się w okresie obserwacji. Jest ona największa po upływie czwartego tygodnia życia. Neuropil zbudowany jest z długich odcinków wyznakowanych włókien, zawierających bardzo drobne żyłakowatości. W grupach P60 i P120 napotkano dość licznie występujące zakończenia aksonalne oraz włókna CR-ir na powierzchni niewyznakowanych neuronów (ryc. 14). Intensywność znakowania neuropilu zawierającego CR wzrasta w ciągu czterech pierwszych tygodni życia.

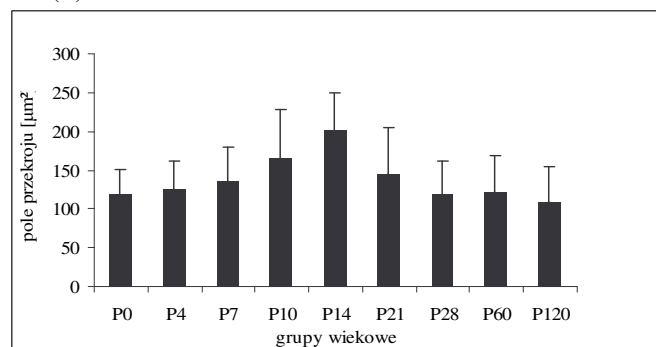
Zakończenie zmian morfologicznych związanych z dojrzewaniem tej populacji neuronów ma miejsce po upływie czwartego tygodnia życia.



(A)



(B)



(C)

Ryc. 15. Populacja neuronów CR-ir w okresie obserwacji (P0 – P120):

- (A) rozkład kształtów neuronów;
 (B) średnie wartości gęstości numerycznej neuronów;
 (C) średnie wielkości pól przekroju neuronów.

Fig. 15. Population of CR-ir neurons in the period of observation (P0 – P120):

- (A) distribution of neuronal shapes;*
(B) mean values of the numerical density of neurons;
(C) mean values of the neuronal cross-section areas.

4.2.3. Parwalbumina

Neurony zawierające parwalbuminę

Neurony zawierające parwalbuminę pojawiają się w przedmurzu w 10 dniu po urodzeniu. W grupach wiekowych P10 – P21 spotyka się przeważnie neurony o stosunkowo dużej zawartości cytoplazmy, a także o poszerzonych początkowych odcinkach wypustek (ryc. 16). W starszych grupach wiekowych neurony PV-ir cechują się większą niż poprzednio objętością cytoplazmy, a także bardziej wysmukłymi początkowymi odcinkami wypustek.

Ocena typów morfologicznych neuronów zawierających PV wskazuje na przewagę komórek dwubiegunowych w drugim i trzecim tygodniu (grupy P10 – P21; tab. 7). W dalszym okresie obserwacji (grupy P28 – P120) spotyka się najczęściej neurony wielo- lub dwubiegunowe.

W grupach P10 i P14 spotyka się neurony o kształtach ciał komórkowych przeważnie owalnych, wrzecionowatych lub okrągłych (ryc. 17A). Komórki nerwowe o takich kształtach dominują w omawianej populacji podczas całego okresu obserwacji. Ponadto, wraz z wiekiem, zaznacza się wzrost udziału neuronów wielobocznych.

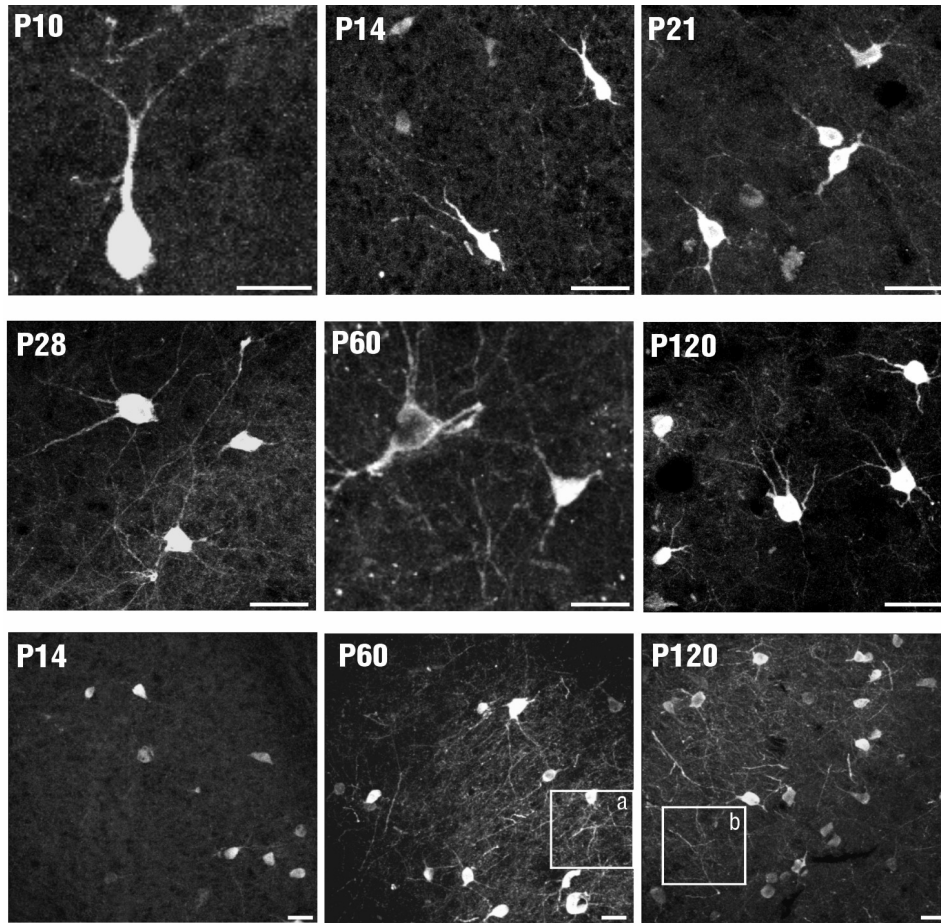
Gęstość neuronów PV-ir wzrasta w ciągu drugiego i trzeciego tygodnia życia zwierzęcia (ryc. 17B). Po upływie trzech tygodni gęstość numeryczna osiąga wartości spotykane u osobników dojrzałych. Średnia wartość gęstości numerycznej w tej populacji w całym badanym okresie wynosi 50 ± 16 neuronów na mm^2 .

Wyniki badania średnich wartości pól przekrojów neuronów PV-ir nie wykazują zmian w badanym okresie życia zwierzęcia (ryc. 17C). Średnia wartość pola przekroju neuronu w tej populacji w całym badanym okresie wynosi $148,4 \pm 43,4 \mu\text{m}^2$.

Neuropil zawierający parwalbuminę

W przedziale grup wiekowych P0 – P7 nie stwierdza się obecności wyznakowanego neuropilu. W grupie wiekowej P10 rzadko spotyka się krótkie odcinki wyznakowanych włókien i nieliczne punkty immunoreaktywne. W kolejnych grupach wiekowych następuje wzrost zagęszczenia neuropilu (ryc. 16; tab. 7). Uwidaczniają się pojedyncze rozgałęzienia włókien nerwowych. Dojrzały charakter ukształtowania immunoreaktywny neuropil osiąga po upływie pierwszego miesiąca życia. Włókna nerwowe są wyznakowane na dłuższych odcinkach. Częściej obserwuje się ich wyznakowane rozgałęzienia. Są to przeważnie miejsca ich pierwszego, a nieco rzadziej drugiego podziału. Zwracają uwagę

zakończenia aksonów PV-ir oraz włókna nerwowe rozmieszczone wokół ciał niewyznakowanych komórek w grupach P60 i P120 (ryc. 16).



Ryc. 16 Ciała komórek nerwowych (rzęd górną i środkową) oraz neuropil (rzęd dolną) zawierające PV (PV-ir) w przedmurzu szczura; neurony jedno- i dwubiegunowe, o owalnych i wrzecionowatych ciałach komórkowych (grupy P10 i P14); wzrost zróżnicowania kształtów neuronów w dalszym okresie obserwacji (grupy P21-P120); wzrost gęstości neuropilu w badanym okresie (grupy P60, P120); włókna PV-ir na powierzchni niewyznakowanych ciał komórek (P60a, P120b). Długość skali = 20 μm .

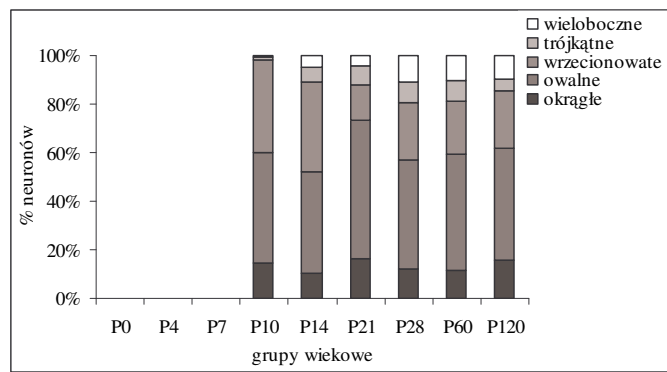
Fig. 16 PV-ir neuronal cell bodies (superior and middle rows) and neuropil (inferior row) in the rat claustrum; unipolar and bipolar neurons of oval and fusiform cell bodies (groups P10 and P14); increase of neuronal shapes differentiation in the further period of observation (groups P21-P120); increase of neuropil density in the period of observation (groups P60, P120); PV-ir fibers localized on the surface of unlabeled cells (P60a, P120b). Scale bar = 20 μm .

Tab. 7. Ocena jakościowa i ilościowa wybranych parametrów morfologicznych neuronów i neuropilu przedmurza zawierających parwalbuminę.

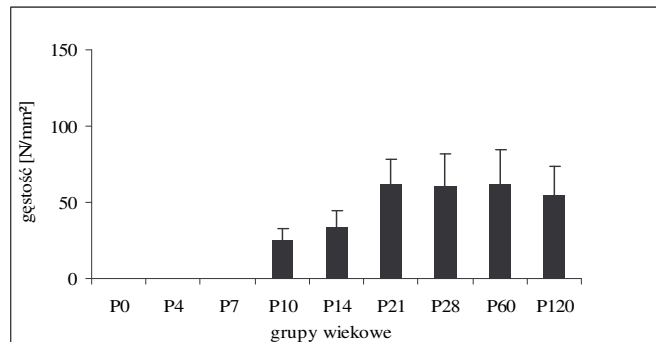
Tab. 7. *Qualitative and semiquantitative assessment of the selected morphological parameters of the claustral neurons and neuropil immunoreactive to parvalbumin.*

Grupa wiekowa	Biegunowość neuronów	Gęstość neuropilu	Intensywność znakowania neuropilu	Żyłakowatości i punkty immunoreaktywne	Wyznakowane rozgałęzienia
<i>Age group</i>	<i>Neuronal polarity</i>	<i>Density of neuropil</i>	<i>Intensity of neuropil staining</i>	<i>Varicosities and immunoreactive points</i>	<i>Immunoreactive ramifications</i>
P0		–		–	–
P4		–		–	–
P7		–		–	–
P10	2, 1	+	++	+	–
P14	2, 1, 3	+	++	+	+
P21	2, 3, 1	+	++	+	+
P28	3, 2	++	++	+	+
P60	3, 2	++	++	+	+
P120	3, 2	++	++	+	+

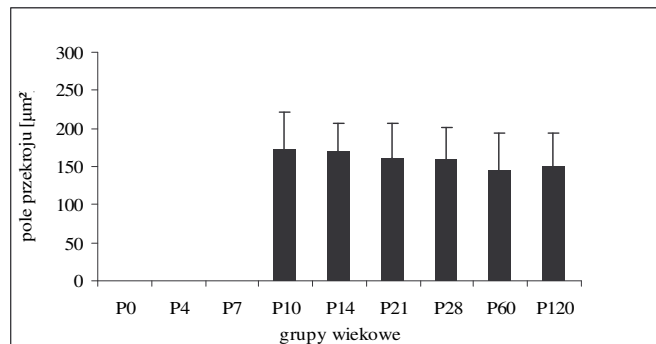
Proces dojrzewania morfologicznego tej populacji neuronalnej dobiega końca po upływie czterech tygodni życia szczura.



(A)



(B)



(C)

Ryc. 17. Populacja neuronów PV-ir w okresie obserwacji (P0 – P120):

- (A) rozkład kształtów neuronów;
 (B) średnie wartości gęstości numerycznej neuronów;
 (C) średnie wielkości pól przekroju neuronów.

Fig. 17. Population of PV-ir neurons in the period of observation (P0 – P120):

- (A) distribution of neuronal shapes;*
(B) mean values of the numerical density of neurons;
(C) mean values of the neuronal cross-section areas.

4.3. Podsumowanie wyników dotyczących występowania neuropeptydów oraz białek wiążących wapń w neuronach przedmurza w okresie dojrzewania

Stosując pojedyncze barwienia immunocytochemiczne wykazano obecność wszystkich trzech badanych neuropeptydów w neuronach przedmurza, w okresie dojrzewania (tab. 8). Spośród trzech badanych białek wiążących wapń, dwa – kalbindyna D28k oraz kalretynina, występują w całym badanym okresie. Parwalbumina pojawia się w neuronach przedmurza dopiero w dziesiątym dniu po urodzeniu.

Porównanie gęstości numerycznych w badanych populacjach neuronów wykazuje zróżnicowaną dynamikę ich dojrzewania. W przypadku neuronów zawierających badane neuropeptydy, wykazano wzrost gęstości w populacjach NPY- oraz VIP-ir, podczas gdy populacja neuronów SOM-ir nie wykazuje istotnych zmian gęstości w badanym okresie. W populacjach zawierających białka wiążące wapń stwierdzono wzrost gęstości neuronów zawierających kalretyninę oraz parwalbuminę. Gęstość neuronów CB-ir wykazuje przejściowe zmniejszenie w drugim tygodniu życia.

Porównanie średnich wartości gęstości numerycznej, w całym badanym okresie, dla poszczególnych populacji, wykazuje istotną różnicę między gęstością neuronów zawierających somatostatynę, a gęstościami neuronów zawierających wazoaktywny peptyd jelitowy, kalbindynę i kalretyninę.

W najwcześniejszym okresie dojrzewania przedmurza (grupy P0 i P4) wartości gęstości numerycznej neuronów SOM-ir są większe od odpowiednich wartości gęstości neuronów VIP-ir. W tym samym czasie wartości gęstości numerycznej neuronów CB-ir są wyższe od odpowiednich wartości gęstości w populacji neuronów CR-ir. Ocena typów morfologicznych we wszystkich populacjach zawierających badane substancje wykazuje największy udział komórek dwubiegunowych i wielobiegunowych. Są to najczęściej neurony o kształtach owalnych i wrzecionowatych.

Wzrost wartości średnich pól przekrojów neuronów, w okresie obserwacji, występuje jedynie w populacji zawierającej neuropeptyd Y. Średnie wartości pól przekroju neuronów w populacjach zawierających neuropeptydy oraz białka wiążące wapń, w całym badanym okresie, nie wykazują istotnych różnic. We wszystkich badanych populacjach stwierdzono wzrost gęstości oraz intensywności znakowania neuropilu w okresie dojrzewania przedmurza.

Tab. 8. Występowanie badanych neuropeptydów oraz białek wiążących wapń w neuronach przedmurza w okresie dojrzewania.

Tab. 8. Occurrence of the studied neuropeptides and calcium binding proteins in the claustral neurons during maturation.

Grupa wiekowa	Neuropeptyd Y	Somatostatyna	Wazoaktywny peptyd jelitowy	Kalbindyna D28k	Kalretynina	Parwalbumina
Age group	<i>Neuropeptide Y</i>	<i>Somatostatin</i>	<i>Vasoactive intestinal peptide</i>	<i>Calbindin D28k</i>	<i>Calretinin</i>	<i>Parvalbumin</i>
P0	○	○	○	○	○	–
P4	○	○	○	○	○	–
P7	○	○	○	○	○	–
P10	○	○	○	○	○	○
P14	○	○	○	○	○	○
P21	○	○	○	○	○	○
P28	●	●	○	●	●	●
P60	●	●	●	●	●	●
P120	●	●	●	●	●	●

Objaśnienia oznaczeń użytych w tabelach:

(–) brak znakowania immunocytochemicznego neuronów;

(○) obecność znakowania immunocytochemicznego;

(●) występowanie cech dojrzałości morfologicznej badanej populacji neuronów przedmurza.

Explanations of the tables:

(–) lack of immunocytochemical staining of neurons;

(○) presence of immunocytochemical staining of neurons;

(●) occurrence of the features of morphological maturation in the studied population of claustral neurons.

Podsumowując, pełny obraz dojrzałości morfologicznej w zakresie ukształtowania ciał komórek nerwowych oraz neuropilu, w większości badanych populacji występuje po upływie czterech tygodni życia. W przypadku populacji neuronów zawierających wazoaktywny peptyd jelitowy, jest on obserwowany później (grupa P60).

4.4. Kolokalizacja neuropeptydów z białkami wiążącymi wapń lub syntazą tlenu azotu w okresie dojrzewania przedmurza

4.4.1. Kolokalizacje z udziałem neuropeptydu Y

Kolokalizacja neuropeptydu Y i kalbindyny D28k

Neurony zawierające neuropeptyd Y oraz kalbindynę D28k

Obecność neuronów podwójnie znakowanych w tym typie kolokalizacji stwierdzono po raz pierwszy w grupie P4 (ryc. 18; tab. 9).

W pierwszym i drugim tygodniu życia najliczniej występują neurony dwu- i jednobiegunowe. Po upływie dwóch tygodni najczęściej spotyka się neurony dwu- i wielobiegunowe. Taki rozkład typów morfologicznych występuje do końca okresu obserwacji.

Ocena kształtów neuronów podwójnie znakowanych wykazuje duże zróżnicowanie w okresie obserwacji (ryc. 19A). Najliczniej reprezentowane są komórki o ciałach owalnych i wrzecionowatych. Zwraca uwagę wzrost odsetka neuronów wielobocznych.

W tym typie kolokalizacji obserwowany jest wzrost odsetka neuronów podwójnie wyznakowanych (ryc. 19B). Trwa on do końca trzeciego tygodnia życia (P21), a następnie wartość odsetka neuronów podwójnie znakowanych stabilizuje się. Najwyższa wartość odsetka neuronów podwójnie wyznakowanych w badanym okresie nie przekracza 32%. Odsetek neuronów podwójnie znakowanych stanowi maksymalnie do 47% wszystkich neuronów NPY-ir oraz do 52% wszystkich neuronów CB-ir (ryc. 19C).

Średnie wartości pól przekrojów neuronów podwójnie znakowanych nie wykazują wzrostu w badanym okresie obserwacji (ryc. 19D). Średnia wartość pola przekroju neuronu w tej populacji w całym badanym okresie wynosi $159,3 \pm 35,3 \mu\text{m}^2$.

Tab. 9. Ocena jakościowa i ilościowa wybranych parametrów morfologicznych neuronów i neuropilu przedmurza wykazujących kolokalizację NPY/CB.

Tab. 9. *Qualitative and semiquantitative assessment of the selected morphological parameters of the claustral neurons and neuropil revealing colocalization NPY/CB.*

Grupa wiekowa	Kolokalizacja w ciałach neuronów	Biegunowość neuronów	Gęstość neuropilu	Intensywność znakowania neuropilu	Żyłakowatości i punkty immunoreaktywne	Wyznakowane rozgałęzienia
<i>Age group</i>	<i>Colocalization in neuronal bodies</i>	<i>Neuronal polarity</i>	<i>Density of neuropil</i>	<i>Intensity of neuropil staining</i>	<i>Varicosities and immunoreactive points</i>	<i>Immunoreactive ramifications</i>
P0	–		–		–	–
P4	+	2, 1	–		–	–
P7	+	2, 1, 3	–		–	–
P10	+	2, 1, 3	–		–	–
P14	+	2, 3	+	+	+	–
P21	+	2, 3	+	++	+	+
P28	+	2, 3	+	++	+	+
P60	+	2, 3	+	++	+	+
P120	+	2, 3	+	++	+	+

Objaśnienia oznaczeń użytych w tabelach:

Kolokalizacja: (–) brak kolokalizacji, (+) obecna kolokalizacja.

Biegunowość neuronów: (1) – jednobiegunowe, (2) – dwubiegunowe, (3) – wielobiegunowe.

Gęstość neuropilu: (–) brak wyznakowania neuropilu, (+) niska gęstość neuropilu, (++) wysoka gęstość, dobrze rozwinięty neuropil.

Intensywność znakowania neuropilu: (+) niska intensywność, (++) wysoka intensywność znakowania.

Żyłakowatości i punkty immunoreaktywne: (–) niewidoczne, (+) obecne.

Wyznakowane rozgałęzienia włókien nerwowych: (–) brak, (+) obecne.

Explanations of the tables:

Colocalization: (–) lacking colocalization, (+) presence of colocalization.

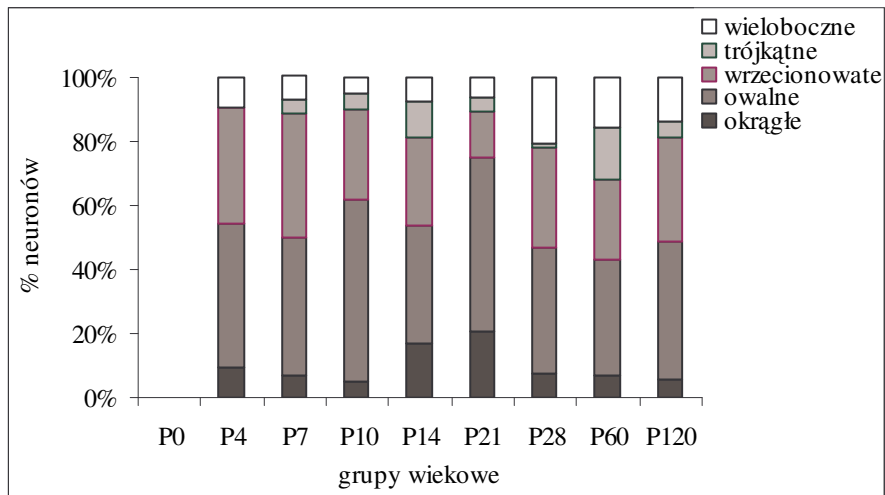
Polarity of neurons: (1) unipolar, (2) bipolar, (3) multipolar.

Density of neuropil: (–) lack of neuropil staining, (+) low density of neuropil, (++) high density, well developed neuropil.

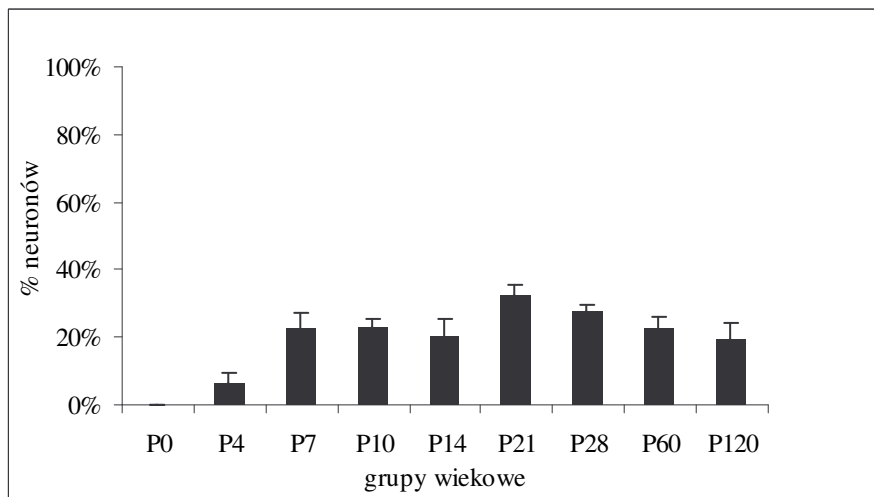
Intensity of neuropil staining: (+) low intensity, (++) high intensity of staining.

Varicosities and immunoreactive points: (–) lacking, (+) present.

Immunostained ramifications of neuronal fibers: (–) lacking, (+) present.



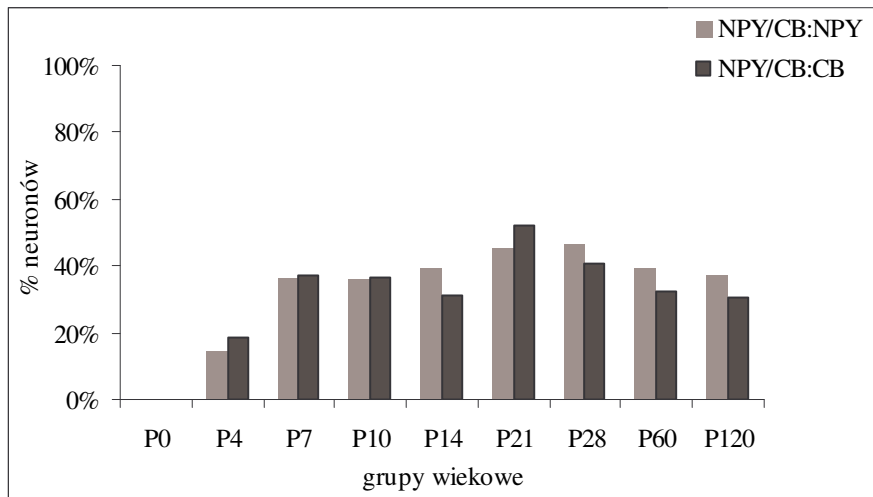
(A)



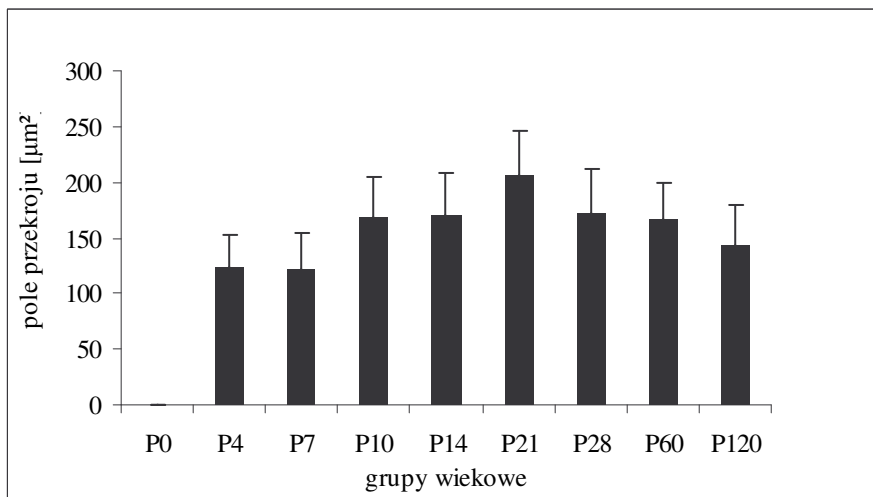
(B)

Ryc. 19. Kolokalizacja NPY i CB (NPY/CB) w neuronach przedmurza w okresie obserwacji: (A) rozkład kształtów neuronów NPY/CB-ir; (B) średnie wartości współczynnika kolokalizacji w populacji neuronów NPY/CB-ir.

Fig. 19. Colocalization of NPY and CB (NPY/CB) in claustral neurons during studied period: (A) distribution of shapes in the population of NPY/CB-ir neurons; (B) mean values of the colocalization coefficient in the population of NPY/CB-ir neurons.



(C)



(D)

Ryc. 19. (ciąg dalszy) Kolokalizacja NPY i CB (NPY/CB) w neuronach przedmurza w okresie obserwacji: (C) wartości stosunku liczby neuronów podwójnie znakowanych NPY/CB do wszystkich pojedynczo znakowanych NPY- oraz CB-ir; (D) średnie wielkości pól przekroju neuronów NPY/CB-ir.

Fig. 19. (continued) Colocalization of NPY and CB (NPY/CB) in claustral neurons during studied period: (C) ratio of the number of NPY/CB-ir neurons to all single-labeled NPY- and CB-ir neurons; (D) mean values of the neuronal cross-section areas of NPY/CB-ir neurons.

Neuropil zawierający neuropeptyd Y oraz kalbindynę D28k

Podwójnie znakowane włókna w tym typie kolokalizacji pojawiają się dopiero po upływie dwóch tygodni po urodzeniu (ryc. 18).

Gęstość podwójnie wyznakowanego neuropilu jest niewielka i nie zmienia się w okresie obserwacji (tab. 9). Widoczne są bardzo cienkie, podwójnie znakowane włókna. Miejsca podziału włókien nerwowych w tym typie kolokalizacji stają się widoczne po upływie trzech tygodni. Dość liczne są podwójnie wyznakowane punkty immunoreaktywne. Maksymalna intensywność znakowania neuropilu występuje w grupie P21.

Kolokalizacja neuropeptydu Y i kalretyniny

Neurony zawierające neuropeptyd Y oraz kalretyninę

Występowanie obu badanych substancji w ciałach komórek nerwowych przedmurza stwierdzono po raz pierwszy w grupie wiekowej P7 (ryc. 20; tab. 10).

Ocena zróżnicowania typów morfologicznych neuronów wskazuje na występowanie komórek jedno-, dwu- i wielobiegunowych w drugim i trzecim tygodniu życia. W późniejszym okresie spotyka się najczęściej neurony dwu- i wielobiegunowe.

Ocena kształtów ciał komórek nerwowych wskazuje na ich duże zróżnicowanie i brak zdecydowanej dominacji neuronów o określonym kształcie w badanej populacji (ryc. 21A). W grupie wiekowej P7 zaobserwowano jedynie neurony owalne i wrzecionowate. W kolejnych grupach wiekowych wzrasta zróżnicowanie kształtów neuronów, jednak najliczniej reprezentowane są nadal neurony owalne oraz wrzecionowate.

Kolokalizacja NPY/CR jest bardzo nieliczna. Współczynnik kolokalizacji osiąga maksymalną wartość 9,5% w badanym okresie (ryc. 21B). Wartość tego współczynnika wzrasta w okresie obserwacji. Neurony podwójnie znakowane stanowią maksymalnie do 14% wszystkich neuronów NPY-ir oraz do 22% wszystkich neuronów CR-ir (ryc. 21C).

Średnie wartości pól przekrojów neuronów podwójnie wyznakowanych nie wykazują istotnych różnic w badanym okresie (ryc. 21D). Średnia wartość pola przekroju neuronu w tej populacji w całym badanym okresie wynosi $144,8 \pm 37,8 \mu\text{m}^2$.

Tab. 10. Ocena jakościowa i ilościowa wybranych parametrów morfologicznych neuronów i neuropilu przedmurza wykazujących kolokalizację NPY/CR.

Tab. 10. Qualitative and semiquantitative assessment of the selected morphological parameters of the claustral neurons and neuropil revealing colocalization NPY/CR.

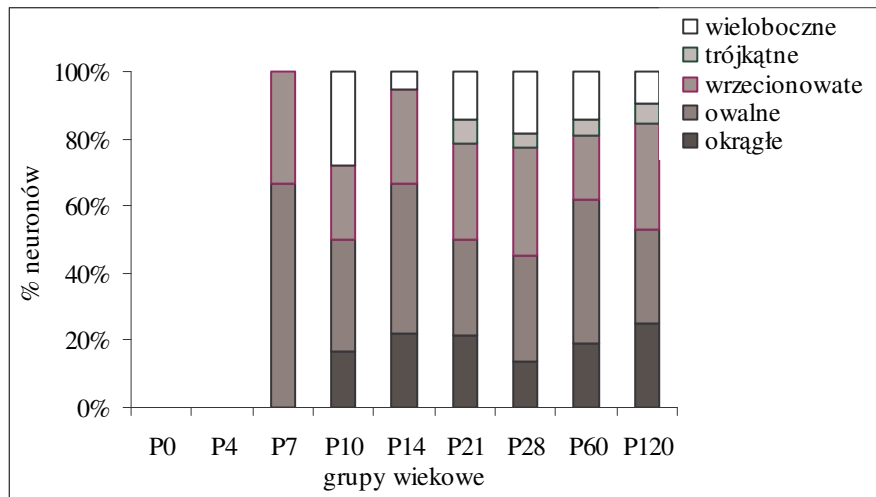
Grupa wiekowa	Kolokalizacja w ciałach neuronów	Bieguność neuronów	Gęstość neuropilu	Intensywność znakowania neuropilu	Żyłakowatości i punkty immunoreaktywne	Wyznakowane rozgałęzienia
<i>Age group</i>	<i>Colocalization in neuronal bodies</i>	<i>Neuronal polarity</i>	<i>Density of neuropil</i>	<i>Intensity of neuropil staining</i>	<i>Varicosities and immunoreactive points</i>	<i>Immuno-reactive ramifications</i>
P0	–		–		–	–
P4	–		–		–	–
P7	+	2, 1, 3	–		–	–
P10	+	2, 1, 3	–		–	–
P14	+	2, 1, 3	+	+	+	–
P21	+	2, 3, 1	+	+	+	+
P28	+	2, 3	+	++	+	+
P60	+	2, 3	+	++	+	+
P120	+	2, 3	+	++	+	+

Neuropil zawierający neuropeptyd Y oraz kalretyninę

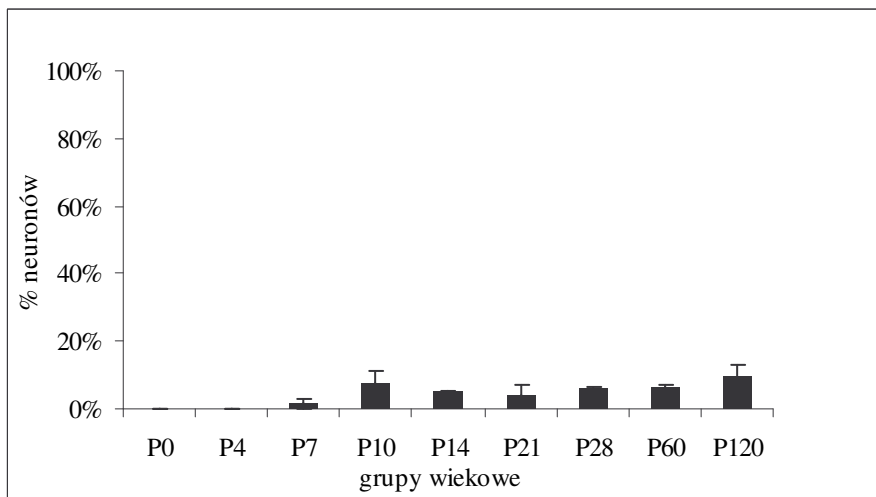
Podwójnie wyznakowane włókna w tym typie kolokalizacji są bardzo nieliczne i zostały zaobserwowane w grupie P14 (tab. 10).

Gęstość podwójnie wyznakowanego neuropilu jest niewielka i nie ulega zmianie w okresie obserwacji. Widoczne są bardzo krótkie odcinki podwójnie wyznakowanych włókien nerwowych oraz nieliczne punkty immunoreaktywne (ryc. 20). Miejsca ich podziału są bardzo nieliczne i pojawiają się w grupie wiekowej P21.

Intensywność znakowania neuropilu w tym typie kolokalizacji wzrasta w ciągu pierwszych czterech tygodni życia.



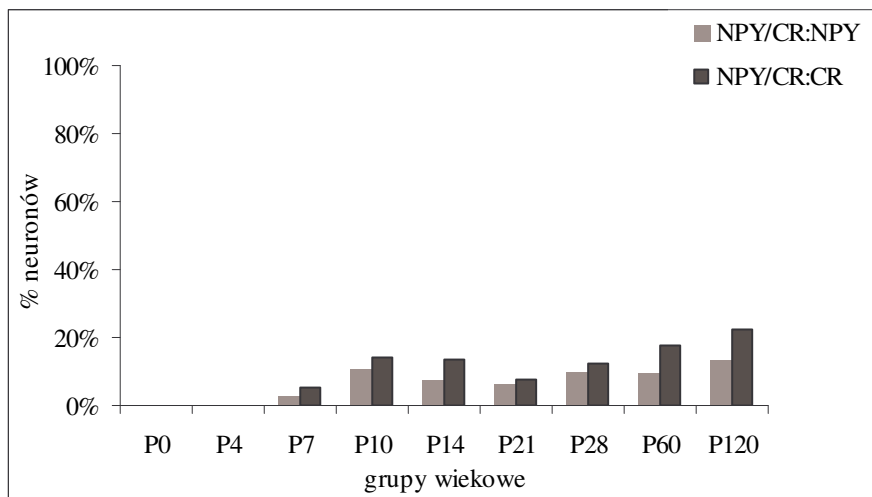
(A)



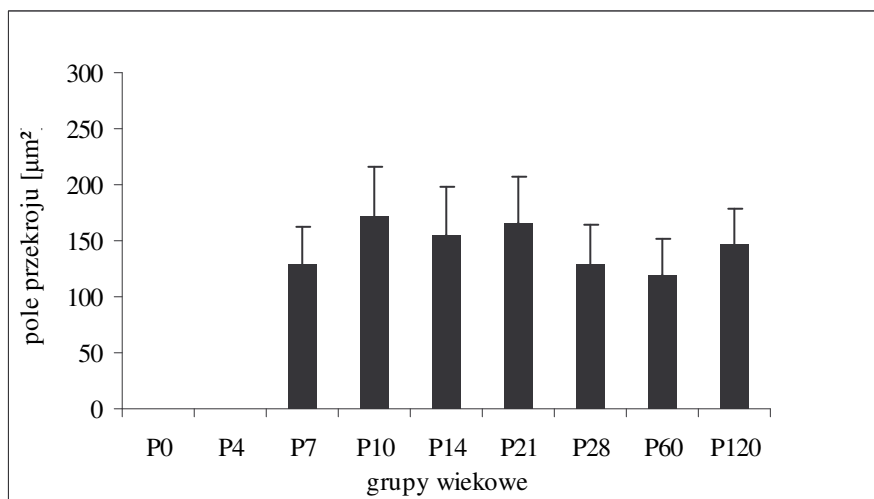
(B)

Ryc. 21. Kolokalizacja NPY i CR (NPY/CR) w neuronach przedmurza w okresie obserwacji: (A) rozkład kształtów neuronów NPY/CR-ir; (B) średnie wartości współczynnika kolokalizacji w populacji neuronów NPY/CR-ir.

Fig. 21. Colocalization of NPY and CR (NPY/CR) in claustral neurons during studied period: (A) distribution of shapes in the population of NPY/CR-ir neurons; (B) mean values of the colocalization coefficient in the population of NPY/CR-ir neurons.



(C)



(D)

Ryc. 21. (ciąg dalszy) Kolokalizacja NPY i CR (NPY/CR) w neuronach przedmurza w okresie obserwacji: (C) wartości stosunku liczby neuronów podwójnie znakowanych NPY/CR do wszystkich pojedynczo znakowanych neuronów NPY- oraz CR-ir; (D) średnie wielkości pól przekroju neuronów NPY/CR-ir.

Fig. 21. (continued) Colocalization of NPY and CR (NPY/CR) in claustral neurons during studied period: (C) ratio of the number of NPY/CR-ir neurons to all single-labeled NPY- and CR-ir neurons; (D) mean values of the neuronal cross-section areas of NPY/CR-ir neurons.

Kolokalizacja neuropeptydu Y i parwalbuminy

Neurony zawierające neuropeptyd Y oraz parwalbuminę

Neurony podwójnie znakowane w tym typie kolokalizacji pojawiają się dopiero w grupie wiekowej P14 (ryc. 22; tab. 11).

W grupie wiekowej P14 występują wszystkie typy morfologiczne neuronów. W kolejnych grupach przeważają neurony wielo- i dwubiegunowe.

Ocena kształtów neuronów wykazuje duże zróżnicowanie w omawianej populacji. Przeważają komórki owalne i wrzecionowate (ryc. 23A), przy czym udział tych ostatnich zwiększa się w badanym okresie. Licznie reprezentowane są pozostałe kształty ciał komórek nerwowych.

Wartość współczynnika kolokalizacji w omawianym typie w ciągu badanego okresu sięga 9% (ryc. 23B). Nie stwierdza się istotnych zmian wartości tego współczynnika w badanym okresie.

Maksymalna wartość stosunku neuronów podwójnie znakowanych NPY/PV do wszystkich neuronów NPY-ir wynosi 15%, a odpowiednia wartość stosunku do wszystkich neuronów PV-ir wynosi 14% (ryc. 23C).

Nie stwierdzono różnic między średnimi wartościami pól przekrojów neuronów podwójnie wyznakowanych w badanym okresie (ryc. 23D). Średnia wartość pola przekroju neuronu w tej populacji w całym badanym okresie wynosi $175,5 \pm 42,3 \mu\text{m}^2$.

Neuropil zawierający neuropeptyd Y oraz parwalbuminę

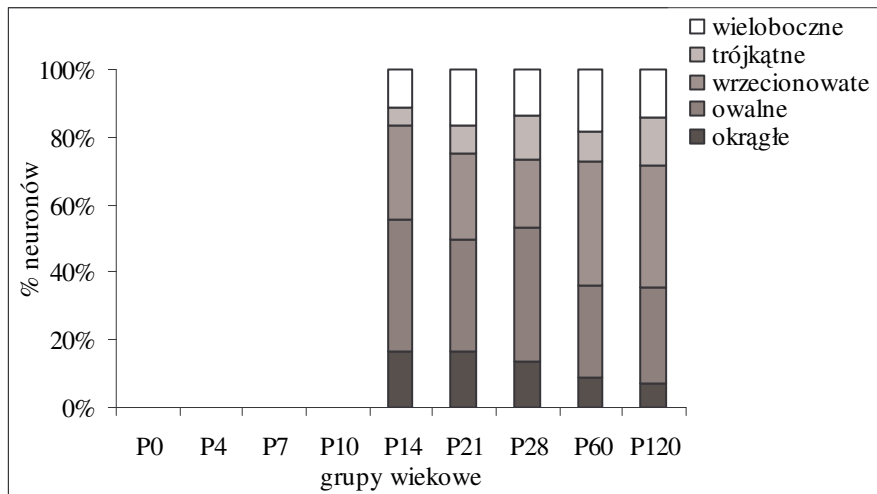
Po upływie drugiego tygodnia życia (P14) pojawiają się podwójnie znakowane włókna, widoczne na krótkich odcinkach, z nielicznymi rozgałęzieniami oraz nieliczne punkty immunoreaktywne (ryc. 22). W starszych grupach wiekowych (P60 i P120) podwójnie wyznakowane fragmenty włókien nerwowych są nieco dłuższe.

Gęstość podwójnie znakowanego neuropilu jest niewielka i nie zmienia się w trakcie dojrzewania (tab. 11). Intensywność znakowania neuropilu w omawianym typie kolokalizacji wzrasta w ciągu pierwszych czterech tygodni życia.

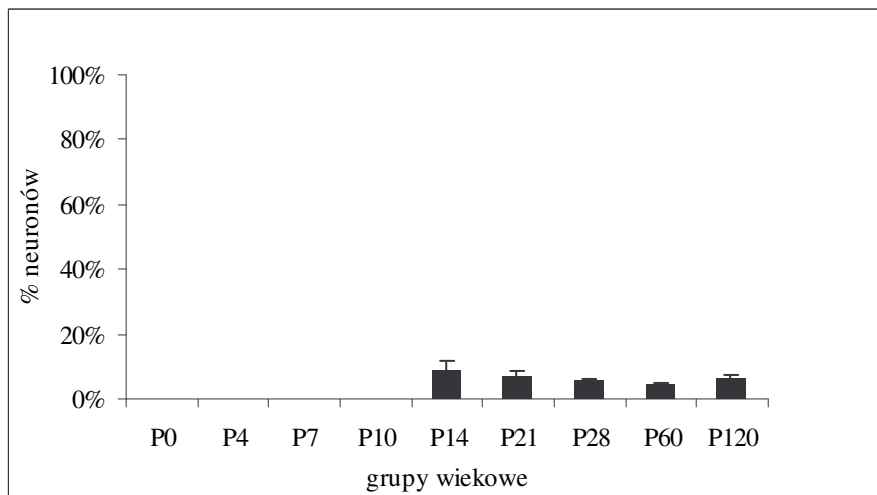
Tab. 11. Ocena jakościowa i ilościowa wybranych parametrów morfologicznych neuronów i neuropilu przedmurza wykazujących kolokalizację NPY/PV.

Tab. 11. Qualitative and semiquantitative assessment of the selected morphological parameters of the claustral neurons and neuropil revealing colocalization NPY/PV.

Grupa wiekowa	Kolokalizacja w ciałach neuronów	Bieguność neuronów	Gęstość neuropilu	Intensywność znakowania neuropilu	Żyłakowatości i punkty immunoreaktywne	Wyznaczone rozgałęzienia
<i>Age group</i>	<i>Colocalization in neuronal bodies</i>	<i>Neuronal polarity</i>	<i>Density of neuropil</i>	<i>Intensity of neuropil staining</i>	<i>Varicosities and immunoreactive points</i>	<i>Immuno-reactive ramifications</i>
P0	–		–		–	–
P4	–		–		–	–
P7	–		–		–	–
P10	–		–		–	–
P14	+	2, 3, 1	+	+	+	+
P21	+	3, 2	+	+	+	+
P28	+	3, 2	+	++	+	+
P60	+	3, 2	+	++	+	+
P120	+	3, 2	+	++	+	+



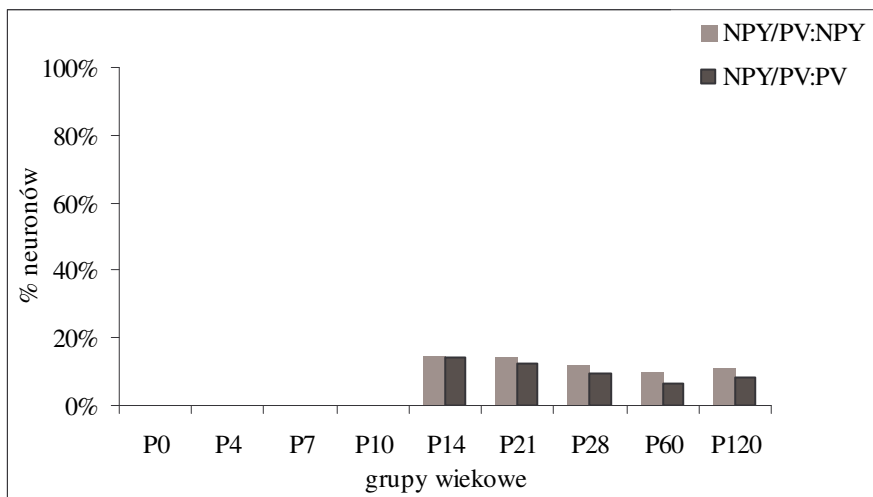
(A)



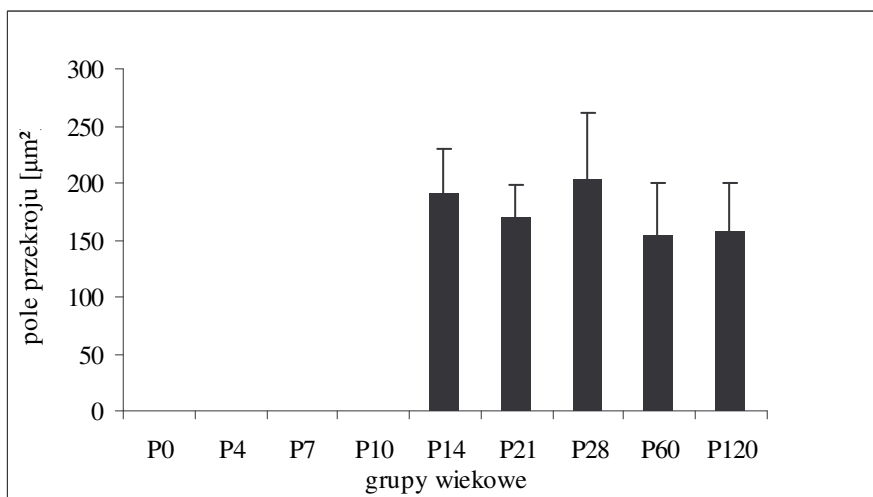
(B)

Ryc. 23. Kolokalizacja NPY i PV (NPY/PV) w neuronach przedmurza w okresie obserwacji: (A) rozkład kształtów neuronów NPY/PV-ir; (B) średnie wartości współczynnika kolokalizacji w populacji neuronów NPY/PV-ir.

Fig. 23. Colocalization of NPY and PV (NPY/PV) in claustral neurons during studied period: (A) distribution of shapes in the population of NPY/PV-ir neurons; (B) mean values of the colocalization coefficient in the population of NPY/PV-ir neurons.



(C)



(D)

Ryc. 23. (ciąg dalszy) Kolokalizacja NPY i PV (NPY/PV) w neuronach przedmurza w okresie obserwacji: (C) wartości stosunku liczby neuronów podwójnie znakowanych NPY/PV do wszystkich pojedynczo znakowanych NPY- oraz PV-ir; (D) średnie wielkości pól przekroju neuronów NPY/PV-ir.

Fig. 23. (continued) Colocalization of NPY and PV (NPY/PV) in claustral neurons during studied period: (C) ratio of the number of NPY/PV-ir neurons to all single-labeled NPY- and PV-ir neurons; (D) mean values of the neuronal cross-section areas of NPY/PV-ir neurons.

Kolokalizacja neuropeptydu Y i syntazy tlenu azotu

Neurony zawierające neuropeptyd Y oraz syntazę tlenu azotu

Neurony podwójnie znakowane wykazujące obecność tej kolokalizacji widoczne są w przedmurzu przez cały okres obserwacji (ryc. 24; tab. 12).

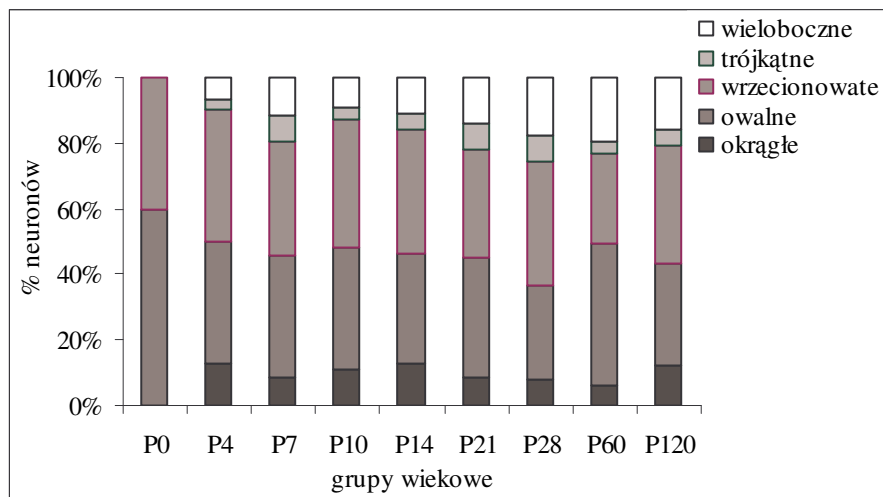
We wszystkich grupach wiekowych przeważają neurony dwubiegunowe. W grupach wiekowych P0 – P10 są obecne neurony reprezentujące wszystkie typy morfologiczne. Po upływie dwóch tygodni życia najczęściej spotyka się neurony dwu- i wielobiegunowe.

Pod względem kształtów ciał komórek nerwowych w całym badanym okresie zaznacza się przewaga neuronów owalnych i wrzecionowatych (ryc. 25A). Ponadto, wzrasta udział neuronów wielobocznych.

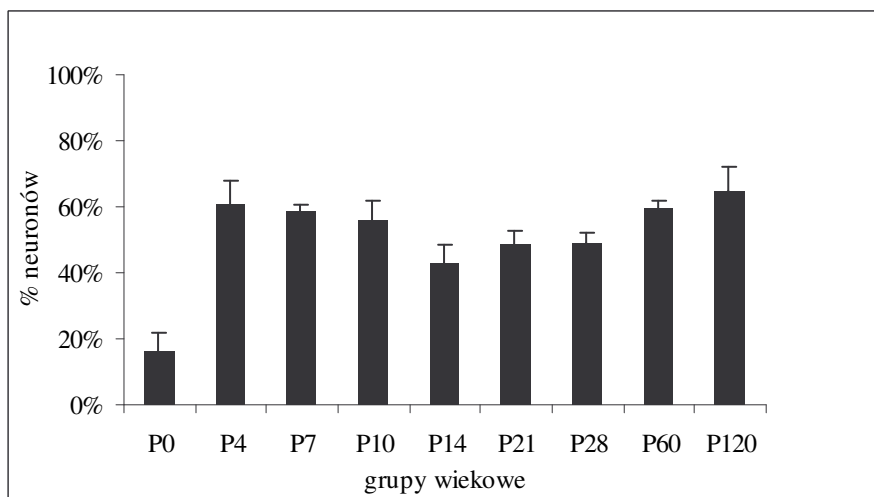
Tab. 12. Ocena jakościowa i ilościowa wybranych parametrów morfologicznych neuronów i neuropilu przedmurza wykazujących kolokalizację NPY/NOS.

Tab. 12. Qualitative and semiquantitative assessment of the selected morphological parameters of the claustral neurons and neuropil revealing colocalization NPY/NOS.

Grupa wiekowa	Kolokalizacja w ciałach neuronów	Biegunowość neuronów	Gęstość neuropilu	Intensywność znakowania neuropilu	Żyłakowatości i punkty immunoreaktywne	Wyznaczone rozgałęzienia
<i>Age group</i>	<i>Colocalization in neuronal bodies</i>	<i>Neuronal polarity</i>	<i>Density of neuropil</i>	<i>Intensity of neuropil staining</i>	<i>Varicosities and immunoreactive points</i>	<i>Immunoreactive ramifications</i>
P0	+	2, 3, 1	++	+	–	+
P4	+	2, 3, 1	++	+	+	+
P7	+	2, 3, 1	++	+	+	+
P10	+	2, 3, 1	++	+	+	+
P14	+	2, 3	++	+	+	+
P21	+	2, 3	++	++	+	+
P28	+	2, 3	++	++	+	+
P60	+	2, 3	++	++	+	+
P120	+	2, 3	++	++	+	+



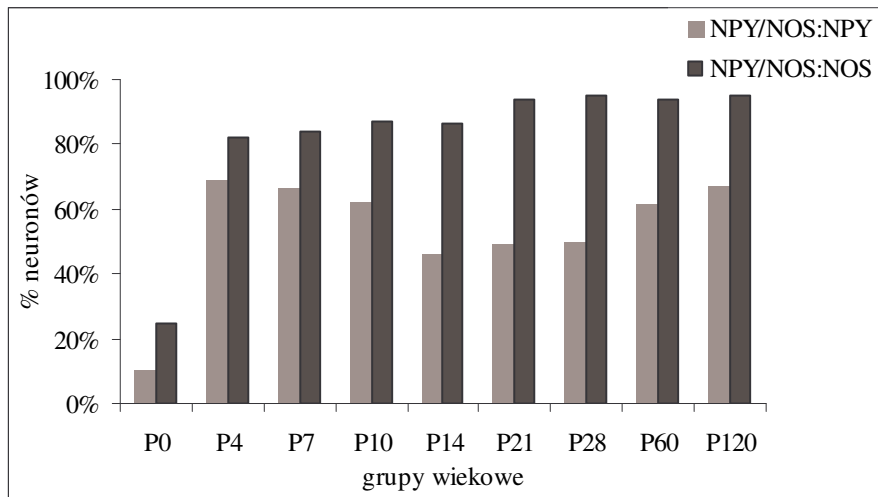
(A)



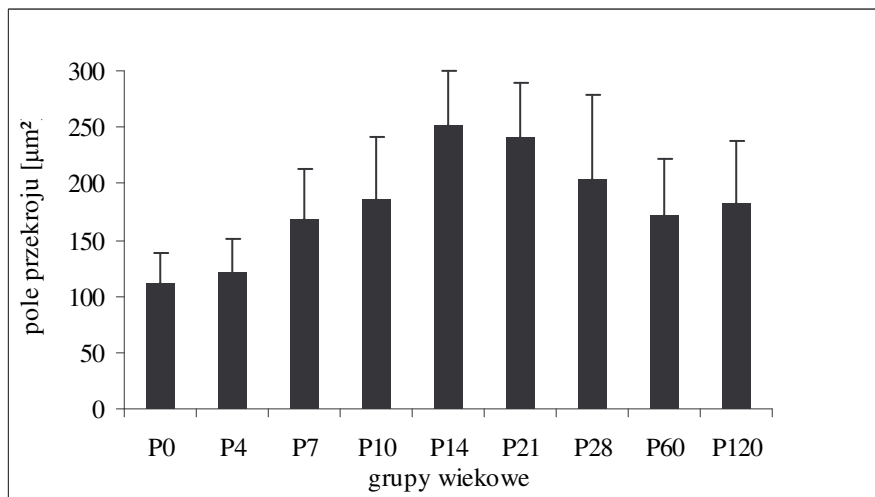
(B)

Ryc. 25. Kolokalizacja NPY i NOS (NPY/NOS) w neuronach przedmurza w okresie obserwacji: (A) rozkład kształtów neuronów NPY/NOS-ir; (B) średnie wartości współczynnika kolokalizacji w populacji neuronów NPY/NOS-ir.

Fig. 25. Colocalization of NPY and NOS (NPY/NOS) in claustral neurons during studied period: (A) distribution of shapes in the population of NPY/NOS-ir neurons; (B) mean values of the colocalization coefficient in the population of NPY/NOS-ir neurons.



(C)



(D)

Ryc. 25. (ciąg dalszy) Kolokalizacja NPY i NOS (NPY/NOS) w neuronach przedmurza w okresie obserwacji: (C) wartości stosunku liczby neuronów podwójnie znakowanych NPY/NOS do wszystkich pojedynczo znakowanych neuronów NPY- oraz NOS-ir; (D) średnie wielkości pól przekroju neuronów NPY/NOS-ir.

Fig. 25. (continued) Colocalization of NPY and NOS (NPY/NOS) in claustral neurons during studied period: (C) ratio of the number of NPY/NOS-ir neurons to all single-labeled NPY- and NOS-ir neurons; (D) mean values of the neuronal cross-section areas of NPY/NOS-ir neurons.

W omawianym typie kolokalizacji występuje wzrost wartości współczynnika kolokalizacji w ciągu pierwszych czterech dni życia (grupy P0, P4; ryc. 25B). Maksymalna wartość współczynnika kolokalizacji w badanym okresie jest wysoka i wynosi 65%. Wartość odsetka neuronów podwójnie wyznakowanych w stosunku do wszystkich neuronów NPY-ir sięga 67%. W stosunku do wszystkich neuronów NOS-ir wartość odsetka neuronów podwójnie znakowanych osiąga 95% (ryc. 25C).

Średnie wartości pól przekroju neuronów podwójnie znakowanych wzrastają, osiągając maksimum w grupie P14 (ryc. 25D). Średnia wartość pola przekroju neuronu w tej populacji w całym badanym okresie wynosi $181,9 \pm 48,1 \mu\text{m}^2$.

Neuropil zawierający neuropeptyd Y oraz syntazę tlenku azotu

Podwójnie wyznakowane fragmenty włókien oraz ich rozgałęzienia obserwuje się już w grupie P0 (ryc. 24). Gęstość podwójnie wyznakowanych włókien nerwowych oraz punktów immunoreaktywnych jest wysoka w ciągu całego okresu obserwacji (tab. 12). Są widoczne długie odcinki grubych, podwójnie wyznakowanych włókien, z liczniejszymi miejscami podziału, a także liczne punkty immunoreaktywne.

Intensywność znakowania neuropilu wzrasta w ciągu pierwszych trzech tygodni życia.

4.4.2. Kolokalizacje z udziałem somatostatyny

Kolokalizacja somatostatyny i kalbindyny D28k

Neurony zawierające somatostatynę i kalbindynę D28k

Podwójnie wyznakowane neurony w tej populacji zaobserwowano po raz pierwszy w grupie wiekowej P7.

Oceniając typy morfologiczne neuronów wykazano w grupach wiekowych P7 oraz P10 obecność komórek jedno-, dwu- i wielobiegunowych (ryc. 26; tab. 13). W dalszym okresie dojrzewania spotyka się przede wszystkim neurony dwu- i wielobiegunowe. Ostateczne ukształtowanie typów morfologicznych w tej populacji zachodzi po upływie czterech tygodni życia, kiedy zaznacza się przewaga neuronów wielobiegunowych.

W omawianym typie kolokalizacji, we wszystkich grupach wiekowych, przeważają neurony o kształcie owalnym i wrzecionowatym (ryc. 27A). Neurony o innych kształtach stanowią niewielki odsetek tej populacji.

W badanym okresie obserwuje się wzrost wartości współczynnika kolokalizacji (ryc. 27B). Najwyższa jego wartość wynosi 31%. Odsetek neuronów podwójnie znakowanych osiąga maksymalną wartość 50% wszystkich neuronów SOM-ir, a jednocześnie 46% neuronów CB-ir (ryc. 27C).

Nie stwierdza się różnic pomiędzy wartościami średnich pól przekrojów neuronów podwójnie znakowanych w badanym okresie (ryc. 27D). Średnia wartość pola przekroju neuronu w tej populacji w całym badanym okresie wynosi $156,8 \pm 39,7 \mu\text{m}^2$.

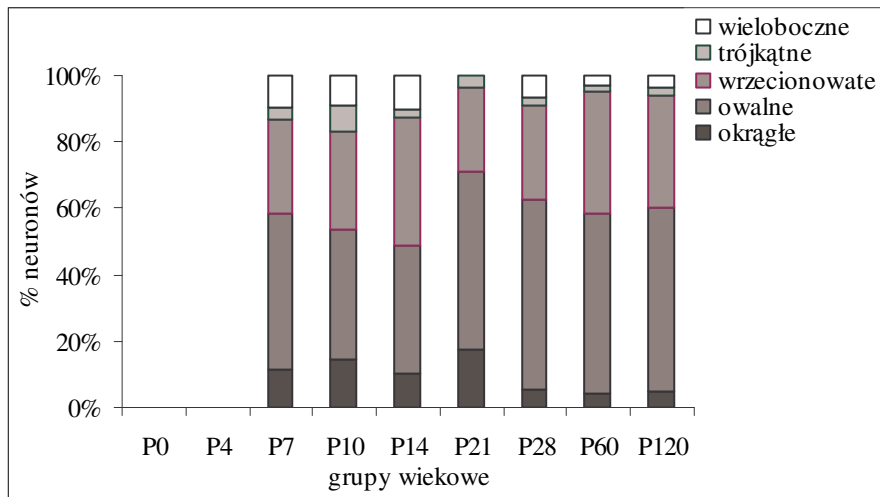
Neuropil zawierający somatostatynę i kalbindynę D28k

Podwójnie wyznakowane, krótkie fragmenty włókien nerwowych pojawiają się w grupie wiekowej P10 (ryc. 26; tab. 13). Dość rzadko obserwuje się miejsca podziałów wyznakowanych włókien. Niezbyt licznie występują punkty immunoreaktywne. Gęstość podwójnie wyznakowanego neuropilu jest niewielka w całym badanym okresie dojrzewania.

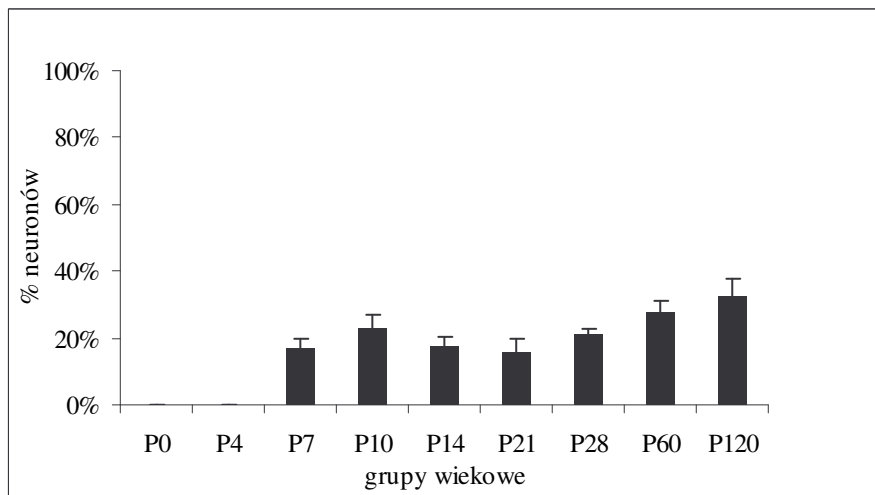
Tab. 13. Ocena jakościowa i ilościowa wybranych parametrów morfologicznych neuronów i neuropilu przedmurza wykazujących kolokalizację SOM/CB.

Tab. 13. *Qualitative and semiquantitative assessment of the selected morphological parameters of the claustral neurons and neuropil revealing colocalization SOM/CB.*

Grupa wiekowa	Kolokalizacja w ciałach neuronów	Bieguność neuronów	Gęstość neuropilu	Intensywność znakowania neuropilu	Żyłakowatości i punkty immunoreaktywne	Wyznakowane rozgałęzienia
<i>Age group</i>	<i>Colocalization in neuronal bodies</i>	<i>Neuronal polarity</i>	<i>Density of neuropil</i>	<i>Intensity of neuropil staining</i>	<i>Varicosities and immunoreactive points</i>	<i>Immuno-reactive ramifications</i>
P0	–		–		–	–
P4	–		–		–	–
P7	+	2, 1, 3	–		–	–
P10	+	2, 3, 1	+	+	+	+
P14	+	2, 3	+	+	+	+
P21	+	2, 3	+	+	+	+
P28	+	3, 2	+	++	+	+
P60	+	3, 2	+	++	+	+
P120	+	3, 2	+	++	+	+



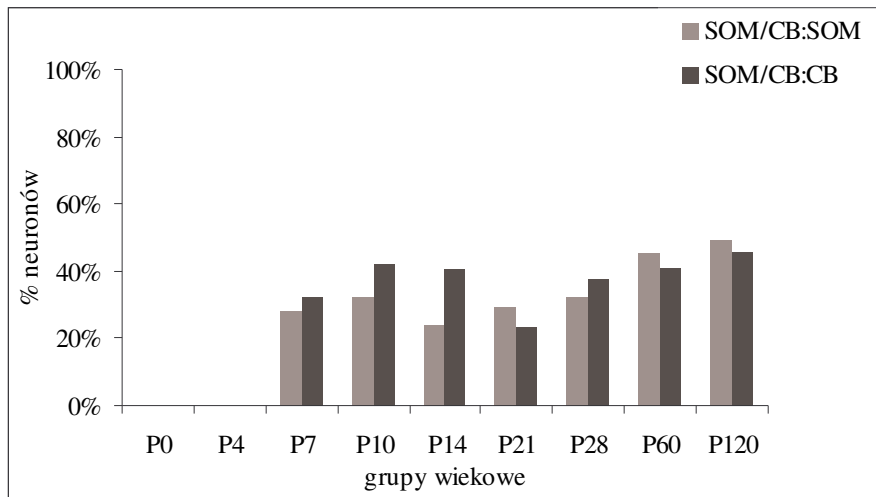
(A)



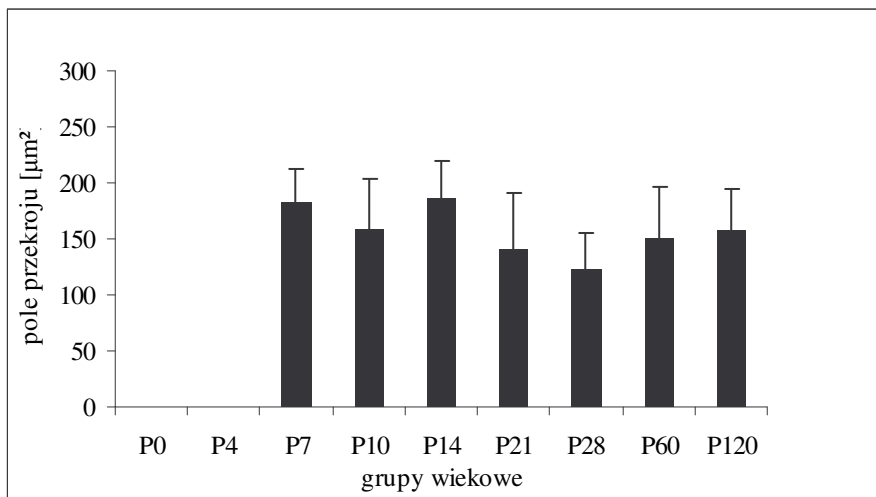
(B)

Ryc. 27. Kolokalizacja SOM i CB (SOM/CB) w neuronach przedmurza w okresie obserwacji: (A) rozkład kształtów neuronów SOM/CB-ir; (B) średnie wartości współczynnika kolokalizacji w populacji neuronów SOM/CB-ir.

Fig. 27. Colocalization of SOM and CB (SOM/CB) in claustral neurons during studied period: (A) distribution of shapes in the population of SOM/CB-ir neurons; (B) mean values of the colocalization coefficient in the population of SOM/CB-ir neurons.



(C)



(D)

Ryc. 27. (ciąg dalszy) Kolokalizacja SOM i CB (SOM/CB) w neuronach przedmurza w okresie obserwacji: (C) wartości stosunku liczby neuronów podwójnie znakowanych SOM/CB do wszystkich pojedynczo znakowanych neuronów SOM- oraz CB-ir; (D) średnie wielkości pól przekroju neuronów SOM/CB-ir.

Fig. 27. (continued) Colocalization of SOM and CB (SOM/CB) in claustral neurons during studied period: (C) ratio of the number of SOM/CB-ir neurons to all single-labeled SOM- and CB-ir neurons; (D) mean values of the neuronal cross-section areas of SOM/CB-ir neurons.

Intensywność znakowania neuropilu jest umiarkowana w momencie pojawienia się kolokalizacji (P10) i wzrasta do końca czwartego tygodnia życia zwierzęcia.

Kolokalizacja somatostatyny i syntazy tlenku azotu

Neurony zawierające somatostatynę i syntazę tlenku azotu

Podwójnie wyznakowane neurony w tym typie kolokalizacji widoczne są we wszystkich grupach wiekowych (tab. 14; ryc. 28).

Oceniając typy morfologiczne stwierdzono przewagę neuronów dwubiegunowych w całym badanym okresie. W drugim tygodniu życia w tej populacji występują wszystkie typy morfologiczne neuronów. W dalszym okresie dojrzewania spotyka się najczęściej neurony dwu- i wielobiegunowe.

W omawianym typie kolokalizacji zaznacza się zróżnicowanie kształtów neuronów podwójnie znakowanych. W pierwszym tygodniu życia spotyka się najczęściej neurony wrzecionowate i owalne (ryc. 29A). Poczynając od 10 dnia po urodzeniu pojawia się coraz więcej neuronów wielobocznych. Neurony reprezentujące trzy wymienione wyżej kształty dominują w kolejnych grupach wiekowych, do końca okresu obserwacji.

Wartości współczynnika kolokalizacji nie wykazują istotnych zmian w badanym okresie (ryc. 29B). Najwyższa wartość odsetka neuronów podwójnie wyznakowanych w tym typie kolokalizacji wynosi 39%. W okresie obserwacji odsetek neuronów podwójnie wyznakowanych SOM/NOS osiąga maksymalną wartość do 49% wszystkich neuronów SOM-ir, a jednocześnie neurony podwójnie znakowane stanowią maksymalnie do 91% wszystkich neuronów NOS-ir (ryc. 29C).

Średnie wartości pól przekrojów neuronów podwójnie wyznakowanych nie wykazują istotnych różnic w badanym okresie (ryc. 29D). Średnia wartość pola przekroju neuronu w tej populacji w całym badanym okresie wynosi $140,6 \pm 36,6 \mu\text{m}^2$.

Neuropil zawierający somatostatynę i syntazę tlenku azotu

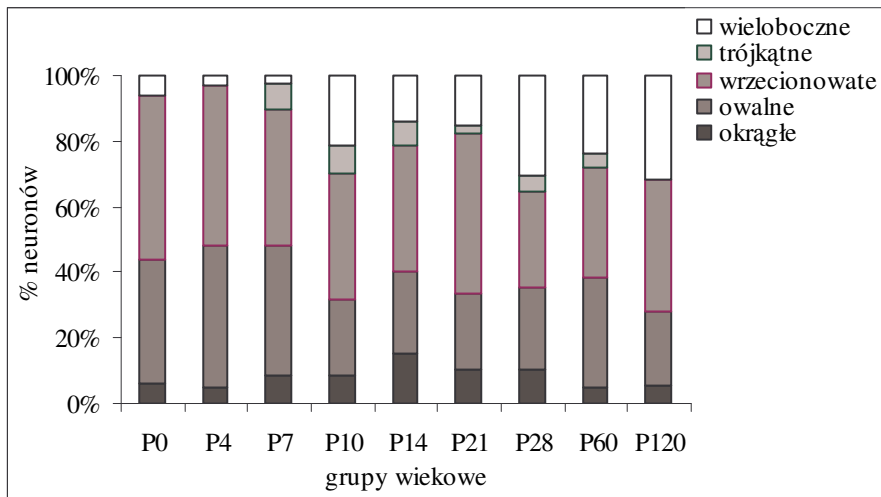
Podwójnie znakowane włókna oraz punkty immunoreaktywne w tym typie kolokalizacji widoczne są w ciągu całego okresu obserwacji (tab. 14; ryc. 28). Jednak gęstość podwójnie wyznakowanego neuropilu jest niewielka. Widoczne są fragmenty włókien o zróżnicowanej długości, z żyłkowatościami. We wszystkich grupach wiekowych można znaleźć wyznakowane miejsca podziału włókien nerwowych.

Intensywność znakowania neuropilu w tym typie kolokalizacji wzrasta w ciągu pierwszych dwóch tygodni od urodzenia szczura.

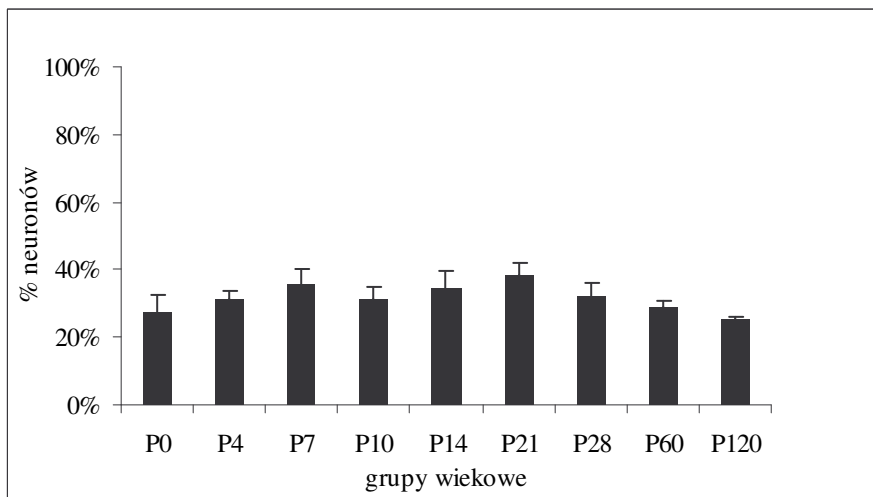
Tab. 14. Ocena jakościowa i ilościowa wybranych parametrów morfologicznych neuronów i neuropilu przedmurza wykazujących kolokalizację SOM/NOS.

Tab. 14. Qualitative and semiquantitative assessment of the selected morphological parameters of the claustral neurons and neuropil revealing colocalization SOM/NOS.

Grupa wiekowa	Kolokalizacja w ciałach neuronów	Biegunowość neuronów	Gęstość neuropilu	Intensywność znakowania neuropilu	Żyłakowatości i punkty immunoreaktywne	Wyznaczone rozgałęzienia
<i>Age group</i>	<i>Colocalization in neuronal bodies</i>	<i>Neuronal polarity</i>	<i>Density of neuropil</i>	<i>Intensity of neuropil staining</i>	<i>Varicosities and immunoreactive points</i>	<i>Immuno-reactive ramifications</i>
P0	+	2,1	+	+	+	+
P4	+	2, 1	+	+	+	+
P7	+	2, 1	+	+	+	+
P10	+	2, 1, 3	+	+	+	+
P14	+	2, 3, 1	+	++	+	+
P21	+	2, 3	+	++	+	+
P28	+	2, 3	+	++	+	+
P60	+	2, 3	+	++	+	+
P120	+	2, 3	+	++	+	+



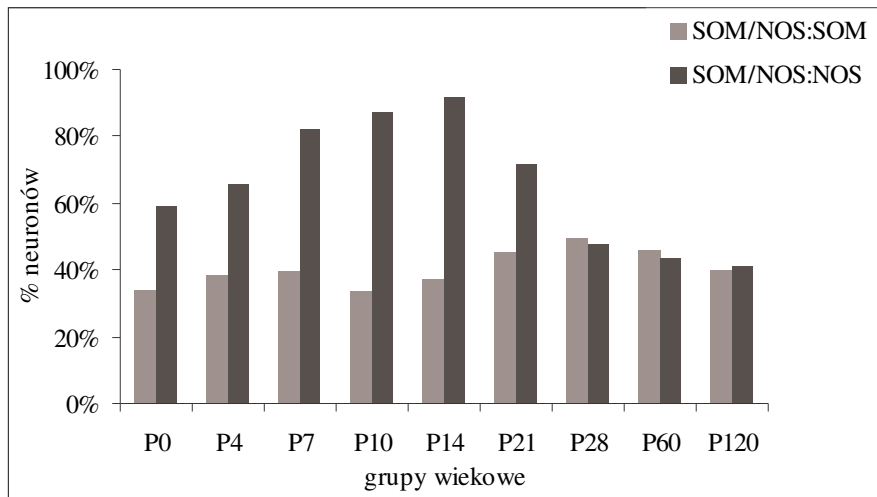
(A)



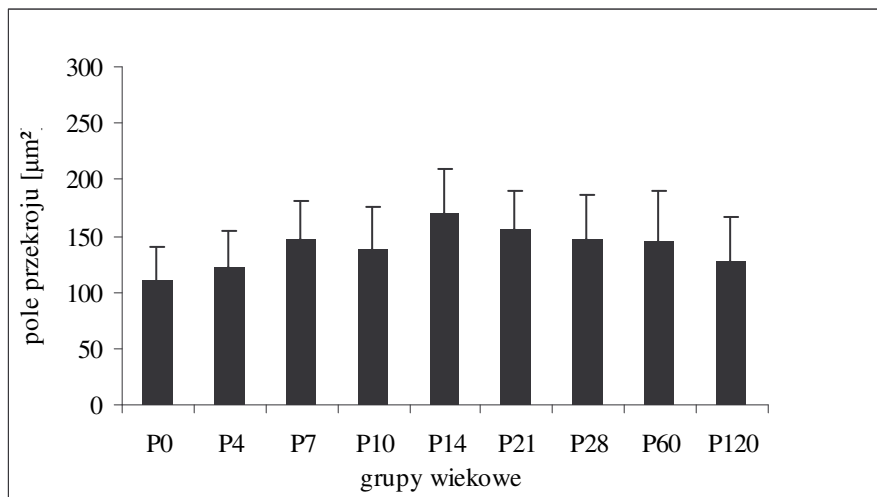
(B)

Ryc. 29. Kolokalizacja SOM i NOS (SOM/NOS) w neuronach przedmurza w okresie obserwacji: (A) rozkład kształtów neuronów SOM/NOS-ir; (B) średnie wartości współczynnika kolokalizacji w populacji neuronów SOM/NOS-ir.

Fig. 29. Colocalization of SOM and NOS (SOM/NOS) in claustral neurons during studied period: (A) distribution of shapes in the population of SOM/NOS-ir neurons; (B) mean values of the colocalization coefficient in the population of SOM/NOS-ir neurons.



(C)



(D)

Ryc. 29. (ciąg dalszy) Kolokalizacja SOM i NOS (SOM/NOS) w neuronach przedmurza w okresie obserwacji: (C) wartości stosunku liczby neuronów podwójnie znakowanych SOM/NOS do wszystkich pojedynczo znakowanych neuronów SOM- oraz NOS-ir; (D) średnie wielkości pól przekroju neuronów SOM/NOS-ir.

Fig. 29. (continued) Colocalization of SOM and NOS (SOM/NOS) in claustral neurons during studied period: (C) ratio of the number of SOM/NOS-ir neurons to all single-labeled SOM- and NOS-ir neurons; (D) mean values of the neuronal cross-section areas of SOM/NOS-ir neurons.

4.4.3. Kolokalizacje z udziałem wazoaktywnego peptydu jelitowego

Kolokalizacja wazoaktywnego peptydu jelitowego i kalretyniny

Neurony zawierające wazoaktywny peptyd jelitowy i kalretyninę

Podwójnie wyznakowane neurony VIP/CR-ir występują w całym badanym okresie dojrzewania (tab. 15; ryc. 30).

W przedziale grup wiekowych P0 – P10 spotyka się przeważnie neurony jedno- i dwubiegunowe. W późniejszym okresie czasu najliczniej występują neurony dwu- oraz wielobiegunowe.

Pod względem zróżnicowania kształtów ciał komórek nerwowych omawiana populacja wykazuje przewagę neuronów owalnych i wrzecionowatych w całym badanym okresie (ryc. 31A). Zróżnicowanie kształtów komórek nerwowych zwiększa się w drugim tygodniu życia.

W okresie obserwacji stwierdza się wzrost wartości współczynnika kolokalizacji (ryc. 31B). Najwyższa wartość współczynnika kolokalizacji wynosi 51%. W tym typie kolokalizacji odsetek neuronów podwójnie znakowanych, w stosunku do wszystkich neuronów VIP-ir, stanowi maksymalnie 71%, a w stosunku do wszystkich neuronów CR-ir, stanowi maksymalnie 75% (ryc. 31C).

Nie stwierdza się istotnych różnic pomiędzy wartościami średnich pól przekroju neuronów podwójnie wyznakowanych w badanym okresie (ryc. 31D). Średnia wartość pola przekroju neuronu w tej populacji w całym badanym okresie wynosi $127,0 \pm 27,1 \mu\text{m}^2$.

Neuropil zawierający wazoaktywny peptyd jelitowy i kalretyninę

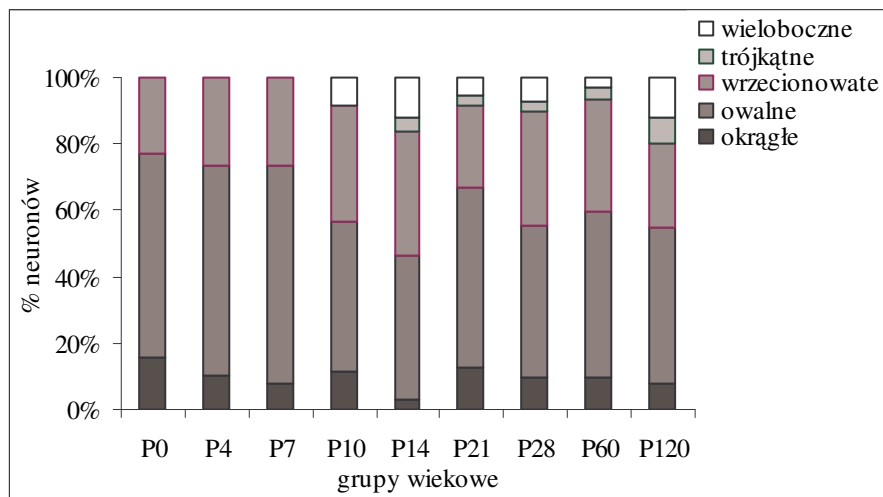
Pierwsze i nieliczne, podwójnie wyznakowane włókna VIP/CR-ir pojawiają się w czwartym dniu po urodzeniu (ryc. 30). Nielicznie występują podwójnie wyznakowane punkty immunoreaktywne. Gęstość podwójnie wyznakowanego neuropilu w badanym okresie jest bardzo niska (tab. 15). Wraz z wiekiem zwiększa się nieznacznie długość wyznakowanych podwójnie fragmentów włókien nerwowych. Podwójnie znakowane rozgałęzienia włókien stają się widoczne po upływie dwóch tygodni.

Intensywność znakowania neuropilu wzrasta bardzo nieznacznie w ciągu pierwszych trzech tygodni życia zwierzęcia.

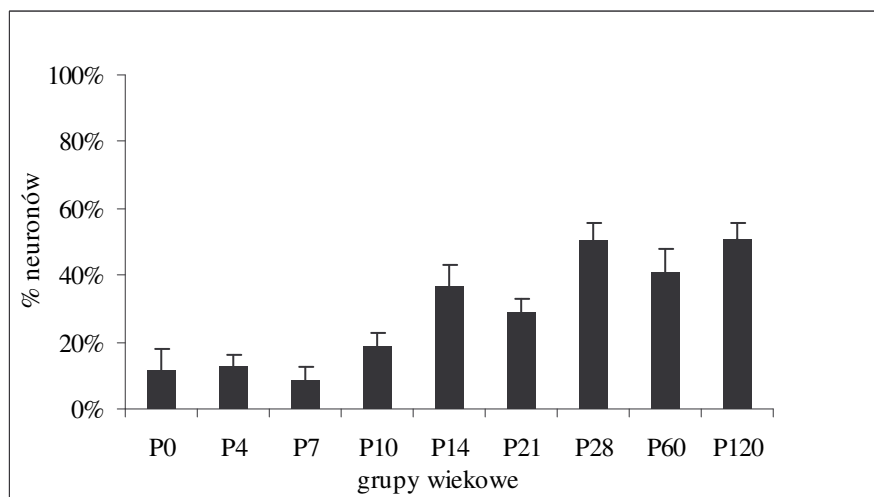
Tab. 15. Ocena jakościowa i ilościowa wybranych parametrów morfologicznych neuronów i neuropilu przedmurza wykazujących kolokalizację VIP/CR.

Tab. 15. Qualitative and semiquantitative assessment of the selected morphological parameters of the claustral neurons and neuropil revealing colocalization VIP/CR.

Grupa wiekowa	Kolokalizacja w ciałach neuronów	Bieguność neuronów	Gęstość neuropilu	Intensywność znakowania neuropilu	Żyłakowatości i punkty immunoreaktywne	Wyznaczone rozgałęzienia
<i>Age group</i>	<i>Colocalization in neuronal bodies</i>	<i>Neuronal polarity</i>	<i>Density of neuropil</i>	<i>Intensity of neuropil staining</i>	<i>Varicosities and immunoreactive points</i>	<i>Immunoreactive ramifications</i>
P0	+	2, 1	–		–	–
P4	+	2, 1	+	+	+	–
P7	+	2, 1	+	+	+	–
P10	+	2, 1	+	+	+	–
P14	+	2, 3	+	+	+	+
P21	+	2, 3	+	++	+	+
P28	+	2, 3	+	++	+	+
P60	+	2, 3	+	++	+	+
P120	+	2, 3	+	++	+	+



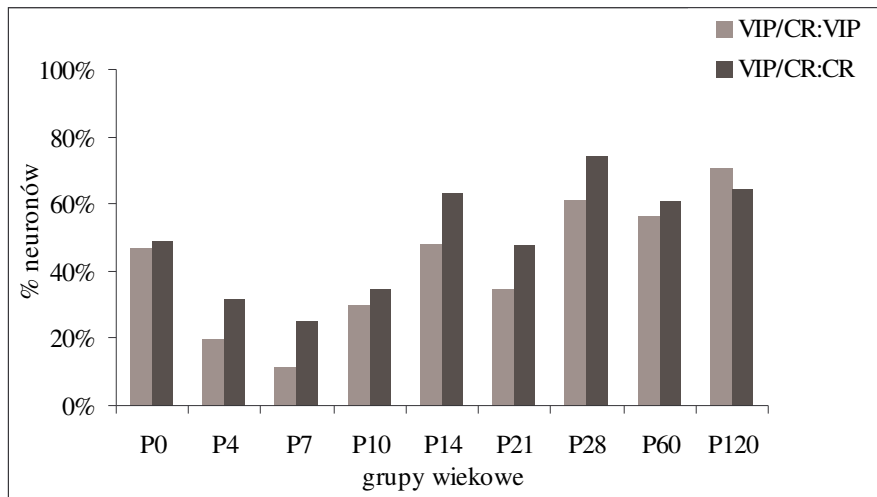
(A)



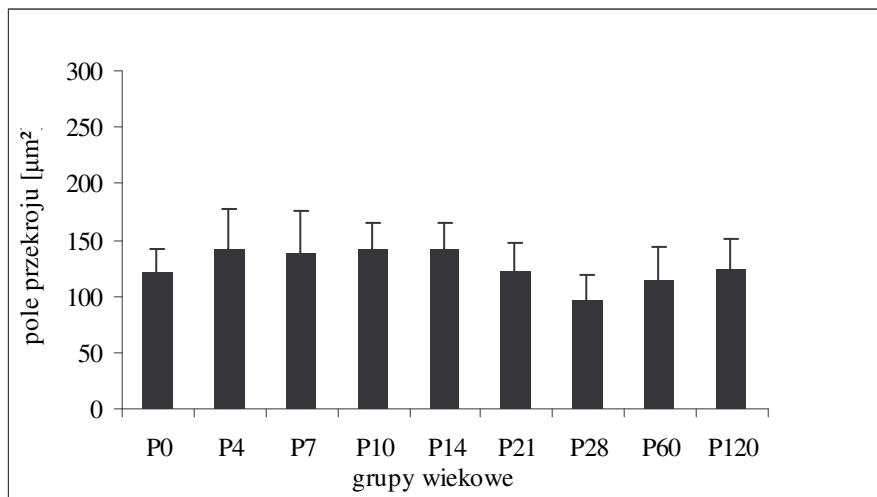
(B)

Ryc. 31. Kolokalizacja VIP i CR (VIP/CR) w neuronach przedmurza w okresie obserwacji: (A) rozkład kształtów neuronów VIP/CR-ir; (B) średnie wartości współczynnika kolokalizacji w populacji neuronów VIP/CR-ir.

Fig. 31. Colocalization of VIP and CR (VIP/CR) in claustral neurons during studied period: (A) distribution of shapes in the population of VIP/CR-ir neurons; (B) mean values of the colocalization coefficient in the population of VIP/CR-ir neurons.



(C)



(D)

Ryc. 31. (ciąg dalszy) Kolokalizacja VIP i CR (VIP/CR) w neuronach przedmurza w okresie obserwacji: (C) wartości stosunku liczby neuronów podwójnie znakowanych VIP/CR do wszystkich pojedynczo znakowanych neuronów VIP- oraz CR-ir; (D) średnie wielkości pól przekroju neuronów VIP/CR-ir .

Fig. 31. (continued) Colocalization of VIP and CR (VIP/CR) in claustral neurons during studied period: (C) ratio of the number of VIP/CR-ir neurons to all single-labeled VIP- and CR-ir neurons; (D) mean values of the neuronal cross-section areas of VIP/CR-ir neurons.

4.5. Podsumowanie wyników dotyczących kolokalizacji neuropeptydów z białkami wiążącymi wapń lub syntazą tlenu azotu w okresie dojrzewania przedmurza

Populacja neuronów przedmurza zawierająca badane neuropeptydy jest zróżnicowana ze względu na swą charakterystykę immunocytochemiczną, wykazując kolokalizację z badanymi białkami wiążącymi wapń lub syntazą tlenu azotu. Stwierdzono obecność kolokalizacji neuropeptydu Y z trzema białkami wiążącymi wapń: kalbindyną D28k, kalretyniną, oraz parwalbuminą, a także z syntazą tlenu azotu. W neuronach zawierających somatostatynę wykazano jej kolokalizację z kalbindyną D28k lub z syntazą tlenu azotu. Ponadto, wazoaktywny peptyd jelitowy wykazuje kolokalizację z kalretyniną.

Pojawienie się poszczególnych typów kolokalizacji w neuronach przedmurza przypada na różne etapy dojrzewania. W dniu urodzenia (P0) w neuronach przedmurza stwierdza się obecność kolokalizacji NPY/NOS, SOM/NOS oraz VIP/CR (tab. 16). Kolokalizacja NPY/CB jest obserwowana poczynając od czwartego dnia po urodzeniu. Po upływie tygodnia pojawiają się kolokalizacje NPY/CR oraz SOM/CB. Po upływie dwóch tygodni spotyka się kolokalizację NPY/PV.

W badanym okresie stwierdzono wzrost wartości odsetka neuronów podwójnie znakowanych w przypadku kolokalizacji neuropeptydu Y - NPY/CB, NPY/CR, NPY/NOS, somatostatyny – SOM/CB oraz wazoaktywnego peptydu jelitowego – VIP/CR. Nie stwierdzono wzrostu wartości odsetka neuronów podwójnie znakowanych w przypadku kolokalizacji NPY/PV oraz SOM/NOS.

Wielkość kolokalizacji jest zróżnicowana. Najwyższe wartości udziałów neuronów podwójnie znakowanych stwierdzono w przypadku typów kolokalizacji: NPY/NOS (65%) VIP/CR (51%) oraz SOM/NOS (39%). Niższe wartości wykazują kolokalizacje: NPY/CB (32%), SOM/CB (31%). Najniższe wartości stwierdzono w przypadku kolokalizacji: NPY/CR (9,5%), NPY/PV (9%).

Ocena typów morfologicznych neuronów podwójnie znakowanych wskazuje na przewagę komórek dwubiegunowych. Jedynie w przypadku kolokalizacji NPY/PV oraz SOM/CB w okresie dojrzewania przewagę zdobywają komórki wielobiegunowe.

We wszystkich typach kolokalizacji stwierdza się znaczne zróżnicowanie kształtów ciał komórek nerwowych, z dużym udziałem neuronów owalnych i wrzecionowatych.

Wzrost wartości średnich pól przekrojów neuronów w okresie obserwacji stwierdzono w przypadku populacji neuronów NPY/NOS-ir. Średnie wartości

pól przekroju neuronów podwójnie znakowanych we wszystkich typach kolokalizacji, w całym badanym okresie, nie wykazują istotnych różnic.

Tab. 16. Występowanie kolokalizacji neuropeptydów z białkami wiążącymi wapń lub syntazą tlenu azotu w neuronach przedmurza w okresie dojrzewania.

Tab. 16. Occurrence of colocalization of neuropeptides with calcium binding proteins or nitric oxide synthase in the claustral neurons during maturation.

Grupa wiekowa <i>Age group</i>	Kolokalizacje NPY <i>Colocalizations of NPY</i>				Kolokalizacje SOM <i>Colocalizations of SOM</i>		Kolokalizacje VIP <i>Colocalizations of VIP</i>
	NPY/CB	NPY/CR	NPY/PV	NPY/NOS	SOM/CB	SOM/NOS	VIP/CR
P0	–	–	–	○	–	○	○
P4	○	–	–	○	–	○	○
P7	○	○	–	○	○	○	○
P10	○	○	–	○	○	○	○
P14	○	○	○	○	○	○	○
P21	●	○	○	●	○	●	●
P28	●	●	●	●	●	●	●
P60	●	●	●	●	●	●	●
P120	●	●	●	●	●	●	●

Objaśnienia oznaczeń użytych w tabeli:

- (–) – brak podwójnego znakowania immunocytochemicznego neuronów;
- (○) – obecność podwójnego znakowania immunocytochemicznego;
- (●) – występowanie cech dojrzałości morfologicznej w badanej populacji podwójnie znakowanych neuronów przedmurza.

Explanations of the table:

- (–) – lack of double immunocytochemical staining of neurons;
- (○) – presence of double immunocytochemical staining of neurons;
- (●) – occurrence of the features of morphological maturation in the studied population of double labeled claustral neurons.

Ocena morfologiczna podwójnie wyznakowanego neuropilu wykazuje niewielką jego gęstość w okresie dojrzewania oraz wzrastającą intensywność znakowania.

Podsumowując, obraz pełnej dojrzałości morfologicznej populacji podwójnie znakowanych neuronów oraz neuropilu jest osiągany po upływie trzech lub czterech tygodni, w zależności od typu kolokalizacji.

4.6. Ocena dojrzewania populacji neuronów projekcyjnych przedmurza w oparciu o metodę wstecznego transportu aksonalnego

Rozmieszczenie neuronów projekcyjnych w przedmurzu

Po podaniu znacznika fluorescencyjnego do kory somatosensorycznej, wyznakowane wstecznie neurony występują w obrębie somatosensorycznej strefy projekcyjnej przedmurza. Zagęszczenie neuronów projekcyjnych jest największe w grzbietowej części badanej struktury (ryc. 32). Taki wzorzec rozmieszczenia neuronów projekcyjnych pojawia się już w grupie wiekowej P7 i utrzymuje w całym okresie obserwacji.

Analizując rozmieszczenie neuronów projekcyjnych wzdłuż osi przednio-tylnej przedmurza stwierdzono, że neurony te widoczne są na całej długości badanej struktury. Względem osi poprzecznej neurony projekcyjne rozmieszczone są równomiernie. Podobny wzorzec rozmieszczenia neuronów projekcyjnych zaobserwowano we wszystkich grupach wiekowych.

Wartości odsetka neuronów wyznakowanych, położonych na pojedynczym preparacie, wzrastają w tylnej części przedmurza (ryc. 33A). Maksymalne wartości osiągnięte są w przedziale zawartym pomiędzy 60%, a 100% długości badanej struktury. Nie stwierdzono istotnych różnic w rozmieszczeniu neuronów projekcyjnych pomiędzy badanymi grupami wiekowymi.

Rozkład kształtów neuronów projekcyjnych

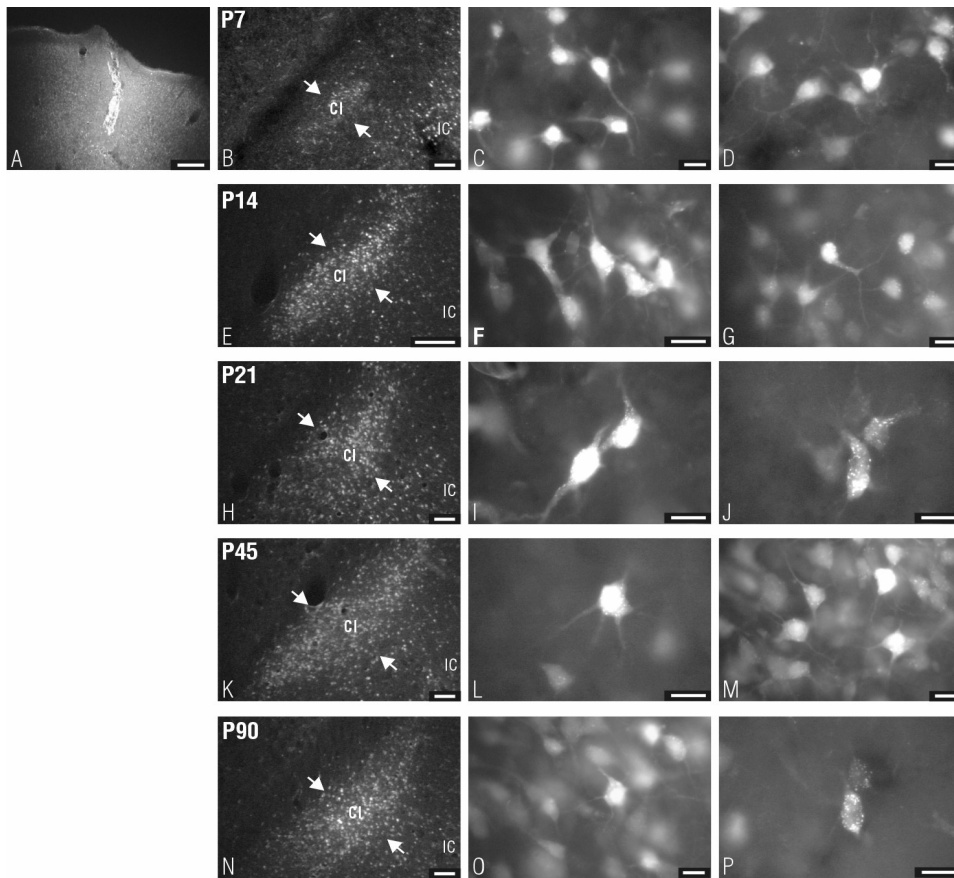
Populacja neuronów projekcyjnych jest bardzo zróżnicowana morfologicznie (ryc. 32). We wszystkich grupach wiekowych obserwuje się przewagę neuronów wielo- i dwubiegunowych. Jedynie w grupie P7 stwierdzono obecność nielicznych komórek jednobiegunowych.

Ocena kształtów ciał komórek nerwowych wskazuje na przewagę neuronów owalnych, wielobocznych i wrzecionowatych we wszystkich grupach wiekowych. Udziały neuronów reprezentujących poszczególne kształty zmieniają się wraz z wiekiem (ryc. 33B).

Nie stwierdzono różnic w rozkładach kształtów neuronów projekcyjnych położonych w części przedniej, środkowej, bądź tylnej przedmurza.

W grupie wiekowej P7 zaobserwowano neurony projekcyjne reprezentujące wszystkie typy kształtów. Najliczniej występują neurony o ciałach owalnych i wrzecionowatych. Wyznakowane neurony charakteryzują się dobrze widocznym zarysem jądra komórkowego oraz stosunkowo niewielką objętością

cytoplazmy. Wypustki, niezbyt dobrze wyznakowane, są często poszerzone w swych początkowych odcinkach.



Ryc. 32 Neurony somatosensorycznej strefy projekcyjnej przedmurza wyznakowane metodą wstecznego transportu aksonalnego. Miejsce podania znacznika do kory somatosensorycznej (A); wyznakowane ciała neuronów, położonych w obrębie stref projekcyjnych w przedmurzu są widoczne we wszystkich grupach wiekowych (P7-P90); we wszystkich grupach przeważają neurony dwu- i wielobiegunowe, o ciałach owalnych, wielobocznych i wrzecionowatych, z wyznakowanymi początkowymi odcinkami dendrytów; skróty: Cl-przedmurze, IC-kora wyspowa. Długość skali: A, B, E, H, K, N = 250 μ m, C, D, F, G, I, J, L, M, O, P = 20 μ m.

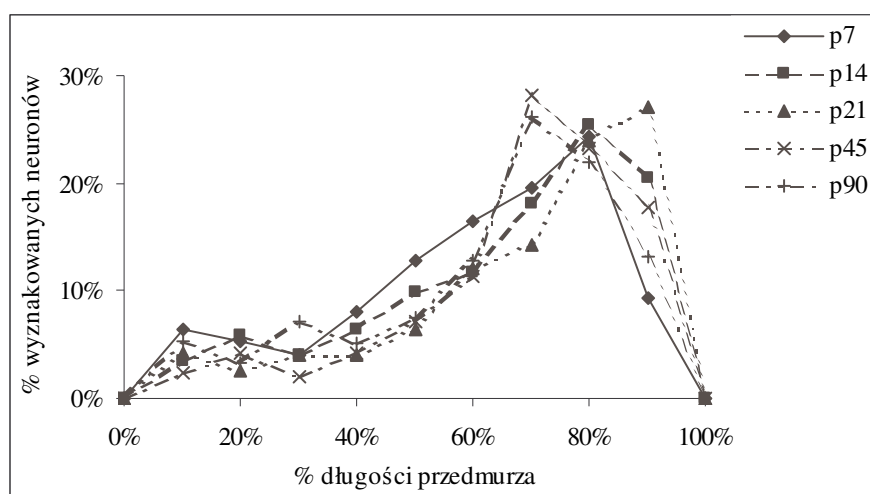
Fig. 32 Neurons of the claustral somatosensory projecting zone labeled by the method of retrograde axonal transport. Place of the tracer injection into the somatosensory cortex (A); labeled neuronal bodies, localized in the projection zones of the claustrum are present in all age groups (P7-P90); in all groups predominate bipolar and multipolar neurons, of oval, multiangular and fusiform bodies, with labeled proximal fragments of dendrites; abbreviations: Cl-claustrum, IC-insular cortex. Scale bar: A, B, E, H, K, N = 250 μ m, C, D, F, G, I, J, L, M, O, P = 20 μ m.

W grupie wiekowej P14 stwierdzono większy niż w poprzedniej grupie udział neuronów wielobocznych. Obraz ciał komórek nerwowych oraz początkowych odcinków wypustek jest podobny, jak w poprzedniej grupie wiekowej.

W kolejnych grupach wiekowych (P21–P90) widoczne są liczne neurony projekcyjne, wielo- i dwubiegunowe, o ciałach wielobocznych, wrzecionowatych i owalnych. Cytoplazma tych komórek jest nieco intensywniej wyznakowana i posiada większą względną objętość niż w neuronach młodszych grup wiekowych. Początkowe fragmenty wypustek są niezbyt intensywnie wyznakowane, podobnie jak w neuronach spotykanych w poprzednio omawianych grupach wiekowych. Wypustki są przeważnie nieco bardziej wysmukłe niż w neuronach występujących w grupach wiekowych P7 i P14.

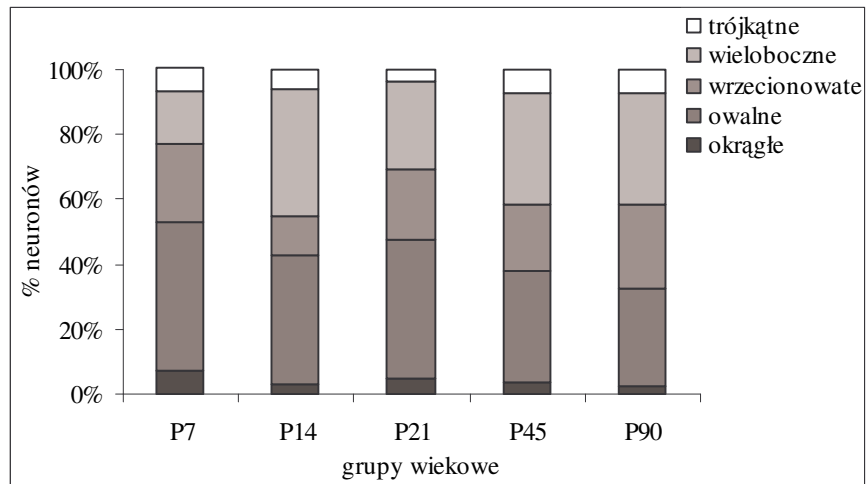
Gęstość numeryczna neuronów projekcyjnych

Ocena wartości średniej gęstości numerycznej neuronów wstecznie wyznakowanych wskazuje na przejściowy wzrost występujący w drugim tygodniu życia (ryc. 33C). Maksymalna wartość średniej gęstości numerycznej neuronów projekcyjnych w projekcji somatosensorycznej występuje w grupie wiekowej P14. W ciągu trzeciego tygodnia życia zachodzi spadek gęstości. W kolejnych badanych grupach wiekowych (P21–P90) wartości średniej gęstości numerycznej nie wykazują istotnych zmian. Średnia wartość gęstości numerycznej w tej populacji w całym badanym okresie wynosi 4800 ± 500 neuronów na mm^2 .

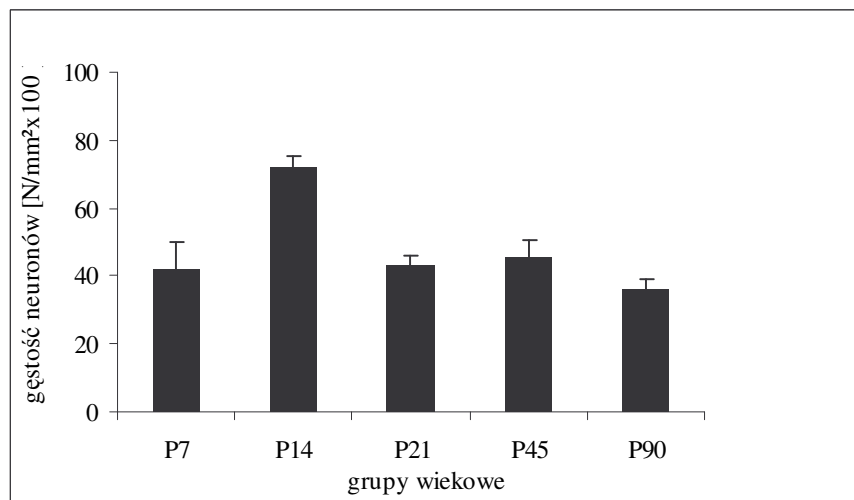


(A)

Ryc. 33. Neurony somatosensorycznej strefy projekcyjnej przedmurza w okresie obserwacji: (A) rozmieszczenie neuronów w obrębie przedmurza;



(B)



(C)

Ryc. 33. (ciąg dalszy) Neurony somatosensorycznej strefy projekcyjnej przedmurza w okresie obserwacji: (B) rozkład kształtów neuronów; (C) średnie wartości gęstości numerycznej neuronów.

Fig. 33. Neurons of the claustral somatosensory projecting zone during the study period: (A) distribution of the neurons in the claustrum; (B) distribution of neuronal shapes; (C) mean values of the numerical density of neurons.

4.7. Podsumowanie wyników dotyczących dojrzewania populacji neuronów projekcyjnych przedmurza

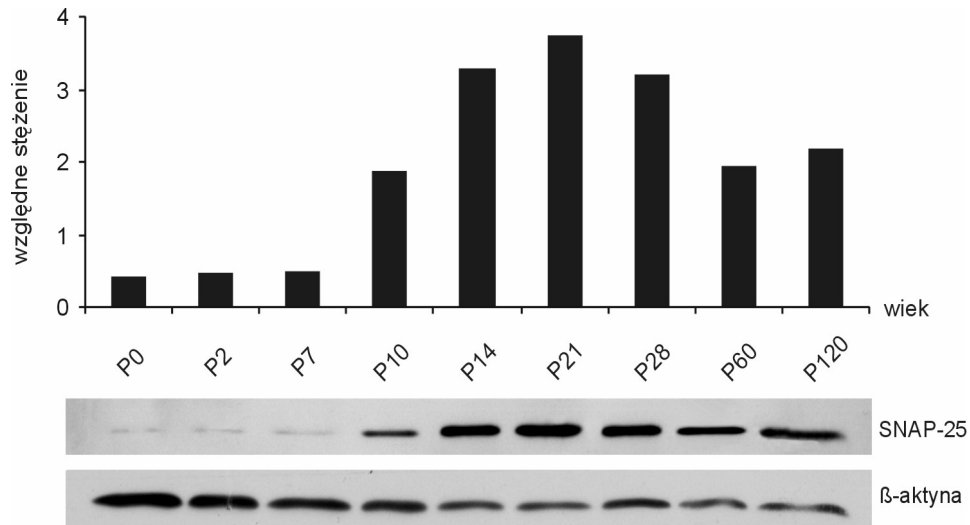
Neurony projekcyjne związane z korą somatosensoryczną są widoczne w przedmurzu, w całym badanym okresie. Najliczniej występują one w tylnej części badanej struktury. Schemat przestrzennego rozmieszczenia neuronów projekcyjnych, związanych z rejonem kory somatosensorycznej w obrębie przedmurza, jest stały w okresie dojrzewania.

Populacja neuronów projekcyjnych przedmurza jest bardzo zróżnicowana pod względem typów morfologicznych (neurony wielo- i dwubiegunowe) oraz kształtów (przeważają komórki owalne, wieloboczne i wrzecionowate). W okresie dojrzewania obserwuje się wzrost udziału neuronów wielobocznych.

Ocena gęstości numerycznej wykazuje istnienie licznej populacji neuronów projekcyjnych w przedmurzu już w pierwszym tygodniu życia, ponadto wykazuje przejściowy wzrost wartości po upływie dwóch tygodni życia zwierzęcia.

4.8. Występowanie białka synaptycznego SNAP-25 w neuronach przedmurza w okresie pourodzeniowym

Obecność białka synaptycznego SNAP-25 stwierdzono w ekstraktach tkanki nerwowej pochodzącej z przedmurza, we wszystkich grupach wiekowych (ryc. 34). Ocena wartości względnych, określających zawartość SNAP-25 w przedmurzu, wskazuje na charakterystyczny przebieg procesu dojrzewania układu synaptycznego. Wczesny okres dojrzewania, obejmujący drugi i trzeci tydzień życia, charakteryzuje się wzrostem zawartości SNAP-25. W dalszym okresie dojrzewania, trwającym do końca drugiego miesiąca życia (P60), obserwuje się spadek zawartości SNAP-25 w przedmurzu. W dalszym okresie czasu (P60 – P120) stwierdza się stabilizację wartości względnego stężenia SNAP-25. Maksymalny wzrost zawartości białka SNAP-25 w całym badanym okresie osiąga wartość 3,8 razy.



Ryc. 34 Zawartość białka SNAP-25 w neuronach przedmurza w okresie dojrzewania badana metodą immunoblotingu (Western blotting); jako białka referencyjnego używano β -aktyny.

Fig. 34 Concentration of SNAP-25 protein in the claustral neurons during maturation, studied by means of Western blotting method; as reference protein β -actin was used.

5. DYSKUSJA

5.1. Ogólna charakterystyka zmian zachodzących podczas dojrzewania przedmurza

W momencie urodzenia przedmurze jest dobrze wyodrębnioną strukturą, charakteryzującą się większym zagęszczeniem komórek w stosunku do sąsiadujących obszarów korowych, a także położonego niżej jądra śródgruszkowego. Nie jest ono jednak dojrzałe pod względem ukształtowania tworzących je neuronów oraz neuropilu, charakterystyki immunocytochemicznej neuronów, ukształtowania połączeń, a także tworzenia układu synaptycznego.

W przedmurzu opisano dotychczas zmiany ilościowe zachodzące w okresie pourodzeniowym, dotyczące całkowitej populacji neuronów, obejmujące zmiany ich liczby oraz gęstości numerycznej, mające związek ze zjawiskiem śmierci komórkowej, migracją neuronów oraz wzrostem przedmurza [278, 279, 483].

Na podstawie swoich obserwacji stwierdziłem, że w okresie dojrzewania przedmurza zachodzą istotne zmiany ilościowe i jakościowe w populacji jego interneuronów. Dotyczą one ukształtowania komórek nerwowych, ich gęstości oraz budowy neuropilu. Ponadto stwierdziłem, że połączenia przedmurza z korą somatosensoryczną u szczura są obecne już w najwcześniejszym okresie życia po urodzeniu. W tym czasie dochodzi do bardzo istotnych, przejściowych zmian gęstości neuronów projekcyjnych, a także zmian morfologicznych, świadczących o przystosowaniu tych połączeń do podjęcia określonych funkcji fizjologicznych. W okresie pourodzeniowym zachodzi również proces dojrzewania układu synaptycznego, przejawiający się wzrostem zawartości białka synaptycznego SNAP-25.

Podsumowując poczynione przez siebie obserwacje mogę stwierdzić, że zachodzące w badanym okresie dojrzewania przedmurza zmiany są zarówno kontynuacją procesów zapoczątkowanych w okresie płodowym, jak również są procesami rozpoczynającymi się po urodzeniu.

Wysokie wartości gęstości numerycznej neuronów przedmurza, zawierających wszystkie badane neuropeptydy oraz dwa białka wiążące wapń (kalbindynę i kalretyninę) w dniu urodzenia wskazują, że do rozpoczęcia ekspresji tych substancji dochodzi jeszcze w okresie przedurodzeniowym. Podobnie, obecność określonych typów kolokalizacji jak: NPY/NOS, SOM/NOS, VIP/CR w dniu urodzenia, wskazuje na wcześniejsze ich pojawienie się. Należy sądzić, że wówczas również rozpoczyna się w przedmurzu ekspresja białka synaptycznego SNAP-25. Przed urodzeniem także rozpoczyna się kształtowanie neuropilu,

wykazującego immunoreaktywność w stosunku do zdecydowanej większości badanych substancji.

W okresie pourodzeniowym ma miejsce początek ekspresji parwalbuminy w neuronach przedmurza. Dochodzi w tym czasie do zmian gęstości numerycznej części badanych populacji komórkowych. Wzrasta gęstość neuronów zawierających neuropeptydy – NPY oraz VIP, a także neuronów zawierających białka wiążące wapń – CR oraz PV. Na podstawie opublikowanych wcześniej własnych obserwacji mogę stwierdzić, że w okresie pourodzeniowym następuje wzrost gęstości numerycznej neuronów zawierających syntazę tlenu azotu w przedmurzu [241]. Ponadto, obserwuje się przejściowy wzrost gęstości neuronów projekcyjnych. Występują zmiany cech morfologicznych neuronów, polegające na zmianie udziału komórek o różnych kształtach oraz różnej liczbie biegunów. Obserwuje się dojrzewanie morfologiczne neuropilu. Pojawiają się kolejne typy kolokalizacji, jak: NPY/CB, NPY/CR, NPY/PV, SOM/CB. W tym okresie dochodzi również do zwiększenia ekspresji białka synaptycznego SNAP-25.

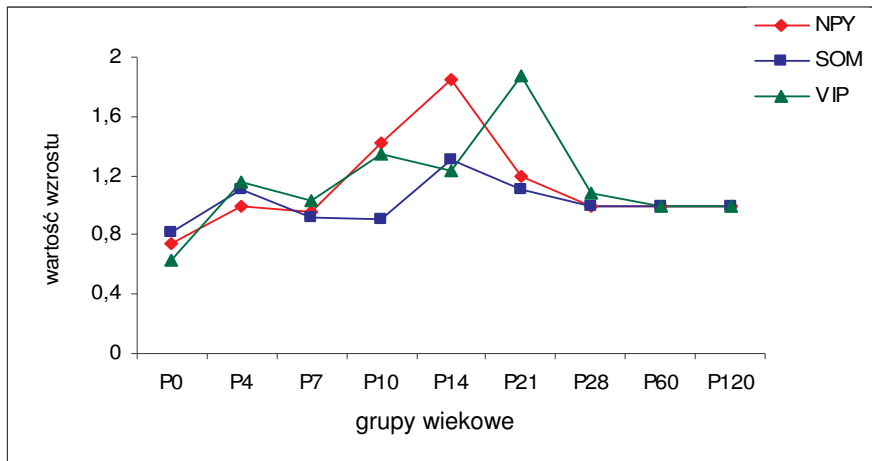
Należy sądzić, że proces kształtowania morfologicznego i immunocytochemicznego neuronów przedmurza pozostaje pod wpływem czynników troficznych, uwalnianych zarówno przez same neurony przedmurza, jak i zakończenia aksonalne neuronów projekcyjnych, docierające z określonych obszarów kory mózgu i struktur podkorowych [157, 203, 204, 370, 454, 460, 464]. Długość procesu dojrzewania przedmurza może być zależna, przynajmniej częściowo, od długości okresu kształtowania połączeń z innymi strukturami. Późniejsza ekspresja parwalbuminy w przedmurzu może mieć istotny związek z osiągnięciem dojrzałości przez odpowiednie obszary korowe lub podkorowe.

Reasumując, całość procesów rozwoju i dojrzewania populacji neuronów przedmurza prowadzi do wykształcenia systemu bardzo zróżnicowanego pod względem charakterystyki morfologicznej i immunocytochemicznej, przygotowanego do spełniania różnorodnych funkcji.

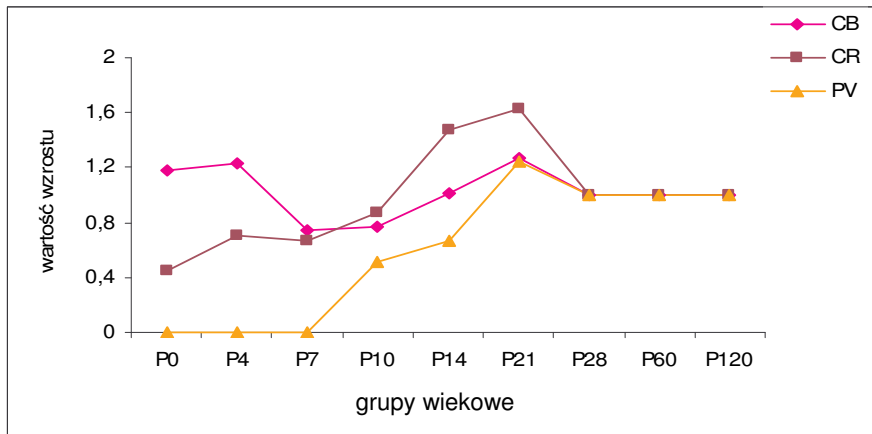
5.2. Charakterystyka dynamiki dojrzewania przedmurza

Neurony zawierające badane neuropeptydy

Uzyskane wyniki wskazują na zróżnicowanie dynamiki dojrzewania populacji zawierających badane substancje w okresie pourodzeniowym. Wśród populacji zawierających neuropeptydy NPY, SOM oraz VIP wykazano wzrost gęstości neuronów w dwóch przypadkach – populacji zawierających NPY i VIP (ryc. 35A). Maksymalne wartości gęstości osiągane są w przypadku populacji neuronów NPY-ir – po ukończeniu drugiego tygodnia życia, a w przypadku neuronów VIP-ir – o tydzień później.



(A)



(B)

Ryc. 35. Względny przyrost gęstości numerycznej neuronów zawierających neuropeptydy (A), białka wiążące wapń (B), w okresie dojrzewania przedmurza. Jako wartość referencyjną przyjęto średnią gęstość numeryczną obliczoną z wartości występujących w grupach wiekowych po zakończeniu procesu dojrzewania morfologicznego w każdej z badanych populacji.

Fig. 35. Relative increase of the numerical density of neurons containing neuropeptides (A), calcium binding proteins (B), during maturation of the claustrum. As the reference the mean numerical density was calculated from the values occurring in the age groups after finishing of the maturation process for each studied population.

Gęstość neuronów SOM-ir w przedmurzu nie wykazuje istotnych zmian i w badanym okresie utrzymuje się na wysokim poziomie. Jej wartości są większe od odpowiednich wartości gęstości w populacji neuronów VIP-ir, w najmłodszych grupach wiekowych (P0, P4). Ponadto, porównanie średnich wartości gęstości numerycznej w całym badanym okresie, w populacjach neuronów zawierających neuropeptydy, wskazuje na przewagę gęstości neuronów zawierających somatostatynę nad gęstością neuronów zawierających wazoaktywny peptyd jelitowy.

Podsumowując, porównanie przebiegu dojrzewania trzech badanych populacji neuronów zawierających neuropeptydy wskazuje na podobieństwo zachodzące jedynie między populacjami NPY- i VIP-ir. Populacja neuronów zawierających SOM charakteryzuje się zdecydowanie odmienną dynamiką w procesie dojrzewania.

Podobna dynamika rozwoju populacji interneuronów NPY-ir jak w przedmurzu, występuje w korze mózgu okolicy potylicznej u szczura [14, 69]. Rozwój i dojrzewanie tej populacji zachodzi zarówno w okresie pre-, jak i postnatalnym. Za zmniejszenie liczby neuronów immunoreaktywnych w tej populacji odpowiedzialna jest w większym stopniu śmierć komórek, niż zmniejszenie w nich ekspresji samego neuropeptydu.

Dojrzewanie populacji neuronów zawierających VIP mRNA oraz odpowiedni peptyd, z przejściowym okresem zwiększonej ekspresji, występuje w korze mózgu okolicy czołowej i ciemieniowej szczura, a także w podwzgórzu i hipokampie [162]. Pojawienie się tego neuropeptydu dopiero w okresie postnatalnym jest podkreślane przez wielu autorów [120, 207, 347, 453]. Opisano między innymi początek ekspresji VIP w okresie pourodzeniowym w komórkach amakrynowych siatkówki oraz interneuronach kory mózgu szczura. Spadek gęstości neuronów VIP-ir w korze mózgu u szczura można, zdaniem niektórych autorów, tłumaczyć przede wszystkim zmniejszeniem zawartości tego peptydu w komórkach, a nie śmiercią neuronów [70].

Rozwój i dojrzewanie populacji neuronów zawierających somatostatynę w wielu strukturach ośrodkowego układu nerwowego może charakteryzować się bardzo zróżnicowaną dynamiką. Może go cechować przejściowy wzrost, a następnie zmniejszenie zawartości mRNA SOM oraz odpowiedniego peptydu, a także przejściowy wzrost liczby immunoreaktywnych neuronów. Zmiany o takim charakterze występują zarówno w okresie pre- jak i postnatalnym, w takich strukturach jak pień mózgowia, mózdzek, podwzgórze, kora mózgu czy hipokamp szczura [34, 135, 272, 342, 412, 414]. W niektórych strukturach, jak mózdzek, ekspresja SOM zanika niemal całkowicie w okresie dojrzewania [341, 446, 455]. W korze mózgu oraz hipokampie utrzymuje się na zmniejszonym poziomie po zakończeniu dojrzewania [137, 342, 343, 364, 386, 492]. Populacja neuronów wykazujących obecność somatostatyny w przedmurzu,

jakkolwiek liczna, nie wykazuje istotnych zmian gęstości w badanym okresie dojrzewania.

Neurony zawierające białka wiążące wapń

Ocena gęstości neuronów zawierających białka wiążące wapń wskazuje na istnienie charakterystycznych wzorców rozwoju. W populacji neuronów CR-ir stwierdza się stopniowy wzrost gęstości, osiągający maksimum w trzecim tygodniu dojrzewania (P14 – P21; ryc. 35B). W populacji neuronów PV-ir występuje wzrost gęstości w ciągu drugiego i trzeciego tygodnia (P7 – P21). Gęstość neuronów zawierających CB wykazuje przejściowy spadek w drugim tygodniu życia.

Ponadto, porównanie gęstości numerycznych populacji neuronów zawierających badane białka wiążące wapń, wskazuje na występowanie istotnych różnic w dwóch najwcześniejszych grupach wiekowych (P0, P4). Największą gęstością w tym okresie charakteryzuje się populacja neuronów zawierających kalbindynę D28k. Mniej liczna jest populacja zawierająca kalretyninę. Brak jest w tym okresie neuronów zawierających parwalbuminę.

Podsumowując omówione wyżej obserwacje należy stwierdzić, że populacje neuronów zawierających trzy badane przez mnie białka wiążące wapń w przedmurzu charakteryzują się zróżnicowaniem dynamiki dojrzewania.

Zróżnicowanie przebiegu dojrzewania populacji neuronów zawierających białka wiążące wapń zaobserwowano w przedmurzu myszy [92]. Populacja neuronów zawierających parwalbuminę pojawia się już w czwartym dniu po urodzeniu. Neurony zawierające kalbindynę, najliczniejsze po urodzeniu, stopniowo zmniejszają swoją liczebność. Neurony, w których występuje kalretynina, spotyka się najrzadziej. Ich liczebność stopniowo wzrasta po urodzeniu. Porównanie zmian zachodzących w populacjach neuronów zawierających białka wiążące wapń u myszy i szczura wskazuje na podobieństwa szczególnie wśród neuronów zawierających CB oraz CR. Różnice dotyczące wieku, w którym pojawia się PV, mogą być związane z działaniem specyficznych dla każdego gatunku mechanizmów regulujących ekspresję tego białka.

W rozwoju ontogenetycznym mózgowia szczura ekspresja parwalbuminy w interneuronach zachodzi po osiągnięciu przez nie dojrzałości czynnościowej [433]. Potwierdzają to wyniki badań wielu struktur OUN, przeprowadzone u przedstawicieli różnych gatunków ssaków. Badania te dotyczyły między innymi ciała migdałowatego [35], hipokampa [36], prążkowiec [408] oraz kory mózgu szczura [7, 413], kory mózgu myszy [99], kory obręczy [324] oraz hipokampa u psa [494], a także kory mózgu u człowieka [266].

Późną ekspresję parwalbuminy próbuje się także tłumaczyć teorią mówiącą o pochodzeniu różnych typów interneuronów ze wspólnego pnia rozwojowego

[4, 7]. Zgodnie z tą hipotezą w rozwoju dochodzi do zaprzestania ekspresji kalbindyny D28k przez pewną grupę neuronów i rozpoczęcia ekspresji parwalbuminy. Przejściowe zmniejszenie gęstości neuronów zawierających kalbindynę w przedmurzu, w drugim tygodniu życia, mogłyby wskazywać na taką możliwość. Zdaniem niektórych autorów wzrost ekspresji parwalbuminy w komórce nerwowej odpowiada momentowi dotarcia do niej odpowiednich projekcji i wytworzeniu połączeń synaptycznych [22]. Wzrost ten jest więc indukowany przez czynniki zewnętrzne, co może tłumaczyć jego późne wystąpienie [473]. Zasadniczą rolę odgrywają tu docierające połączenia, ukształtowane synapsy i receptory oraz wytwarzane neurotransmitery i czynniki neurotroficzne jak np. czynnik wzrostowy pochodzenia mózgowego (BDNF) [202, 372, 488].

Neurony projekcyjne przedmurza związane z korą somatosensoryczną

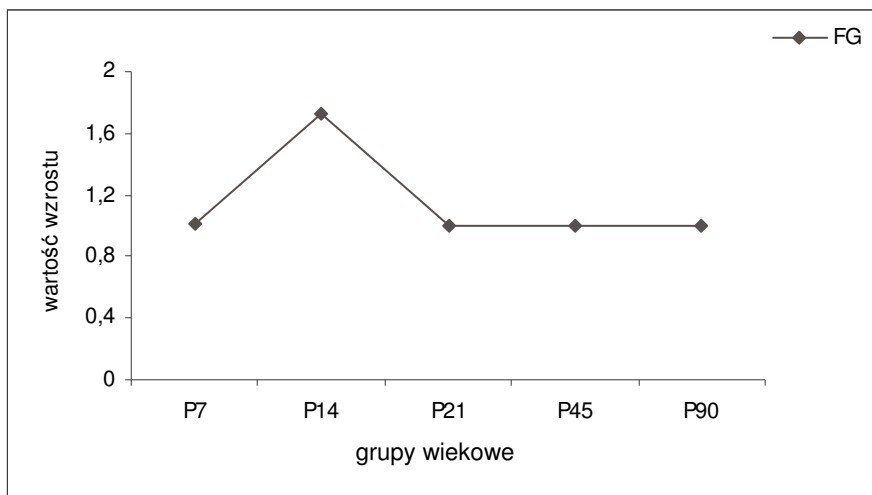
Ocena gęstości numerycznej wyznakowanych neuronów projekcyjnych przedmurza, a także względnego przyrostu tej gęstości, wykazała maksymalną wartość w grupie wiekowej P14, z następującym spadkiem do końca trzeciego tygodnia życia po urodzeniu (ryc. 36). Przejściowe zwiększenie intensywności projekcji korowej może zachodzić po zakończeniu migracji neuronów z rezerwuaru korowo-przedmurzowego i po ich osiedleniu się w przedmurzu. Zmniejszenie intensywności projekcji może być rezultatem śmierci apoptotycznej części neuronów projekcyjnych. Istnienie tego zjawiska zostało wcześniej stwierdzone w przedmurzu [279]. Zmniejszenie wielkości projekcji, będące rezultatem śmierci komórek zachodzącej podczas wczesnego etapu dojrzewania, opisano w przypadku wielu połączeń między strukturami ośrodkowego układu nerwowego [66, 317, 320, 357]. Może on także wynikać ze zjawiska eliminowania niewłaściwych połączeń oraz współzawodnictwa neuronów o dostęp do czynników troficznych w trakcie rozwoju i dojrzewania [317, 319].

Jednym z istotnych warunków ukształtowania prawidłowych połączeń jest obecność tlenu azotu [86, 144, 468]. Kształtowanie połączeń przedmurzowo-korowych wymaga wpływu NO zarówno na ciała neuronów projekcyjnych, położonych w przedmurzu, jak i na zakończenia aksonalne w obszarach docelowych.

Zmniejszenie gęstości numerycznej neuronów projekcyjnych może wreszcie wynikać ze wzrostu objętości dojrzewającej struktury, który wynika przede wszystkim ze wzrostu objętości neuropilu, zwiększenia liczby komórek glejowych oraz zwiększania się objętości neuronów [234].

Proces dojrzewania połączeń przedmurzowo-korowych przebiega równolegle z dojrzewaniem odpowiedniego obszaru korowego, będącego celem projekcji. Można założyć, że podobnie jak w przypadku połączeń wzgórzowo-korowych, ma to miejsce w okresie pourodzeniowym [317]. Długość okresu dojrzewania połączeń przedmurzowo-korowych jest więc najprawdopodobniej

związana z długością okresu dojrzewania obszaru korowego, z którym badana strefa projekcyjna posiada połączenia.



Ryc. 36. Względny przyrost gęstości numerycznej neuronów projekcyjnych, w okresie dojrzewania przedmurza. Jako wartość referencyjną przyjęto średnią gęstość numeryczną obliczoną z wartości występujących w grupach wiekowych po zakończeniu procesu dojrzewania morfologicznego w badanej populacji; skrót: FG - Fluoro-Gold.

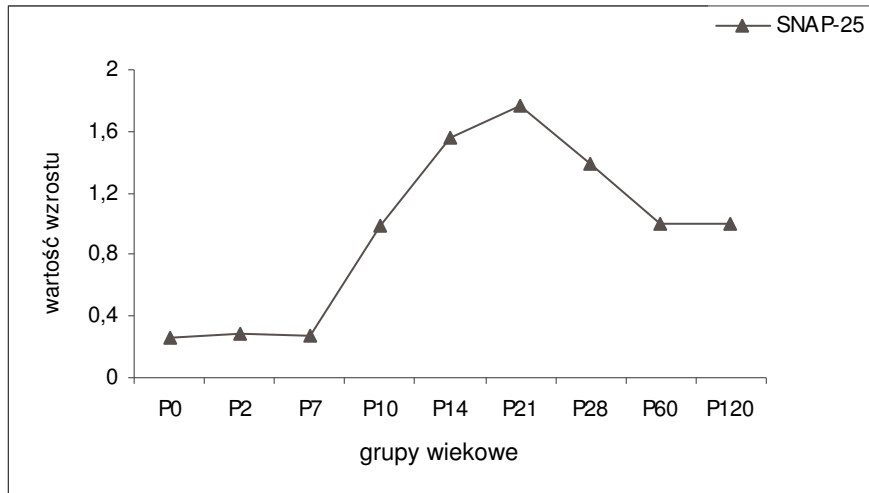
Fig. 36. Relative increase of the numerical density of projecting neurons, during maturation of the claustrum. As the reference the mean numerical density was calculated from the values occurring in the age groups after finishing of the maturation process in the studied population; abbreviation: FG - Fluoro-Gold.

Białko synaptyczne SNAP-25

W badanym materiale wykazano wzrost zawartości SNAP-25, osiągający maksymalne wartości po upływie trzeciego tygodnia życia (ryc. 37). Może on odpowiadać okresowi wzrostu aksonów i dendrytów [169], synaptogenezie oraz okresowi podejmowania funkcji przez synapsy [21, 45, 65, 163]. Na podstawie badania połączeń wzgórzowo-korowych wiadomo, że pierwsze połączenia synaptyczne powstają już w okresie prenatalnym [188]. Przekąźnictwo synaptyczne rozpoczyna się w E19 [321]. Ma ono w tym okresie istotny wpływ na dojrzewanie struktur korowych [322].

Obecność mRNA oraz białka SNAP-25 wykazano w hipokampie, prążkowie i mózdzku szczura już w okresie płodowym [361]. Zaobserwowano wzrost zawartości zarówno mRNA, jak i białka SNAP-25, sięgający okresu dojrzałości, przy czym największą dynamikę tego wzrostu odnotowano w okresie od urodzenia, do piątego dnia życia [65]. Zmiany zawartości SNAP-25 w przedmurzu

szczura odpowiadają zmianom zawartości tego białka w innych strukturach OUN. Różnice w długości okresu wzrostu zawartości SNAP-25 mogą wynikać z różnej dynamiki kształtowania połączeń w badanych strukturach, a tym samym z różnic w przebiegu procesu synaptogenezy. Przedmurze, jako struktura korowo-zależna, spełnia swą funkcję modulacyjną w stosunku do różnych obszarów korowych po ostatecznym ukształtowaniu ramienia wstępującego i zstępującego przedmurzowo-korowej pętli neuronalnej.



Ryc. 37. Względny przyrost zawartości białka synaptycznego SNAP-25, w okresie dojrzewania przedmurza. Jako wartość referencyjną przyjęto średnią obliczoną z wartości występujących w grupach wiekowych po zakończeniu procesu dojrzewania.

Fig. 37. Relative increase of the concentration of SNAP-25 protein, during maturation of the claustrum. As the reference the mean numerical density was calculated from the values occurring in the age groups after finishing of the maturation process.

Jak wynika z moich obserwacji, wzrost gęstości neuronów projekcyjnych w przedmurzu zachodzi do czternastego dnia po urodzeniu. Odpowiada to okresowi wzrostu zawartości białka synaptycznego SNAP-25 w przedmurzu i może wskazywać zarówno na zaawansowanie procesu synaptogenezy, jak i na podjęcie czynności przez utworzone już połączenia synaptyczne [361]. Zmniejszenie zawartości SNAP-25 i osiągnięcie wartości spotykanych w przedmurzu osobników dojrzałych, mogą być związane ze zmniejszeniem liczby połączeń synaptycznych, wynikającym z utraty części neuronów na drodze śmierci komórkowej, wycofania części nieprawidłowo wytworzonych połączeń, współzawodnictwa o dostęp do czynników troficznych, wpływu neuromodulatorów, jak np. NO, wreszcie zmniejszenia liczby synaps, będącego rezultatem plastyczności

w połączeniach korowo-podkorowych, związanego z procesem uczenia się [361, 391].

Proces dojrzewania przedmurza jest zjawiskiem przebiegającym ze zróżnicowaną dynamiką, charakterystyczną dla poszczególnych subpopulacji neuronalnych, odrębnych immunocytochemicznie i najprawdopodobniej funkcjonalnie. Należy podkreślić, że obserwowane zmiany ilościowe dotyczące badanych populacji zachodzą w ciągu pierwszych czterech tygodni życia zwierzęcia. Okres ten ma zasadnicze znaczenie dla prawidłowego ukształtowania przedmurza u badanego gatunku ssaków.

5.3. Charakterystyka zmian morfologicznych neuronów zawierających badane substancje

We wszystkich populacjach neuronalnych w badanym okresie stwierdzono występowanie charakterystycznych zmian świadczących o ich dojrzewaniu pod względem morfologicznym. Proces dojrzewania morfologicznego neuronów immunoreaktywnych w stosunku do badanych substancji, jakkolwiek złożony i zróżnicowany dla poszczególnych populacji, wykazuje pewne cechy wspólne dla wszystkich z nich. W najwcześniejszym okresie obserwacji, w badanych populacjach komórkowych spotyka się neurony o cechach morfologicznych mogących wskazywać na ich niedojrzałość. Są to przeważnie neurony jednobiegunowe, a w przypadku niektórych populacji – również dwubiegunowe. Charakteryzują się one między innymi stosunkowo niewielką objętością cytoplazmy w stosunku do objętości jądra komórkowego, poszerzonymi początkowymi odcinkami wypustek, brakiem dojrzałego neuropilu. Często są one mniejsze od neuronów dojrzałych w danej populacji. W okresie dojrzewania dochodzi do kształtowania cech morfologicznych charakterystycznych dla każdej z badanych populacji.

Porównanie wyników badań dotyczących rozkładów kształtów neuronów przedmurza we wszystkich populacjach wskazuje na najczęstsze występowanie komórek o ciałach owalnych i wrzecionowatych, a nieco rzadziej – wielobocznych. Ponadto, zwraca uwagę zmniejszający się w trakcie dojrzewania wielu populacji udział neuronów okrągłych oraz wzrost udziału neuronów o ciałach wielobocznych. W przypadku pojedynczo znakowanych neuronów zawierających neuropeptyd Y oraz w przypadku kolokalizacji neuropeptydu Y z syntazą tlenu azotu, stwierdzono wzrost średnich wartości pól przekroju neuronów w okresie obserwacji, co dodatkowo podkreśla przebieg procesu dojrzewania morfologicznego w tych populacjach neuronalnych.

Podobny do opisanego wyżej przebieg procesu dojrzewania morfologicznego populacji neuronów zawierających neuropeptyd Y oraz wazoaktywny peptyd

jelitowy, w okresie pourodzeniowym zachodzi w wielu strukturach ośrodkowego układu nerwowego [114, 197, 199, 303, 475]. Przedłużony okres dojrzewania tych populacji neuronalnych może wynikać z konieczności dłuższego oddziaływania na nie czynników troficznych, czy aktywności spontanicznej otaczających neuronów, niezbędnej do ukończenia tego procesu [481].

Wcześniej opublikowane wyniki badań procesu dojrzewania populacji neuronów zawierających syntazę tlenu azotu w przedmurzu, wskazują na wzrastający wraz z wiekiem udział w tej populacji komórek wielobocznych, przy jednoczesnym zmniejszeniu się udziału komórek okrągłych [241].

Ocena zróżnicowania kształtów neuronów wskazuje na odrębności morfologiczne badanych populacji. Zgodnie z klasyfikacją neuronów przedmurza szczura, zaproponowaną przez Mamos [287], neurony zawierające neuropeptydy odpowiadają kategorii średnich neuronów bezkolcowych (MA), nieco rzadziej są spotykane małe neurony bezkolcowe (SA). Komórki te stanowią grupę neuronów niepiramidowych i nie biorą udziału w wytwarzaniu projekcji przedmurzo-korowej [242].

Neurony CB-ir odpowiadają typom MA i SA neuronów bezkolcowych przedmurza, według klasyfikacji Mamos i Narkiewicza [287]. Neurony CR-ir odpowiadają przede wszystkim małym neuronom bezkolcowym (SA), a nieco rzadziej średnim neuronom bezkolcowym (MA), podczas gdy neurony PV-ir – typowi MA interneuronów przedmurza. Nie stwierdzono obecności białek wiążących wapń w neuronach projekcyjnych przedmurza [110].

Należy podkreślić, że zaobserwowane przeze mnie różnice w ukształtowaniu poszczególnych populacji komórkowych, zarysowujące się podczas dojrzewania przedmurza, są wypadkową zmian zachodzących w neuronach, które przez cały badany okres wykazują ekspresję określonej substancji. Z drugiej strony, nie można wykluczyć zwiększenia ekspresji danej substancji, w określonym momencie dojrzewania, przez komórki charakteryzujące się określonym zespołem cech morfologicznych. Współwystępowanie obu tych procesów może decydować o zróżnicowaniu morfologicznym poszczególnych populacji neuronalnych, odrębnych pod względem charakterystyki immunocytochemicznej.

Uzyskane wyniki upoważniają do podkreślenia istotnej różnicy w rozmieszczeniu populacji neuronów projekcyjnych oraz interneuronów w przedmurzu szczura, w całym badanym okresie dojrzewania. Neurony projekcyjne, łączące się z określonym obszarem korowym, wykazują rozmieszczenie strefowe, zarówno w okresie dojrzewania, jak i po jego zakończeniu. Podobny charakter rozmieszczenia neuronów projekcyjnych w przedmurzu zaobserwowany został w przypadku różnych stref projekcyjnych przez licznych autorów [209, 234, 237, 285, 427, 428]. Wskazuje to na przyporządkowanie określonych obszarów przedmurza odpowiednim obszarom korowym, a co za tym idzie, określonym funkcjom.

W przeciwieństwie do przedstawionego powyżej strefowego wzorca rozmieszczenia neuronów projekcyjnych, interneurony o zróżnicowanej charakterystyce immunocytochemicznej rozmieszczone są w sposób równomierny. Użyte przez mnie wyniki różnią się więc od wcześniej opublikowanych danych dotyczących przedmurza myszy, mówiących o liczniejszym występowaniu interneuronów zawierających CaBP w części przedmurza związanej z projekcją ruchową i limbiczną [387].

Można przypuszczać, że równomierne rozmieszczenie interneuronów o zróżnicowanej charakterystyce immunocytochemicznej w przedmurzu szczura, w okresie dojrzewania, odzwierciedla jednakowy dla całej struktury sposób funkcjonowania tej populacji neuronalnej. Różnice czynnościowe mogą więc zależeć od oddziaływania interneuronów na neurony projekcyjne, związane z różnymi obszarami korowymi i podkorowymi systemem dwukierunkowych połączeń [390].

5.4. Cechy procesu dojrzewania neuropilu

Wśród neuropilu wykazującego obecność badanych neuropeptydów, długość okresu dojrzewania neuropilu NPY- i SOM-ir jest równa długości dojrzewania odpowiednich populacji ciał komórek nerwowych. Okres dojrzewania neuropilu VIP-ir jest dłuższy niż dojrzewania odpowiednich komórek nerwowych. W przypadku neuropilu wykazującego obecność białek wiążących wapń, stwierdza się dłuższy okres osiagania dojrzałości morfologicznej przez neuropil CB-ir, niż przez odpowiednią populację komórek nerwowych. Należy zaznaczyć, że spośród wszystkich badanych populacji, neuropil wykazujący obecność parwalbuminy pojawia się najpóźniej. Jego obecność stwierdza się dopiero po upływie 10 dni od urodzenia. Cechy morfologicznej dojrzałości osiąga on w najkrótszym okresie czasu – już po upływie pierwszego miesiąca życia.

Na podstawie wcześniej opublikowanych wyników badań stwierdziłem, że morfologiczne cechy dojrzałości neuropilu NOS-ir występują po upływie trzech tygodni życia szczura, równocześnie z osiągnięciem dojrzałości przez ciała komórek nerwowych zawierających NOS [241].

Przedstawione wyniki wskazują z jednej strony na zróżnicowanie długości okresu dojrzewania neuropilu, wykazującego obecność badanych substancji, a z drugiej strony sugerują, że proces dojrzewania neuropilu charakteryzuje się dynamiką odrębną od tej, która dotyczy dojrzewania ciał komórek nerwowych w danym typie barwienia.

W swoim materiale stwierdziłem występowanie zakończeń aksonalnych oraz włókien nerwowych, rozmieszczonych dookoła ciał niewyznakowanych neuronów. Ich obecność wykazano w przypadku neuropilu zawierającego

neuropeptyd Y oraz wazoaktywny peptyd jelitowy. Stają się one widoczne pod koniec kształtowania morfologicznego neuropilu w przedmurzu. Obecność podobnych struktur w przypadku neuropilu VIP-ir opisano dotychczas między innymi w korze mózgu i jądrze śródgruszkowym u dojrzałych szczurów [26, 118, 222, 475]. Podobnie, obecność zakończeń aksonalnych oraz włókien NPY-ir, otaczających ciała niewyznakowanych neuronów, opisano w przedmurzu dorosłych szczurów [242].

Ponadto, stwierdzono obecność zakończeń aksonalnych i włókien PV- oraz CR-ir wokół ciał niewyznakowanych neuronów. Struktury te występują licznie w wielu okolicach ośrodkowego układu nerwowego [3, 98, 118, 226, 436]. Ich obecność wskazuje na istotne znaczenie hamowania aktywności innych neuronów (zarówno projekcyjnych, jak i interneuronów) przez zróżnicowaną immunocytochemicznie populację interneuronalną [118, 224].

5.5. Kolokalizacja neuropeptydów z białkami wiążącymi wapń lub syntazą tlenu azotu w okresie dojrzewania przedmurza

Uzyskane wyniki badań kolokalizacji wybranych neuropeptydów z białkami wiążącymi wapń oraz syntazą tlenu azotu wskazują na istnienie istotnych różnic dotyczących: 1/ momentów pojawienia się poszczególnych typów kolokalizacji, 2/ dynamiki dojrzewania populacji neuronów podwójnie znakowanych, 3/ wielkości kolokalizacji.

Momenty pojawienia się poszczególnych typów kolokalizacji w przedmurzu są zróżnicowane. Najwcześniej, bo już w dniu urodzenia, stwierdzono występowanie kolokalizacji neuropeptydów z udziałem syntazy tlenu azotu (NPY/NOS, SOM/NOS), a także kolokalizacji wazoaktywnego peptydu jelitowego z kalretyniną (VIP/CR). W okresie pourodzeniowym pojawiają się populacje neuronów wykazujących kolokalizację neuropeptydu Y ze wszystkimi badanymi białkami wiążącymi wapń (NPY/CB, NPY/CR, NPY/PV), a także somatostatyny z kalbindyną D28k (SOM/CB).

Należy przypuszczać, że podobnie jak w innych strukturach OUN, część populacji neuronów wykazujących wcześniej obecność jednej z badanych substancji, w określonym momencie dojrzewania rozpoczyna ekspresję drugiej z nich, charakterystycznej dla danego typu kolokalizacji [7, 261].

Występowanie podobnych do opisanych typów kolokalizacji stwierdzono również w innych strukturach OUN. W korze mózgu szczura wykazano obecność kolokalizacji NPY/CB [98, 195, 353], a także kolokalizacji SOM/CB [154, 221, 222, 246, 393]. Podobnie, w prążkowiu szczura występuje zarówno koloka-

lizacja NPY/CB [247], jak i kolokalizacja SOM/CB [248]. W przeciwieństwie do wyników uzyskanych w przedmurzu, nie stwierdzono obecności kolokalizacji typu NPY/CR oraz NPY/PV w korze mózgu szczura [98].

Kolokalizacja VIP/CR została opisana przez wielu autorów w korze mózgu [221, 222, 246, 393] oraz w hipokampie szczura [1]. Ten typ kolokalizacji występuje również w jądrze śródgruszkowym szczura [239].

Podobnie jak w przedmurzu, obecność kolokalizacji dwóch badanych neuropeptydów – neuropeptydu Y oraz somatostatyny z syntazą tlenu azotu stwierdzono w wielu strukturach ośrodkowego układu nerwowego. Kolokalizację NPY/NOS wykazano w neuronach ciała migdałowatego [465], jądra śródgruszkowego [239] i kory mózgu różnych gatunków ssaków [232, 431]. Kolokalizację SOM/NOS opisano między innymi w neuronach ciała migdałowatego człowieka [465] oraz zakrętu zębatego szczura [111]. Ponadto, występuje ona także w neuronach prążkowiec [471] oraz w wielu obszarach korowych u różnych gatunków ssaków [232, 431, 465].

Ocena dynamiki dojrzewania poszczególnych typów kolokalizacji pozwala na dokonanie podziału na charakteryzujące się wzrostem i na stabilne w badanym okresie. Wzrost wartości współczynnika kolokalizacji wraz z wiekiem stwierdza się w przypadku kolokalizacji kalbindyny D28k z dwoma neuropeptydami (NPY/CB, SOM/CB), oraz w przypadku dwu kolokalizacji kalretyniny – z wazoaktywnym peptydem jelitowym (VIP/CR), a ponadto, w przypadku kolokalizacji z neuropeptydem Y (NPY/CR, NPY/NOS). Nie wykazano wzrostu odpowiednich współczynników w przypadku kolokalizacji neuropeptydu Y z parwalbuminą (NPY/PV), a także w przypadku kolokalizacji somatostatyny z syntazą tlenu azotu (SOM/NOS). Jak dotychczas, brak jest w literaturze oceny dynamiki dojrzewania populacji neuronów zróżnicowanych pod względem charakterystyki immunocytochemicznej w przedmurzu szczura. Zmiany wartości współczynników kolokalizacji wskazują na wzrastające zróżnicowanie populacji dojrzewających interneuronów przedmurza.

Porównanie wielkości kolokalizacji pozwala na podkreślenie kilku istotnych cech w przebiegu dojrzewania przedmurza. Wśród badanych typów kolokalizacji wyróżnić można te, które charakteryzują się bardzo wysokimi wartościami współczynników kolokalizacji. Należą do nich kolokalizacje NPY/NOS, VIP/CR, SOM/NOS (najwyższe wartości współczynników kolokalizacji wynoszą odpowiednio – 65%, 51%, 39%). Niższe wartości wykazują typy kolokalizacji neuropeptydu Y oraz somatostatyny z kalbindyną D28k (odpowiednio – 32%, 31%). Zdecydowanie najniższymi wartościami charakteryzują się typy kolokalizacji neuropeptydu Y z kalretyniną oraz parwalbuminą (odpowiednio – 9,5%, 9%).

Częstą kolokalizację neuropeptydu Y oraz somatostatyny z syntazą tlenu azotu potwierdzają badania wielu obszarów kory mózgu szczura [37, 112, 154, 246, 393]. Podobnie, kolokalizacja wazoaktywnego peptydu jelitowego z kalretyniną określana jest jako bardzo częsta w korze mózgu u wielu gatunków ssaków [98, 393]. Zdaniem tych samych autorów, kolokalizacja somatostatyny z kalbindyną w korze mózgu szczura, w przeciwieństwie do wyników dotyczących przedmurza, jest bardzo częsta, podczas gdy rzadziej spotyka się kolokalizację neuropeptydu Y z kalbindyną.

Współwystępowanie neuropeptydu Y z kalretyniną lub parwalbuminą jest rzadkie w przedmurzu. Obecności tych typów kolokalizacji nie została potwierdzona w badaniach dotyczących kory mózgu u różnych gatunków ssaków [12, 98].

Wydaje się istotne, że w obu populacjach neuronów wykazujących kolokalizację neuropeptydów z syntazą tlenu azotu (NPY/NOS oraz SOM/NOS), maksymalne wartości współczynników kolokalizacji są wyższe od odpowiednich wartości współczynników kolokalizacji w populacjach neuronów wykazujących kolokalizację tych samych neuropeptydów z białkami wiążącymi wapń. Wskazuje to na kluczowe znaczenie tlenu azotu w procesie dojrzewania populacji neuronalnych przedmurza.

Porównanie wartości stosunku neuronów podwójnie znakowanych, do neuronów pojedynczo znakowanych, występujących w określonym typie kolokalizacji, wskazuje na istotne cechy charakteryzujące populacje badanych interneuronów. Na podstawie tych danych należy brać pod uwagę występowanie w przedmurzu szczura typu kolokalizacji NPY/SOM/NOS. Przemawiać za tym mogą również: wczesne występowanie obu typów kolokalizacji (NPY/NOS oraz SOM/NOS) w procesie dojrzewania przedmurza, a także podobieństwo cech morfologicznych obu populacji neuronów podwójnie znakowanych.

Na obecność potrójnej kolokalizacji NOS z neuropeptydami – neuropeptydem Y oraz somatostatyną – wskazują wyniki badań immunocytochemicznych kory mózgu szczura [37, 112, 154, 246, 393].

Należy zwrócić uwagę, że w korze mózgu szczura, w przeciwieństwie do przedmurza, jedynie 10–20% neuronów zawierających somatostatynę wykazuje kolokalizację z NOS [246, 393]. Różnice pomiędzy odpowiednimi wartościami mogą świadczyć o istnieniu odrębnych dla poszczególnych struktur mechanicznych, regulujących ekspresję badanych substancji.

Uzyskane wyniki wskazują na znaczne zróżnicowanie populacji interneuronów przedmurza pod względem charakterystyki immunocytochemicznej, dynamiki dojrzewania, a także znaczenia funkcjonalnego w procesie dojrzewania przedmurza.

5.6. Potencjalne znaczenie czynnościowe populacji neuronów zawierających badane substancje w procesie dojrzewania przedmurza

5.6.1. Znaczenie czynnościowe neuropeptydów

Neuropeptyd Y

Potencjalne znaczenie neuropeptydu Y we wczesnym okresie dojrzewania przedmurza może wynikać z jego roli regulującej napływ jonów Ca^{++} do wnętrza komórki nerwowej [16, 298, 442]. Umożliwia to pośrednie wpływanie na przebieg takich procesów jak wzrost włókien nerwowych oraz kształtowanie czynności bioelektrycznej neuronów [77, 352]. Neuropeptyd Y wpływając na zmniejszenie uwalniania glutaminianu [228], może zabezpieczać populację interneuronów przedmurza przed nadmiernym pobudzeniem przez neurony projekcyjne, wykorzystujące ten neuroprzekaźnik. Ponadto, neuropeptyd Y, wykazując działanie antyepileptyczne we wczesnym okresie dojrzewania, może odgrywać rolę zabezpieczającą populację neuronów przedmurza przed powstaniem patologicznej czynności bioelektrycznej [44, 228, 485]. Wymienione wyżej funkcje neuropeptydu Y mogą być realizowane między innymi za pośrednictwem receptorów Y1 i Y2 obecnych w przedmurzu [368].

Somatostatyna

Wysoka gęstość w okresie obserwacji, charakteryzująca populację neuronów zawierających somatostatynę, wskazuje na istotną rolę tego neuropeptydu w procesie dojrzewania przedmurza. W najwcześniejszym okresie rozwoju znaczenie somatostatyny może polegać na powstrzymywaniu nadmiernego wzrostu populacji komórkowej [333]. Może ona ponadto uczestniczyć w regulowaniu migracji komórkowych [131, 411, 446, 491]. Zarówno w okresie przed-, jak i pourodzeniowym w przedmurzu i jego najbliższym otoczeniu zachodzą liczne procesy migracyjne. Do przedmurza docierają neurony zdążające z miejsca swego powstania, w rejonie neuroepitelium korowego. W rejonie przedmurza zachodzi ponadto migracja neuronów opuszczających tzw. rezerwuar korowo-przedmurzowy, a proces ten ulega zakończeniu pod koniec pierwszego tygodnia życia szczura [23, 25, 278]. W bezpośrednim sąsiedztwie przedmurza zachodzą procesy migracyjne interneuronów korowych, powstałych w wyniosłościach zwojowych [11, 25, 369]. Uzasadnia to występowanie w przedmurzu, w okresie jego dojrzewania, licznej populacji neuronów zawierających somatostatynę.

Rola somatostatyny w okresie dojrzewania przedmurza może wiązać się, podobnie jak w innych okolicach ośrodkowego układu nerwowego, z kształtowaniem i ograniczaniem jego połączeń [198].

Wazoaktywny peptyd jelitowy

Wpływ wazoaktywnego peptydu jelitowego na rozwój i dojrzewanie struktur ośrodkowego układu nerwowego jest wielokierunkowy i najprawdopodobniej dotyczy różnych faz tego procesu. W najwcześniejszym okresie rozwoju rola wazoaktywnego peptydu jelitowego jest związana z regulacją proliferacji i różnicowania komórek nerwowych [152, 323]. VIP wpływa na skrócenie długości cyklu komórkowego komórek neuroepitelialnych, poprzez skrócenie fazy S i G1 [165-167].

Potencjalne działanie wazoaktywnego peptydu jelitowego w stosunku do populacji dojrzewających neuronów przedmurza może być związane z jego funkcją neuroprotekcijną [53, 132, 152, 160, 190, 323] oraz neurotroficzną [376].

5.6.2. Znaczenie czynnościowe białek wiążących wapń

Kalbindyna D28k

Kalbindyna D28k pojawia się zwykle jeden do dwóch dni po zakończeniu podziałów komórkowych i po rozpoczęciu migracji neuronalnych oraz po rozpoczęciu wydłużania wypustek [121]. W okresie wczesnego rozwoju struktur ośrodkowego układu nerwowego, kalbindyna D28k ma ważne znaczenie buforujące poziom jonów Ca^{++} [142, 355]. Tym samym, zabezpiecza ona dojrzewające komórki nerwowe przed uszkodzeniem powodowanym przez glutaminian i nadmierne pobudzenie za pośrednictwem receptorów NMDA [296, 477]. Stabilizacja poziomu jonów Ca^{++} wpływa na efektywność procesu przekazywania synaptycznego. Biorąc pod uwagę, iż glutaminian jest głównym neurotransmiterem neuronów projekcyjnych kory mózgu, wysyłających między innymi projekcje do przedmurza, należy przypuszczać że kalbindyna D28k spełnia istotne zadanie ochronne we wczesnym okresie dojrzewania przedmurza. Ponadto, zmiany w wielkości ekspresji kalbindyny D28k w okresie dojrzewania są związane pośrednio z procesem synaptogenezy [5, 7, 266, 309]. Kalbindyna D28k bierze udział w regulacji wzrostu neurytów oraz w kształtowaniu drzewa dendrytycznego [313, 389]. Ekspresja jej jest wysoka podczas kształtowania i modelowania połączeń [182]. W przedmurzu procesy te zachodzą w ciągu pierwszych czterech tygodni życia.

Kalretynina

Według wielu autorów kalretynina jest dobrym znacznikiem niedojrzałych i migrujących neuronów w trakcie rozwoju struktur ośrodkowego układu nerwowego [139, 462, 463]. Jak przedstawiono to wyżej, w samym przedmurzu oraz jego najbliższym otoczeniu, zarówno w okresie przedurodzeniowym, jak i po urodzeniu, zachodzą nasilone procesy migracyjne. Uzasadnia to występowanie w okresie dojrzewania stosunkowo licznej populacji neuronów zawierających kalretyninę.

Działanie buforujące kalretyniny w stosunku do jonów Ca^{++} we wczesnym okresie rozwoju i dojrzewania przedmurza może wpływać na przebieg procesów zależnych od jonów Ca^{++} , jak synaptogeneza, wydłużanie neurytów i kształtowanie układu akso-dendrytycznego [384, 407]. Procesy te zachodzą w okresie występowania maksymalnej gęstości neuronów CR-ir w przedmurzu.

Parwalbumina

Parwalbumina jest jedynym z badanych białek wiążących wapń, którego ekspresja w neuronach przedmurza rozpoczyna się po urodzeniu. Zdaniem niektórych autorów, początek ekspresji tego białka wykazuje związek czasowy z nasileniem procesu synaptogenezy oraz rozpoczęciem czynności bioelektrycznej w komórkach nerwowych [6, 7, 313, 433]. W wielu strukturach parwalbumina pojawia się w około dwa tygodnie po wystąpieniu ekspresji GABA. Osiągnięcie dojrzałości czynnościowej neuronów PV-ir może zależeć od wcześniejszego wytworzenia podjednostek receptora NMDA w tych neuronach [12, 71, 259, 400]. Oddziaływanie glutaminianu na ukształtowane w sposób dojrzały receptory NMDA może więc przyczynić się do zwiększenia ekspresji parwalbuminy i podjęcia funkcji przez zawierające ją interneurony [22, 380]. Należy przypuszczać, że neurony projekcyjne licznych obszarów korowych, posiadające połączenia z przedmurzem i wykorzystujące glutaminian jako główny neuroprzebiegacz, mogą wywierać istotny wpływ na przebieg dojrzewania zawierających parwalbuminę interneuronów przedmurza.

5.6.3. Znaczenie czynnościowe tlenu azotu

Tlenek azotu działając w kolejnych stadiach rozwoju i dojrzewania wielu struktur ośrodkowego układu nerwowego, w tym także przedmurza, wpływa na różne procesy fizjologiczne. W najwcześniejszym okresie rozwoju, tlenek azotu bierze udział w regulacji przejścia fazy proliferacji komórkowej w fazę różnicowania neuronów [189, 378], a także w kontroli migracji neuronalnych [173, 406]. W późniejszym okresie wywiera wpływ na ukształtowanie połączeń, biorąc udział w stymulowaniu wzrostu aksonów i redukcji nieprawidłowych

połączeń [125], a także w zwiększaniu liczby rozgałęzień [81, 84, 191, 467, 468, 489, 490]. Ponadto, NO jest zaangażowany w regulacji procesu synaptogenezy [82, 354, 405], a także śmierci komórkowej [82, 354, 409, 498].

Oprócz wyżej wymienionych funkcji, należy podkreślić znaczenie tlenu azotu w przebiegu procesów uczenia się i zapamiętywania [105]. Przedmurze, jako struktura zaangażowana w procesy asocjacji korowej oraz ściśle powiązana z elementami układu limbicznego, odgrywa istotną rolę w wymienionych wyżej procesach [284-286, 482].

Na podstawie przeprowadzonych przeze mnie wcześniej badań przedmurza dorosłych szczurów, potwierdzonych przez innych autorów [171, 242], wykazano zróżnicowanie populacji neuronów NOS-ir przedmurza na subpopulację interneuronów oraz mniejszą liczebnie subpopulację neuronów projekcyjnych. Wskazuje to na istotną, choć nie w pełni poznaną, rolę tlenu azotu w regulacji czynności komórek nerwowych omawianej struktury.

5.7. Ocena dojrzewania populacji neuronów projekcyjnych w oparciu o metodę wstecznego transportu aksonalnego

Połączenia przedmurzowo-korowe u dojrzałego szczura były przedmiotem wcześniejszej oceny jakościowej [109, 312, 329, 402, 427, 480, 482] oraz ilościowej [238, 428]. Brak jest jednak w literaturze danych charakteryzujących dojrzewanie tych połączeń w okresie pourodzeniowym.

Uzyskane wyniki wskazują, że zjawiska dojrzewania populacji neuronów projekcyjnych przedmurza w badanym okresie obejmują przede wszystkim: 1/ zmiany rozkładu ich kształtów oraz 2/ zmiany gęstości numerycznej.

Neurony projekcyjne, związane z korą somatosensoryczną, są obecne we wszystkich badanych grupach wiekowych. Ocena zróżnicowania ich kształtów wskazuje na duży udział komórek owalnych, wrzecionowatych lub wielobocznych. Udział neuronów wielobocznych zwiększa się w okresie obserwacji. Zgodnie z podziałem morfologicznym neuronów przedmurza, zaproponowanym przez Mamos i Narkiewicza, neurony projekcyjne odpowiadają typom MS I – III [287]. Przejściowy wzrost gęstości numerycznej neuronów projekcyjnych osiąga maksimum po upływie dwóch tygodni.

Moment powstania połączeń przedmurzowo-korowych nie został dotychczas precyzyjnie określony. Opierając się na wynikach badań Bayer i Altman, dotyczących powstawania populacji neuronów przedmurza u szczura oraz przebiegu procesów migracji można podejrzewać, że połączenia te kształtują się w przedziale czasu między E16, a P7 [23]. Można przypuszczać, że ich rozwój rozpoczyna się po zakończeniu migracji neuronów już w okresie płodowym.

Jakkolwiek wytworzenie połączeń przedmurzowo-korowych ma miejsce w okresie przedurodzeniowym, to podobnie jak w przypadku połączeń wzgórzowo-korowych, proces ich kształtowania jest rozłożony w czasie, obejmując końcową fazę życia płodowego, jak i pierwsze dni po urodzeniu [273, 320, 321]. Dochodzi wówczas do penetracji warstw korowych, tworzenia rozgałęzień, tworzenia połączeń synaptycznych [318, 319]. W przypadku projekcji przedmurzowo-korowej są to przede wszystkim połączenia synaptyczne z neuronami IV warstwy korowej [419]. Funkcjonowanie połączeń rozpoczyna się po osiągnięciu dojrzałości przez populację neuronów projekcyjnych oraz interneuronów przedmurza.

Na podstawie przeprowadzonych badań, nie stwierdziłem istotnych zmian dotyczących ukształtowania badanej strefy projekcyjnej w przedmurzu. Ukształtowanie przestrzenne strefy projekcyjnej przedmurza wyprzedza niejako moment osiągnięcia maksymalnej gęstości neuronów projekcyjnych. Świadczy to o wczesnym przygotowaniu topograficznym badanej strefy projekcyjnej do podjęcia funkcji związanej z oddziaływaniem na czynność kory somatosensorycznej. Topograficzne uporządkowanie połączeń przedmurza z określonymi obszarami korowymi może być tłumaczone z jednej strony oddziaływaniem zróżnicowanych czynników chemotaktycznych, z drugiej zaś, wykorzystaniem zstępującej projekcji korowo-przedmurzowej jako rusztowania dla projekcji wstępującej, do odpowiednich obszarów korowych. Koncepcja przedmurzowo-korowej pętli neuronalnej wskazuje strefę projekcyjną przedmurza jako początek i koniec odpowiednich ramion wstępujących i zstępujących w danej projekcji [334]. Mogłoby to odpowiadać hipotezie „wyciągniętej ręki” (ang. *handshake hypothesis*) wprowadzonej dla wyjaśnienia topografii w połączeniach wzgórzowo-korowych [316, 319]. Istotną rolę odgrywają oddziaływania czynników troficznych, zawartych w aksonach neuronów projekcyjnych, jak i uwalnianych przez neurony kory mózgu. Można przypuszczać, że podobnie jak w przypadku połączeń wzgórzowo-korowych, wpływ kory mózgu może być zróżnicowany, w zależności od obszaru oraz wieku zwierzęcia, pozwalając na wzrost aksonów i penetrację kolejnych warstw korowych, tworzenie rozgałęzień i formowanie synaps [317-319]. Początkowa faza tego procesu jest zależna od substancji znajdujących się w przestrzeni międzykomórkowej, jak netryny czy semaforiny [49, 102, 304], a także od mechanizmów genetycznych [90, 91, 274]. Dalsze etapy zależą od obecności czynników chemotropowych uwalnianych przez neurony położone w miejscu docelowym dla danej projekcji [317].

Proces dojrzewania przedmurza, będący szeregiem zmian o charakterze ilościowym i jakościowym, zachodzących w populacji neuronów projekcyjnych, interneuronów oraz w układzie synaptycznym, koncentruje się głównie w okresie pierwszych czterech tygodni życia szczura. Występowanie zmian w tym samym okresie czasu, a także w wielu przypadkach, podobne wzorce dynamiczne dojrzewania, mogą wskazywać na wzajemne zależności pomiędzy

procesami zachodzącymi w obu populacjach neuronalnych i układzie synaptycznym.

Przedstawione wyniki wskazują na krytyczne znaczenie najwcześniejszego okresu życia zwierzęcia dla prawidłowego ukształtowania morfologicznego i biochemicznego badanej struktury ośrodkowego układu nerwowego.

6. PODSUMOWANIE WYNIKÓW I WNIOSKI

1. Przedmurze, w momencie urodzenia, jest strukturą niedojrzałą morfologicznie, a proces jego dojrzewania jest kontynuowany w okresie pourodzeniowym.

Wskazują na to zmiany ilościowe obserwowane w zróżnicowanej pod względem immunocytochemicznym populacji interneuronów, a także w populacji neuronów projekcyjnych oraz w zawartości białka synaptycznego SNAP-25. Ponadto, świadczą o tym zmiany zróżnicowania kształtu neuronów i struktury neuropilu.

2. Ocena zmian zachodzących w populacji interneuronów, neuronów projekcyjnych oraz w ekspresji białka synaptycznego SNAP-25 pozwala rozróżnić zmiany, których początek ma miejsce w okresie przedurodzeniowym oraz zmiany rozpoczynające się po urodzeniu.

W okresie przedurodzeniowym w przedmurzu rozpoczyna się ekspresja wszystkich badanych neuropeptydów (neuropeptydu Y, somatostatyny, wazoaktywnego peptydu jelitowego) oraz dwu spośród trzech badanych białek wiążących wapń (kalbindyny D28k i kalretyniny). Pojawiają się niektóre typy kolokalizacji (NPY/NOS, SOM/NOS, VIP/CR). Rozpoczyna się ponadto ekspresja białka synaptycznego SNAP-25 oraz kształtowanie neuropilu. Do najważniejszych zmian obserwowanych w okresie pourodzeniowym należy zaliczyć początek ekspresji parwalbuminy, pojawienie się pozostałych typów kolokalizacji (NPY/CB, NPY/CR, NPY/PV, SOM/CB), zmiany gęstości numerycznej populacji interneuronów oraz neuronów projekcyjnych, a ponadto – zmiany wielkości ekspresji białka synaptycznego SNAP-25.

3. Wśród badanych populacji neuronów zawierających neuropeptydy oraz białka wiążące wapń stwierdzono różnice w dynamice dojrzewania w okresie postnatalnym.

Wzrost gęstości numerycznej neuronów zaobserwowano w populacjach zawierających NPY, VIP, a także CR oraz PV. Nie stwierdzono istotnych zmian gęstości neuronów zawierających SOM. W populacji neuronów CB-ir zaobserwowano przejściowe zmniejszenie gęstości zachodzące w ciągu drugiego tygodnia życia.

Obserwowane zmiany wskazują na odrębności procesów regulujących ekspresję badanych neuropeptydów oraz białek wiążących wapń podczas dojrzewania przedmurza.

4. Badane substancje wykazują różnego typu kolokalizacje w neuronach przedmurza.

Stwierdzono obecność kolokalizacji neuropeptydu Y z trzema białkami wiążącymi wapń (NPY/CB, NPY/CR, NPY/PV) oraz z syntazą tlenu azotu (NPY/NOS). Somatostatyna wykazuje kolokalizację z jednym z badanych białek wiążących wapń (SOM/CB), a także z syntazą tlenu azotu (SOM/NOS). Wazoaktywny peptyd jelitowy kolokalizuje z kalretyniną (VIP/CR).

Obecność wielu typów kolokalizacji przemawia za znacznym zróżnicowaniem czynnościowym populacji interneuronów przedmurza. Poszczególne typy kolokalizacji pojawiają się na ściśle określonych etapach dojrzewania badanej struktury.

5. Połączenia przedmurzowo-korowe, jakkolwiek są już obecne w okresie postnatalnym, podlegają w tym czasie zmianom jakościowym i ilościowym.

Obserwuje się przejściowy wzrost gęstości neuronów projekcyjnych, występujący po upływie dwóch tygodni życia oraz stopniowe zwiększanie różnorodności kształtu tych neuronów.

6. Przebieg zmian ekspresji białka synaptycznego SNAP-25 podczas dojrzewania przedmurza odpowiada okresowi zmian ilościowych i jakościowych zarówno w populacji interneuronów, jak i neuronów projekcyjnych. Wskazuje to na jednoczesne dojrzewanie głównych składników morfologicznych przedmurzowo-korowej pętli neuronalnej.

7. Dojrzewanie przedmurza jest procesem wieloetapowym, rozciągającym się w okresie przed- i pourodzeniowym. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że zasadniczy jego etap, dotyczący kształtowania populacji interneuronów, neuronów projekcyjnych oraz układu synaptycznego, zachodzi w ciągu pierwszego miesiąca życia zwierzęcia.

7. STRESZCZENIE

Przedmurze jest dużą strukturą kresomózgowia ssaków, która połączona jest bogatym systemem dwukierunkowych projekcji przede wszystkim z wieloma obszarami kory nowej. Wyniki dotychczasowych badań wskazują na integracyjną funkcję tej struktury w stosunku do licznych obszarów korowych. O ile budowa i połączenia przedmurza zostały dokładnie zbadane u dojrzałych przedstawicieli różnych gatunków ssaków, o tyle rozwój i dojrzewanie przedmurza oraz kształtowanie jego połączeń poznane zostały fragmentarycznie. Osiągnięcie dojrzałości czynnościowej przedmurza zachodzi po zakończeniu procesów rozwoju i dojrzewania, przebiegających zarówno w okresie pre- jak i postnatalnym. Wymienione procesy obejmują między innymi kształtowanie: 1/ populacji interneuronów, 2/ neuronów projekcyjnych oraz 3/ układu synaptycznego.

Celem pracy była próba oceny charakteru i dynamiki zmian morfologicznych zachodzących w populacji interneuronów, a także neuronów projekcyjnych przedmurza oraz zmian w ekspresji białka synaptycznego SNAP-25, w okresie dojrzewania szczura. Ponadto, podjęte badania miały na celu określenie przedziału czasu, w którym kształtują się dojrzałe morfologicznie populacje neuronalne, a także układ synaptyczny przedmurza.

Materiał badawczy stanowiła grupa 245 szczurów rasy Wistar, obojga płci. Zwierzęta podzielono na grupy w zależności od wieku. Badania prowadzono w okresie obejmującym pierwsze cztery miesiące życia.

Metody badawcze obejmowały: badania immunocytochemiczne, badania oparte na wstecznym transporcie aksonalnym znacznika fluorescencyjnego oraz technikę immunoblottingu białka (Western blotting). Przedmiotem analizy immunocytochemicznej była ocena występowania trzech neuropeptydów: somatostatyny (SOM), neuropeptydu Y (NPY), wazoaktywnego peptydu jelitowego (VIP) oraz trzech białek wiążących wapń: parwalbuminy (PV), kalbindyny D28K (CB) i kalretyniny (CR) w neuronach przedmurza. Ponadto metodą podwójnego znakowania immunocytochemicznego oceniano kolokalizację wyżej wymienionych neuropeptydów z białkami wiążącymi wapń, a także z formą neuronalną syntazy tlenu azotu (nNOS). Metodą wstecznego transportu aksonalnego znacznika fluorescencyjnego (Fluoro-Gold) oceniono zmiany morfologiczne w populacji neuronów projekcyjnych przedmurza, posiadających połączenia z korą somatosensoryczną. Stosując metodę immunoblottingu (Western Blotting) oceniono zawartość białka synaptycznego SNAP-25.

Uzyskane wyniki analizowano jakościowo oraz ilościowo, stosując obiektywne metody morfometryczne. Korzystano w tym celu z mikroskopu fluorescencyjnego, współpracującego z systemem konfokalnym oraz z systemu do analizy stereologicznej.

Wszystkie badane neuropeptydy występują w interneuronach przedmurza w całym okresie obserwacji. Wśród populacji interneuronów zawierających neuropeptydy (-ir), wykazano wzrost gęstości numerycznej neuronów NPY- i VIP-ir w okresie pourodzeniowym. Maksymalne wartości gęstości populacje te osiągają odpowiednio w drugim oraz trzecim tygodniu życia. Gęstość neuronów SOM-ir w przedmurzu nie wykazuje istotnych zmian.

Wśród interneuronów zawierających białka wiążące wapń stwierdzono również charakterystyczne zróżnicowanie procesu dojrzewania. Neurony CB- i CR-ir występują we wszystkich grupach wiekowych, podczas gdy neurony PV-ir – dopiero poczynając od dziesiątego dnia po urodzeniu. Gęstość numeryczna neuronów zawierających CB-ir wykazuje przejściowy spadek w ciągu drugiego tygodnia życia. W populacji neuronów CR- oraz PV-ir stwierdza się wzrost gęstości, osiągający maksimum w trzecim tygodniu po urodzeniu.

Stosując podwójne barwienia immunocytochemiczne stwierdzono obecność kolokalizacji neuropeptydu Y z trzema białkami wiążącymi wapń: kalbindyną, kalretyniną, parwalbuminą, a także z syntazą tlenu azotu w neuronach przedmurza. Kolokalizacja somatostatyny zachodzi z kalbindyną, a ponadto z syntazą tlenu azotu. Stwierdzono obecność kolokalizacji wazoaktywnego peptydu jelitowego wyłącznie z kalretyniną.

Wykazano zróżnicowanie momentów pojawienia się typów kolokalizacji w dojrzewaniu przedmurza. W dniu urodzenia stwierdzono występowanie kolokalizacji: NPY/NOS, SOM/NOS oraz VIP/CR. Kolokalizacja NPY/CB występuje poczynając od czwartego dnia po urodzeniu. Po upływie tygodnia pojawiają się kolokalizacje NPY/CR oraz SOM/CB. Po upływie dwóch tygodni spotyka się kolokalizację NPY/PV.

Zaznacza się zróżnicowanie dynamiki dojrzewania typów kolokalizacji. Wzrost wartości odsetka podwójnie znakowanych neuronów wraz z wiekiem stwierdza się w : NPY/CB, NPY/CR, NPY/NOS oraz SOM/CB i VIP/CR.

Ocena morfologiczna populacji neuronów projekcyjnych przedmurza wskazuje na obecność połączeń tej struktury z korą somatosensoryczną już w najwcześniejszym okresie pourodzeniowym. Badania gęstości numerycznej neuronów projekcyjnych wykazują przejściowy wzrost wartości, osiągający maksimum po upływie dwóch tygodni.

Zarówno w populacji interneuronów, jak i neuronów projekcyjnych przedmurza, w badanym okresie zachodzą zmiany morfologiczne dotyczące wzbogacenia różnorodności kształtów neuronów. Obserwuje się także dojrzewanie neuropilu.

Obecność białka synaptycznego SNAP-25 stwierdzono we wszystkich grupach wiekowych. W ciągu drugiego i trzeciego tygodnia życia występuje wzrost zawartości SNAP-25. W dalszym okresie dojrzewania zaznacza się spadek zawartości tego białka, a następnie stabilizacja, charakteryzująca okres dojrzrzały.

Na podstawie uzyskanych wyników należy stwierdzić, że przedmurze w chwili urodzenia jest strukturą niedojrzałą morfologicznie. W okresie pourodzeniowym zachodzi w nim szereg procesów będących zarówno kontynuacją zjawisk rozpoczętych w okresie życia płodowego, jaki i rozpoczynających się po urodzeniu. Wśród interneuronów przedmurza zaznaczają się różnice w dynamice dojrzewania poszczególnych subpopulacji, zróżnicowanych pod względem zawartości neuromodulatorów oraz białek wiążących wapń. Pojawienie się określonych typów kolokalizacji w różnym okresie dojrzewania, może świadczyć o istnieniu zróżnicowanych mechanizmów regulujących ekspresję badanych substancji w interneuronach przedmurza.

Podobny we wszystkich grupach wiekowych schemat budowy przedmurzowej strefy projekcyjnej oraz wczesne powstanie połączeń przedmurzowo-korowych, wskazują na istotne znaczenie wpływu omawianej struktury na funkcje związanych z nią obszarów korowych.

Zmiany jakościowe i ilościowe zachodzące w populacji neuronów projekcyjnych przedmurza oraz w zawartości białka synaptycznego SNAP-25, wskazują na kontynuację dojrzewania połączeń w obrębie przedmurzowo-korowej pętli neuronalnej w okresie pourodzeniowym.

Koncentracja zjawisk związanych z dojrzewaniem populacji interneuronów, neuronów projekcyjnych oraz układu synaptycznego w ciągu pierwszego miesiąca życia wskazuje na decydujące znaczenie tego okresu dla ukształtowania dojrzrzałego pod względem cech morfologicznych oraz zdolności do wypełniania funkcji fizjologicznych przedmurza.

8. SUMMARY

Clastrum is a big telencephalic structure in mammals, connected by a system of reciprocal projections, predominantly with the numerous areas of the neocortex. The results of conducted studies indicate the integrative function of this structure in relationship to the numerous cortical areas. Although the morphology and connections of the claustrum were studied in the adult representatives of numerous mammalian species, its development and maturation, as well as formation of its connections have been studied rather fragmentary.

The physiological functions of this structure could be realized after completing of the processes of development and maturation, taking place in the prenatal and postnatal periods. These processes comprise among the others formation of the: 1/ population of the interneurons, 2/ projecting neurons and 3/ synaptogenesis.

The aim of the study was the assessment of the character and dynamics of morphological changes taking place in the populations of claustral interneurons and projecting neurons, as well as the changes in expression of synaptic protein SNAP-25, during the maturation of the rat. Additionally, the aim was to determine the period of time, during which the morphologically developed neuronal populations of the claustrum and its synaptic system appear.

245 Wistar rats, both sexes were used in the study. The animals were divided into groups, according to the age. The studies were conducted in the period of four months after birth.

The methods comprised immunocytochemical stainings, retrograde axonal transport of the fluorescent tracer and protein immunoblotting (Western blotting) method. Immunocytochemical stainings were performed to study the occurrence of three neuropeptides: neuropeptide Y (NPY), somatostatin (SOM), vasoactive intestinal peptide (VIP) and three calcium binding proteins: calbindin D28k (CB), calretinin (CR), parvalbumin (PV). Additionally, by the method of double staining, the colocalizations of neuropeptides with calcium binding proteins, as well as with nitric oxide synthase (nNOS) were studied. By the method of retrograde axonal transport of the fluorescent tracer (Fluoro-Gold) the morphological changes in the population of the claustral projecting neurons, connected with somatosensory cortex were assessed. The Western blotting method was used to determine the occurrence and concentration of SNAP-25 protein.

The results were studied quantitatively using the objective morphometric methods. The fluorescent microscope, confocal microscopic system and computer assisted stereological analyzing system were used in the study.

All studied neuropeptides occur in the interneurons of the claustrum during the whole studied period. Among neuropeptide-containing neuronal populations the increase of the numerical density was observed for NPY- and VIP-immunoreactive (-ir) neurons. The highest values of the numerical densities are observed in the second and third weeks of life, respectively. The numerical density of SOM-ir neurons in the claustrum does not reveal significant changes.

Among the neurons containing the calcium binding proteins the differentiation of the process of maturation is also observed. CB- and CR-ir neurons are present in all studied age groups, whereas PV-ir neurons – since the 10th postnatal day. The numerical density of CB-ir neurons reveals transient decrease during the second postnatal week. In the populations of the CR- and PV-ir the increase in the numerical density is observed, with the maximum in the third postnatal week.

The double immunocytochemical stainings reveal colocalization of neuropeptide Y with three calcium binding proteins: calbindin, calretinin and parvalbumin, as well as with nitric oxide synthase. Colocalization of somatostatin with calbindin and with nitric oxide synthase is reported. Additionally, colocalization of vasoactive intestinal peptide with calretinin is observed in the claustral neurons.

The moments of occurrence of particular types of colocalizations are differentiated. In the day of birth the colocalizations of NPY/NOS, SOM/NOS and VIP/CR are present. The NPY/CB type of colocalization occurs since the fourth postnatal day. Two types of colocalizations - NPY/CR and SOM/CB are observed since the seventh day of life, whereas NPY/PV type of colocalization – after two weeks of life.

The differentiation in the developmental dynamics of various types of colocalizations is observed. The increase in the percentage of double labeled neurons with the age is observed in NPY/CB, NPY/CR, NPY/NOS, SOM/CB and VIP/CR.

The morphological studies of the population of the claustral projecting neurons reveals the presence of connections with the somatosensory cortex in the earliest postnatal period. The studies of the numerical density of projecting neurons reveal the transient increase, with the maximum value after two weeks of life.

In the populations of interneurons and projecting neurons the increase in differentiation of neuronal shapes is observed. The neuropil maturation takes place in the period of study.

The synaptic protein SNAP-25 is present in the neurons of claustrum during the whole period of study. Its concentration increases during the second and third

weeks of life. Later the concentration of SNAP-25 decreases and its stabilization takes place.

On the basis of obtained results, it may be concluded that the claustrum, at the moment of birth, is not matured morphologically. In the postnatal period numerous processes take place in the claustrum, some of them start in the fetal period, whereas the others – after birth. Among the claustral interneurons, containing various neuromodulators and calcium binding proteins, the differences in the dynamics of maturation are reported. The occurrence of various types of colocalizations at various stages of maturation, may suggest presence of specific mechanisms, regulating the expression of studied substances in the claustral interneurons.

The similar morphological scheme of the claustral somatosensory projecting zone, in all age groups, and early occurrence of the claustral-cortical connections, indicate the important influence of the studied structure on the function of related cortical regions.

The character of morphological changes taking place in the claustral projecting neurons, as well as in the concentration of synaptic protein SNAP-25, indicate the continuation of maturation process of the claustral-cortical loop in postnatal period.

The concentration of numerous processes concerning maturation of interneurons, projecting neurons and synaptic system in the first postnatal month indicate the crucial role of this period for morphological and functional formation of the adult claustrum.

9. PIŚMIENNICTWO

1. Acsady L., Arabadzisz D., Freund T.F.: Correlated morphological and neurochemical features identify different subsets of vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive interneurons in rat hippocampus. *Neuroscience*. 1996, 73, 299.
2. Aitoubah J., Itaya S.K., Bretzner F., Chemtob S., Guillemot J.P., Tan Y.F., Shumikhina S., Molotchnikoff S.: Influence of NO downregulation on oscillatory evoked responses in developing rat superior colliculus. *Brain Res Dev Brain Res*. 2002, 138, 155.
3. Akil M., Lewis D.A.: Differential distribution of parvalbumin-immunoreactive pericellular clusters of terminal boutons in developing and adult monkey neocortex. *Exp Neurol*. 1992, 115, 239.
4. Alcantara S., de L.L., del Rio J.A., Ferrer I., Soriano E.: Transient colocalization of parvalbumin and calbindin D28k in the postnatal cerebral cortex: evidence for a phenotypic shift in developing nonpyramidal neurons. *Eur. J. Neurosci*. 1996, 8, 1329.
5. Alcantara S., Ferrer I.: Postnatal development of calbindin-D28k immunoreactivity in the cerebral cortex of the cat. *Anat Embryol (Berl)*. 1995, 192, 369.
6. Alcantara S., Ferrer I.: Postnatal development of parvalbumin immunoreactivity in the cerebral cortex of the cat. *J Comp Neurol*. 1994, 348, 133.
7. Alcantara S., Ferrer I., Soriano E.: Postnatal development of parvalbumin and calbindin D28K immunoreactivities in the cerebral cortex of the rat. *Anat Embryol (Berl)*. 1993, 188, 63.
8. Alderton W.K., Cooper C.E., Knowles R.G.: Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*. 2001, 357, 593.
9. Allen J.M., McGregor G.P., Woodhams P.L., Polak J.M., Bloom S.R.: Ontogeny of a novel peptide, neuropeptide Y (NPY) in rat brain. *Brain Res*. 1984, 303, 197.
10. Almazan G., Lefebvre D.L., Zingg H.H.: Ontogeny of hypothalamic vasopressin, oxytocin and somatostatin gene expression. *Brain Res Dev Brain Res*. 1989, 45, 69.
11. Anderson S.A., Marin O., Horn C., Jennings K., Rubenstein J.L.: Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences. *Development*. 2001, 128, 353.

12. Andressen C., Blümcke I., Celio M.R.: Calcium-binding proteins: selective markers of nerve cells. *Cell Tiss Res.* 1993, 271, 181.
13. Antonijevic I.A., Murck H., Bohlhalter S., Frieboes R.M., Holsboer F., Steiger A.: Neuropeptide Y promotes sleep and inhibits ACTH and cortisol release in young men. *Neuropharmacology.* 2000, 39, 1474.
14. Antonopoulos J., Papadopoulos G.C., Michaloudi H., Cavanagh M.E., Parnavelas J.G.: Postnatal development of neuropeptide Y-containing neurons in the visual cortex of normal- and dark-reared rats. *Neurosci Lett.* 1992, 145, 75.
15. Arancio O., Kiebler M., Lee C.J., Lev-Ram V., Tsien R.Y., Kandel E.R., Hawkins R.D.: Nitric oxide acts directly in the presynaptic neuron to produce long-term potentiation in cultured hippocampal neurons. *Cell.* 1996, 87, 1025.
16. Bacci A., Huguenard J.R., Prince D.A.: Differential modulation of synaptic transmission by neuropeptide Y in rat neocortical neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002, 99, 17125.
17. Baimbridge K.G., Celio M.R., Rogers J.H.: Calcium-binding proteins in the nervous system. *Trends Neurosci.* 1992, 15, 303.
18. Baizer J.S.: Serotonergic innervation of the primate claustrum. *Brain Res Bull.* 2001, 55, 431.
19. Banati R.B., Goerres 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.* 2000, 38, 115.
20. Baram T.Z., Schultz L.: Ontogeny of somatostatin gene expression in rat diencephalon. *Dev Neurosci.* 1991, 13, 176.
21. Bark I.C., Hahn K.M., Ryabinin A.E., Wilson M.C.: Differential expression of SNAP-25 protein isoforms during divergent vesicle fusion events of neural development. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995, 92, 1510.
22. Barker D.A., Dreher B.: Spatiotemporal patterns of ontogenetic expression of parvalbumin in the superior colliculi of rats and rabbits. *J Comp Neurol.* 1998, 393, 210.
23. Bayer S.A., Altman J.: Development of the endopiriform nucleus and the claustrum in the rat brain. *Neuroscience.* 1991, 45, 391.
24. Bayer S.A., Altman J.: *Neocortical development*, Raven Press, New York 1991, 153.

25. Bayer S.A., Altman J., Russo R.J., Zhang X.: Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat. *Neurotoxicology*. 1993, 14, 83.
26. Bayraktar T., Staiger J.F., Acsady L., Cozzari C., Freund T.F., Zilles K.: Co-localization of vasoactive intestinal polypeptide, gamma-aminobutyric acid and choline acetyltransferase in neocortical interneurons of the adult rat. *Brain Res*. 1997, 757, 209.
27. Bayraktar T., Welker E., Freund T.F., Zilles K., Staiger J.F.: Neurons immunoreactive for vasoactive intestinal polypeptide in the rat primary somatosensory cortex: Morphology and spatial relationship to barrel-related columns. *J Comp Neurol*. 2000, 420, 291.
28. Beal M.F., Mazurek M.F., Martin J.B.: A comparison of somatostatin and neuropeptide Y distribution in monkey brain. *Brain Res*. 1987, 405, 213.
29. Beal M.F., Walker L.C., Swartz K.J., Casanova M.F., Price D.L.: Developmental changes of neuropeptides and amino acids in baboon cortex. *Brain Res Dev Brain Res*. 1988, 44, 156.
30. Beck B., Kozak R., Stricker-Krongrad A., Burlet C.: Neuropeptide Y release in the paraventricular nucleus of Long-Evans rats treated with leptin. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998, 242, 636.
31. Beck B., Richy S., Dimitrov T., Stricker-Krongrad A.: Opposite regulation of hypothalamic orexin and neuropeptide Y receptors and peptide expressions in obese Zucker rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001, 286, 518.
32. Behan M., Haberly L.B.: Intrinsic and efferent connections of the endopiriform nucleus in rat. *J Comp Neurol*. 1999, 408, 532.
33. Benali N., Ferjoux G., Puente E., Buscail L., Susini C.: Somatostatin receptors. *Digestion*. 2000, 62 Suppl 1, 27.
34. Bendotti C., Hohmann C., Forloni G., Reeves R., Coyle J.T., Oster-Granite M.L.: Developmental expression of somatostatin in mouse brain. II. In situ hybridization. *Brain Res Dev Brain Res*. 1990, 53, 26.
35. Berdel B., Moryś J.: Expression of calbindin-D28k and parvalbumin during development of rat's basolateral amygdaloid complex. *Int J Dev Neurosci*. 2000, 18, 501.
36. Bergmann I., Nitsch R., Frotscher M.: Area-specific morphological and neurochemical maturation of non-pyramidal neurons in the rat hippocampus as revealed by parvalbumin immunocytochemistry. *Anat Embryol (Berl)*. 1991, 184, 403.

37. Bertini G., Peng Z.-C., Bentivoglio M.: The chemical heterogeneity of cortical interneurons: Nitric oxide synthase vs calbindin and parvalbumin immunoreactivity in the rat. *Brain Res Bull.* 1996, 39, 261.
38. Bhide P.G., Frost D.O.: Stages of growth of hamster retinofugal axons: implications for developing axonal pathways with multiple targets. *J. Neurosci.* 1991, 11, 485.
39. Białowąs J., Chadzypanagiotis D.: Structure of the claustrum in rabbits. *Folia Morphol (Warsz).* 1972, 31, 73.
40. Bidmon H.J., Wu J., Gödecke A., Schleicher A., Mayer B., Zilles K.: Nitric oxide synthase-expressing neurons are area-specifically distributed within the cerebral cortex of the rat. *Neuroscience.* 1997, 81, 321.
41. Bijak M.: Neuropeptide Y reduces epileptiform discharges and excitatory synaptic transmission in rat frontal cortex in vitro. *Neuroscience.* 2000, 96, 487.
42. Biranowska J., Dziewiątkowski J., Ludkiewicz B., Moryś J.: Developmental changes of synaptic proteins' expression within the hippocampal formation of the rat. In: 2002.
43. Bohme G.A., Bon C., Stutzmann J.M., Doble A., Blanchard J.C.: Possible involvement of nitric oxide in long-term potentiation. *Eur J Pharmacol.* 1991, 199, 379.
44. Bolwig T.G., Woldbye D.P., Mikkelsen J.D.: Electroconvulsive therapy as an anticonvulsant: a possible role of neuropeptide Y (NPY). *J ECT.* 1999, 15, 93.
45. Boschert U., O'Shaughnessy C., Dickinson R., Tessari M., Bendotti C., Catsicas S., Pich E.M.: Developmental and plasticity-related differential expression of two SNAP-25 isoforms in the rat brain. *J Comp Neurol.* 1996, 367, 177.
46. Boulton C.L., Southam E., Garthwaite J.: Nitric oxide-dependent long-term potentiation is blocked by a specific inhibitor of soluble guanylyl cyclase. *Neuroscience.* 1995, 69, 699.
47. Bourgeois J.P.: Synaptogenesis, heterochrony and epigenesis in the mammalian neocortex. *Acta Paediatr.* 1997, 86, 27.
48. Braak H., Braak E.: Neuronal types in the claustrum of man. *Anat Embryol (Berl).* 1982, 163, 447.
49. Braisted J.E., Catalano S.M., Stimac R., Kennedy T.E., Tessier-Lavigne M., Shatz C.J., O'Leary D.D.M.: Netrin-1 promotes thalamic axon growth

- and is required for proper development of the thalamocortical projection. *J. Neurosci.* 2000, 20, 5792.
50. Brand S.: A serial section Golgi analysis of the primate claustrum. *Anat Embryol (Berl)*. 1981, 162, 475.
 51. Bredt D.S., Snyder S.H.: Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989, 86, 9030.
 52. Bredt D.S., Snyder S.H.: Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron*. 1992, 8, 3.
 53. Brenneman D.E., Glazner G., Hill J.M., Hauser J., Davidson A., Gozes I.: VIP neurotrophism in the central nervous system: multiple effectors and identification of a femtomolar-acting neuroprotective peptide. *Ann N Y Acad Sci*. 1998, 865, 207.
 54. Brenneman D.E., Hauser J., Phillips T.M., Davidson A., Bassan M., Gozes I.: Vasoactive intestinal peptide. Link between electrical activity and glia-mediated neurotrophism. *Ann N. Y. Acad Sci*. 1999, 897, 17.
 55. Brian J.E., Jr., Faraci F.M., Heistad D.D.: Recent insights into the regulation of cerebral circulation. *Clin. Exp. Pharmacol Physiol*. 1996, 23, 449.
 56. Brodmann K.: *Vergleichende Lokalisationslehre der Grosshirnrinde*, Barth, Leipzig 1909.
 57. Brylińska J., Kwiatkowska J.: *Zwierzeta laboratoryjne. Metody hodowli i doswiadczen*, Universitas, Kraków 1996, 269.
 58. Burgunder J.M.: Ontogeny of somatostatin gene expression in rat forebrain. *Brain Res Dev Brain Res*. 1994, 78, 109.
 59. Butler A.B., Molnar Z., Manger P.R.: Apparent absence of claustrum in monotremes: Implications for forebrain evolution in Amniotes. *Brain Behav Evol*. 2002, 60, 230.
 60. Caberlotto L., Tinner B., Bunnemann B., Agnati L., Fuxe K.: On the relationship of neuropeptide Y Y1 receptor-immunoreactive neuronal structures to the neuropeptide Y-immunoreactive nerve terminal networks. A double immunolabelling analysis in the rat brain. *Neuroscience*. 1998, 86, 827.
 61. Calvert G.A.: Crossmodal processing in the human brain: insights from functional neuroimaging studies. *Cereb Cortex*. 2001, 11, 1110.
 62. Calvert G.A., Brammer M.J., Iversen S.D.: Crossmodal identification. *Trends in Cognitive Sciences*. 1998, 2, 247.

63. Calvert G.A., Hansen P.C., Iversen S.D., Brammer M.J.: Detection of audio-visual integration sites in humans by application of electrophysiological criteria to the BOLD effect. *Neuroimage*. 2001, 14, 427.
64. Carman J.B., Cowan W.M., Powell T.P.S.: The cortical projection upon the claustrum. *J. Neurol. Neurosurg Psychiatry*. 1964, 2, 46.
65. Catsicas S., Larhammar D., Blomqvist A., Sanna P.P., Milner R.J., Wilson M.C.: Expression of a conserved cell-type-specific protein in nerve terminals coincides with synaptogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991, 88, 785.
66. Catsicas S., Thanos S., Clarke P.G.: Major role for neuronal death during brain development: refinement of topographical connections. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 1987, 84, 8165.
67. Cauli B., Audinat E., Lambolez B., Angulo M.C., Ropert N., Tsuzuki K., Hestrin S., Rossier J.: Molecular and physiological diversity of cortical nonpyramidal cells. *J. Neurosci*. 1997, 17, 3894.
68. Cauli B., Porter J.T., Tsuzuki K., Lambolez B., Rossier J., Quenet B., Audinat E.: Classification of fusiform neocortical interneurons based on unsupervised clustering. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 2000, 97, 6144.
69. Cavanagh M.E., Parnavelas J.G.: Development of neuropeptide Y (NPY) immunoreactive neurons in the rat occipital cortex: a combined immunohistochemical - autoradiographic study. *J Comp Neurol*. 1990, 297, 553.
70. Cavanagh M.E., Parnavelas J.G.: Development of vasoactive-intestinal polypeptide-immunoreactive neurons in the rat occipital cortex: a combined immunohistochemical-autoradiographic study. *J. Comp. Neurol*. 1989, 284, 637.
71. Celio M.R.: Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience*. 1990, 35, 375.
72. Celio M.R.: Calcium binding proteins in the brain. *Arch. Ital. Anat. Embriol*. 1989, 94, 227.
73. Celio M.R.: Parvalbumin in most gamma-aminobutyric acid-containing neurons of the rat cerebral cortex. *Science*. 1986, 231, 995.
74. Celio M.R., Heizmann C.W.: Calcium-binding protein parvalbumin as a neuronal marker. *Nature*. 1981, 293, 300.
75. Celio M.R., Heizmann C.W.: Calcium-binding protein parvalbumin is associated with fast contracting muscle fibres. *Nature*. 1982, 297, 504.
76. Chedotal A., Cozzari C., Faure M.P., Hartman B.K., Hamel E.: Distinct choline acetyltransferase (ChAT) and vasoactive intestinal polypeptide

- (VIP) bipolar neurons project to local blood vessels in the rat cerebral cortex. *Brain Res.* 1994, 646, 181.
77. Chen G., Van Den Pol A.N.: Multiple NPY receptors coexist in pre- and postsynaptic sites: inhibition of GABA release in isolated self-innervating SCN neurons. *J. Neurosci.* 1996, 16, 7711.
 78. Christensen J., Sorensen J.C., Ostergaard K., Zimmer J.: Early postnatal development of the rat corticostriatal pathway: an anterograde axonal tracing study using biocytin pellets. *Anat. Embryol. (Berl).* 1999, 200, 73.
 79. Clasca F., Avendano C., Roman-Guindo A., Llamas A., Reinoso-Suarez F.: Innervation from the claustrum of the frontal association and motor areas: axonal transport studies in the cat. *J. Comp. Neurol.* 1992, 326, 402.
 80. Clasca F., Llamas A., Reinoso-Suárez F.: Hypothalamic connections of the insular cortex in the cat. *Brain Res.* 1989, 490, 361.
 81. Cogen J., Cohen-Cory S.: Nitric oxide modulates retinal ganglion cell axon arbor remodeling in vivo. *J. Neurobiol.* 2000, 45, 120.
 82. Contestabile A.: Roles of NMDA receptor activity and nitric oxide production in brain development. *Brain Res Rev.* 2000, 32, 476.
 83. Coorssen J.R., Blank P.S., Albertorio F., Bezrukov L., Kolosova I., Chen X., Backlund P.S., Jr., Zimmerberg J.: Regulated secretion: SNARE density, vesicle fusion and calcium dependence. *J. Cell Sci.* 2003, 116, 2087.
 84. Cork R.J., Calhoun T., Perrone M., Mize R.R.: Postnatal development of nitric oxide synthase expression in the mouse superior colliculus. *J. Comp. Neurol.* 2000, 427, 581.
 85. Cornette L., Dupont P., Spileers W., Sunaert S., Michiels J., van Hecke P., Mortelmans L., Orban G.A.: Human cerebral activity evoked by motion reversal and motion onset. A PET study. *Brain.* 1998, 121 (Pt 1), 143.
 86. Cramer K.S., Angelucci A., Hahm J.O., Bogdanov M.B., Sur M.: A role for nitric oxide in the development of the ferret retinogeniculate projection. *J. Neurosci.* 1996, 16, 7995.
 87. Crepel F., Audinat E., Daniel H., Hemart N., Jaillard D., Rossier J., Lambolez B.: Cellular locus of the nitric oxide-synthase involved in cerebellar long-term depression induced by high external potassium concentration. *Neuropharmacology.* 1994, 33, 1399.
 88. Crescimanno G., Salerno M.T., Cortimiglia R., Amato G.: Claustral influence on ipsi- and contralateral motor cortical areas, in the cat. *Brain Res Bull.* 1989, 22, 839.

89. Crescimanno G., Salerno M.T., Cortimiglia R., Amato G., Infantellina F.: Functional aspects of the relation between the claustrum and motor cortex in the cat. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* 1984, 60, 1233.
90. Davies A.M.: Intrinsic differences in the growth rate of early nerve fibres related to target distance. *Nature.* 1989, 337, 553.
91. Davies A.M., Lumsden A.: Ontogeny of the somatosensory system: origins and early development of primary sensory neurons. *Annu Rev Neurosci.* 1990, 13, 61.
92. 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.* 2005, 481, 42.
93. Dawson T.M., Dawson V.L.: Nitric oxide synthase: role as a transmitter/mediator in the brain and endocrine system. *Annu Rev Med.* 1996, 47, 219.
94. Dawson T.M., Dawson V.L., Snyder S.H.: A novel neuronal messenger molecule in brain: the free radical, nitric oxide. *Ann Neurol.* 1992, 32, 297.
95. Dawson T.M., Dawson V.L., Snyder S.H.: Molecular mechanisms of nitric oxide actions in the brain. *Ann N Y Acad Sci.* 1994, 738, 76.
96. Dawson V.L., Dawson T.M.: Deadly conversations: nuclear-mitochondrial cross-talk. *J Bioenerg Biomembr.* 2004, 36, 287.
97. De Lecea L., Del Río J.A., Soriano E.: Developmental expression of parvalbumin mRNA in the cerebral cortex and hippocampus of the rat. *Mol Brain Res.* 1995, 32, 1.
98. 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.* 1997, 14, 1.
99. del Rio J.A., De Lecea L., Ferrer I., Soriano E.: The development of parvalbumin-immunoreactivity in the neocortex of the mouse. *Dev Brain Res.* 1994, 81, 247.
100. 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.* 1991, 84, 538.
101. Demeulemeester H., Vandesande F., Orban G.A., Brandon C., Vanderhaeghen J.J.: Heterogeneity of GABAergic cells in cat visual cortex. *J. Neurosci.* 1988, 8, 988.

102. Dent E.W., Barnes A.M., Tang F., Kalil K.: Netrin-1 and semaphorin 3A promote or inhibit cortical axon branching, respectively, by reorganization of the cytoskeleton. *J. Neurosci.* 2004, 24, 3002.
103. DeVries E.: Bemerkungen zur Ontogenie und Phylogenie des Claustrum. *Folia Neurobiol.* 1910, 4, 481.
104. Dinopoulos A., Papadopoulos G.C., Michaloudi H., Parnavelas J.G., Uyllings H.B.M., Karamanlidis A.N.: Claustrum in the Hedgehog (*Erinaceus europaeus*) brain: Cytoarchitecture and connections with cortical and sub-cortical structures. *J. Comp. Neurol.* 1992, 316, 187.
105. Downen M., Zhao M.L., Lee P., Weidenheim K.M., Dickson D.W., Lee S.C.: Neuronal nitric oxide synthase expression in developing and adult human CNS. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1999, 58, 12.
106. Druga R.: The claustrum of the cat (*Felis domestica*). *Folia Morphol (Praha)*. 1966, 14, 7.
107. Druga R.: Efferent projections from the claustrum (an experimental study using Nauta's method). *Folia Morphol. (Praha)*. 1972, 20, 163.
108. Druga R.: The claustrum and the transitional neo-paleocortical area of the hedgehog (*Erinaceus europaeus*). *Anat Anz.* 1974, 135, 442.
109. Druga R.: Claustro-neocortical connections in the cat and rat demonstrated by HRP tracing technique. *J. Hirnforsch.* 1982, 23, 191.
110. 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.* 1993, 6, 399.
111. Dun N.J., Dun S.L., Wong R.K.S., Forstermann U.: Colocalization of nitric oxide synthase and somatostatin immunoreactivity in rat dentate hilar neurons. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994, 91, 2955.
112. Dun N.J., Huang R., Dun S.L., Forstermann U.: Infrequent colocalization of nitric oxide synthase and calcium binding proteins immunoreactivity in rat neocortical neurons. *Brain Res.* 1994, 666, 289.
113. Eadie L.A., Parnavelas J.G., Franke E.: Development of the ultrastructural features of somatostatin-immunoreactive neurons in the rat visual cortex. *J Neurocytol.* 1987, 16, 445.
114. Eadie L.A., Parnavelas J.G., Franke E.: Development of the ultrastructural features of neuropeptide Y-immunoreactive neurons in the rat visual cortex. *J. Neurocytol.* 1990, 19, 455.
115. Economo C., von Koskinas G.N.: *Die Cytoarchitektonik der Hirnrinde des erwachsenen Menschen*, Springer, Wien, Berlin 1925.

116. Edelstein L.R., Denaro F.J.: The claustrum: a historical review of its anatomy, physiology, cytochemistry and functional significance. *Cell Mol Biol (Noisy -le-grand)*. 2004, 50, 675.
117. Eiden L.E., Mezey E., Eskay R.L., Beinfeld M.C., Palkovits M.: Neuropeptide content and connectivity of the rat claustrum. *Brain Res*. 1990, 523, 245.
118. Ekstrand J.J., Domroese M.E., Feig S.L., Illig K.R., Haberly L.B.: Immunocytochemical analysis of basket cells in rat piriform cortex. *J. Comp. Neurol*. 2001, 434, 308.
119. 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*. 2001, 434, 289.
120. Emson P.C., Gilbert R.F., Loren I., Fahrenkrug J., Sundler F., Schafalitzky de Muckadell O.B.: Development of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) containing neurones in the rat brain. *Brain Res*. 1979, 177, 437.
121. 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)*. 1987, 177, 15.
122. Endo T., Kobayashi S., Onaya T.: Parvalbumin in rat cerebrum, cerebellum and retina during postnatal development. *Neurosci Lett*. 1985, 60, 279.
123. Epelbaum J.: Somatostatin in the central nervous system: physiology and pathological modifications. *Prog Neurobiol*. 1986, 27, 63.
124. Epelbaum J., Dournaud P., Fodor M., Viollet C.: The neurobiology of somatostatin. *Crit Rev Neurobiol*. 1994, 8, 25.
125. Ernst A.F., Journey W.M., McLoon S.C.: Mechanisms involved in development of retinotectal connections: roles of Eph receptor tyrosine kinases, NMDA receptors and nitric oxide. *Prog Brain Res*. 1998, 118, 115.
126. Ettlinger G., Wilson W.A.: Cross-modal performance: behavioural processes, phylogenetic considerations and neural mechanisms. *Behav Brain Res*. 1990, 40, 169.
127. Faraci F.M., Sobey C.G.: Role of soluble guanylate cyclase in dilator responses of the cerebral microcirculation. *Brain Res*. 1999, 821, 368.
128. Fehmann H.C., Arnold R.: Somatostatin receptors: a new pathway into the tumor? *Z Gastroenterol*. 1996, 34, 298.
129. Feldman S.C., Harris M.R., Laemle L.K.: The maturation of the somatostatin systems in the rat visual cortex. *Peptides*. 1990, 11, 1055.

130. Ferriero D.M., Sagar S.M.: Development of neuropeptide Y-immunoreactive neurons in the rat retina. *Brain Res Dev Brain Res.* 1989, 48, 19.
131. Ferriero D.M., Sheldon R.A., Messing R.O.: Somatostatin enhances nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells. *Brain Res Dev Brain Res.* 1994, 80, 13.
132. Festoff B.W., Nelson P.G., Brenneman D.E.: Prevention of activity-dependent neuronal death: vasoactive intestinal polypeptide stimulates astrocytes to secrete the thrombin-inhibiting neurotrophic serpin, protease nexin I. *J Neurobiol.* 1996, 30, 255.
133. Figueredo-Cardenas G., Morello M., Sancesario G., Bernardi G., Reiner A.: Colocalization of somatostatin, neuropeptide Y, neuronal nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase in striatal interneurons in rats. *Brain Res.* 1996, 735, 317.
134. Filimonoff I.N.: The claustrum, its origin and development. *J Hirnforsch.* 1966, 8, 503.
135. Fitzpatrick-McElligott S., Card J.P., O'Kane T.M., Baldino F., Jr.: Ontogeny of somatostatin mRNA-containing perikarya in the rat central nervous system. *Synapse.* 1991, 7, 123.
136. Flindt-Egebak P., Olsen R.B.: Some efferent connections of the feline claustrum. *Neurosci Lett Suppl.* 1979, p 159.
137. Fontanesi G., Petrucci C., Lazzarini M., Blandizzi C., Del T.M., Bagnoli P.: Chronic exposure to either somatostatin (SS) or octreotide, a long-lasting SS analogue, affects SS expression in the postnatal visual cortex of the rat. *Brain Res Dev Brain Res.* 1998, 107, 91.
138. Forloni G., Hohmann C., Coyle J.T.: Developmental expression of somatostatin in mouse brain. I. Immunocytochemical studies. *Brain Res Dev Brain Res.* 1990, 53, 6.
139. 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.* 1998, 83, 1203.
140. Freund T.F., Buzsáki G.: Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus.* 1996, 6, 347.
141. Freund T.F., Buzsaki G., Leon A., Baimbridge K.G., Somogyi P.: Relationship of neuronal vulnerability and calcium binding protein immunoreactivity in ischemia. *Exp Brain Res.* 1990, 83, 55.

142. Friauf E.: Distribution of calcium-binding protein calbindin-D28k in the auditory system of adult and developing rats. *J Comp Neurol.* 1994, 349, 193.
143. Fuxe K., Agnati L.F., Harfstrand A., Zoli M., von E.G., Grimaldi R., Merlo P.E., Bjelke B., Eneroth P., Benfenati F., .: On the role of neuropeptide Y in information handling in the central nervous system in normal and physiopathological states. Focus on volume transmission and neuropeptide Y/alpha 2 receptor interactions. *Ann N Y Acad Sci.* 1990, 579, 28.
144. Gally J.A., Montague P.R., Reeke G.N., Jr., Edelman G.M.: The NO hypothesis: possible effects of a short-lived, rapidly diffusible signal in the development and function of the nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990, 87, 3547.
145. Garthwaite J.: Glutamate, nitric oxide and cell - cell signalling in the nervous system. *TINS.* 1991, 14, 60.
146. Garthwaite J., Boulton C.L.: Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu Rev Physiol.* 1995, 57, 683.
147. Garthwaite J., Charles S.L., Chess-Williams R.: Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature.* 1988, 336, 385.
148. Garthwaite J., Garthwaite G., Palmer R.M.J., Moncada S.: NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. *Eur J Pharmacol.* 1989, 172, 413.
149. Garthwaite J., Southam E., Boulton C.L., Nielsen E.B., Schmidt K., Mayer B.: Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. *Mol Pharmacol.* 1995, 48, 184.
150. Gaspar P., Berger B., Lesur A., Borsotti J.P., Febvret A.: Somatostatin 28 and neuropeptide Y innervation in the septal area and related cortical and subcortical structures of the human brain. Distribution, relationships and evidence for differential coexistence. *Neuroscience.* 1987, 22, 49.
151. Gehlert D.R.: Introduction to the reviews on neuropeptide Y. *Neuropeptides.* 2004, 38, 135.
152. Glazner G.W., Gressens P., Lee S.J., Gibney G., Gozes I., Gozes Y., Brenneman D.E., Hill J.M.: Activity-dependent neurotrophic factor: a potent regulator of embryonic growth and development. *Anat Embryol (Berl).* 1999, 200, 65.
153. Gomez-Urquijo S.M., Gutierrez-Ibarluzea I., Bueno-Lopez J.L., Reblet C.: Percentage incidence of gamma-aminobutyric acid neurons in the claus-

- trum of the rabbit and comparison with the cortex and putamen. *Neurosci Lett.* 2000, 282, 177.
154. Gonchar Y., Burkhalter A.: Three distinct families of GABAergic neurons in rat visual cortex. *Cereb Cortex.* 1997, 7, 347.
 155. Gonzalez B., Leroux P., Lamacz M., Bodenat C., Balazs R., Vaudry H.: Somatostatin receptors are expressed by immature cerebellar granule cells: evidence for a direct inhibitory effect of somatostatin on neuroblast activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992, 89, 9627.
 156. Gonzalez B.J., Leroux P., Basille M., Bodenat C., Vaudry H.: Somatostatin and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP): two neuropeptides potentially involved in the development of the rat cerebellum. *Ann Endocrinol (Paris).* 1994, 55, 243.
 157. Goodman C.S.: Mechanisms and molecules that control growth cone guidance. *Annu Rev Neurosci.* 1996, 19, 341.
 158. Goodman C.S., Shatz C.J.: Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity. *Cell.* 1993, 72 Suppl, 77.
 159. Gotz M., Bolz J.: Development of vasoactive intestinal polypeptide (VIP)-containing neurons in organotypic slice cultures from rat visual cortex. *Neurosci Lett.* 1989, 107, 6.
 160. Gozes I., Divinsky I., Pilzer I., Fridkin M., Brenneman D.E., Spier A.D.: From vasoactive intestinal peptide (VIP) through activity-dependent neuroprotective protein (ADNP) to NAP: a view of neuroprotection and cell division. *J Mol Neurosci.* 2003, 20, 315.
 161. Gozes I., Schachter P., Shani Y., Giladi E.: Vasoactive intestinal peptide gene expression from embryos to aging rats. *Neuroendocrinology.* 1988, 47, 27.
 162. Gozes I., Shani Y., Rostene W.H.: Developmental expression of the VIP-gene in brain and intestine. *Brain Res.* 1987, 388, 137.
 163. Greenlee M.H.W., Swanson J.J., Simon J.J., Elmquist J.K., Jacobson C.D., Sakaguchi D.S.: Postnatal development and the differential expression of presynaptic terminal-associated proteins in the developing retina of the Brazilian opossum, *Monodelphis domestica*. *Dev Brain Res.* 1996, 96, 159.
 164. Gressens P.: VIP neuroprotection against excitotoxic lesions of the developing mouse brain. *Ann N Y Acad Sci.* 1999, 897, 109.
 165. Gressens P., Hill J.M., Paindaveine B., Gozes I., Fridkin M., Brenneman D.E.: Severe microcephaly induced by blockade of vasoactive intestinal

- peptide function in the primitive neuroepithelium of the mouse. *J Clin Invest.* 1994, 94, 2020.
166. Gressens P., Paindaveine B., Hill J.M., Brenneman D.E., Evrard P.: Growth factor properties of VIP during early brain development. Whole embryo culture and in vivo studies. *Ann N Y Acad Sci.* 1997, 814, 152.
 167. Gressens P., Paindaveine B., Hill J.M., Evrard P., Brenneman D.E.: Vasoactive intestinal peptide shortens both G1 and S phases of neural cell cycle in whole postimplantation cultured mouse embryos. *Eur J Neurosci.* 1998, 10, 1734.
 168. Grimaldi M., Cavallaro S.: Functional and molecular diversity of PACAP/VIP receptors in cortical neurons and type I astrocytes. *Eur J Neurosci.* 1999, 11, 2767.
 169. Grosse G., Grosse J., Tapp R., Kuchinke J., Gorsleben M., Fetter I., Höhne-Zell B., Gratzl M., Bergmann M.: SNAP-25 requirement for dendritic growth of hippocampal neurons. *J Neurosci Res.* 1999, 56, 539.
 170. Grundemar L., Hakanson R.: Multiple neuropeptide Y receptors are involved in cardiovascular regulation. Peripheral and central mechanisms. *Gen Pharmacol.* 1993, 24, 785.
 171. Guirado S., Real M.A., Olmos J.L., Davila J.C.: Distinct types of nitric oxide-producing neurons in the developing and adult mouse claustrum. *J Comp Neurol.* 2003, 465, 431.
 172. Guldin W.O., Markowitsh H.J., Lampe R., Irlle E.: Cortical projections originating from the cat's insular area and remarks on claustricortical connections. *J Comp Neurol.* 1986, 243, 468.
 173. Haase A., Bicker G.: Nitric oxide and cyclic nucleotides are regulators of neuronal migration in an insect embryo. *Development.* 2003, 130, 3977.
 174. Hack N.J., Wride M.C., Charters K.M., Kater S.B., Parks T.N.: Developmental changes in the subcellular localization of calretinin. *J Neurosci.* 2000, 20, RC67.
 175. 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.* 1998, 18, 1072.
 176. Hallbeck M., Larhammar D., Blomqvist A.: Neuropeptide expression in rat paraventricular hypothalamic neurons that project to the spinal cord. *J Comp Neurol.* 2001, 433, 222.

177. Hartmann D., Fehr S., Meyerhof W., Richter D.: Distribution of somatostatin receptor subtype 1 mRNA in the developing cerebral hemispheres of the rat. *Dev Neurosci.* 1995, 17, 246.
178. Hathway G.J., Emson P.C., Humphrey P.P., Kendrick K.M.: Somatostatin potently stimulates in vivo striatal dopamine and gamma-aminobutyric acid release by a glutamate-dependent action. *J Neurochem.* 1998, 70, 1740.
179. Heidelberger R., Matthews G.: Vesicle priming and depriming: a SNAP decision. *Neuron.* 2004, 41, 311.
180. Heistad D.D., Marcus M.L., Said S.I., Gross P.M.: Effect of acetylcholine and vasoactive intestinal peptide on cerebral blood flow. *Am J Physiol.* 1980, 239, H73-H80.
181. Heizmann C.W., Braun K.: Changes in Ca(2+)-binding proteins in human neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci.* 1992, 15, 259.
182. 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.* 1991, 307, 626.
183. Hendry S.H., Jones E.G., DeFelipe J., Schmechel D., Brandon C., Emson P.C.: Neuropeptide-containing neurons of the cerebral cortex are also GABAergic. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984, 81, 6526.
184. Hendry S.H., Jones E.G., Emson P.C.: Morphology, distribution, and synaptic relations of somatostatin- and neuropeptide Y-immunoreactive neurons in rat and monkey neocortex. *J Neurosci.* 1984, 4, 2497.
185. Hendry S.H.C., Jones E.G.: GABA neuronal subpopulations in cat primary auditory cortex: Co-localization with calcium binding proteins immunoreactivity. *Brain Res.* 1991, 543, 45.
186. Herzog H.: Neuropeptide Y and energy homeostasis: insights from Y receptor knockout models. *Eur J Pharmacol.* 2003, 480, 21.
187. Herzog H., Hort Y.J., Ball H.J., Hayes G., Shine J., Selbie L.A.: Cloned human neuropeptide Y receptor couples to two different second messenger systems. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992, 89, 5794.
188. Higashi S., Molnar Z., Kurotani T., Toyama K.: Prenatal development of neural excitation in rat thalamocortical projections studied by optical recording. *Neuroscience.* 2002, 115, 1231.
189. Hilbig H., Franke H., Bidmon H.J., Illes P.: Nitric oxide synthase isoenzymes during in vitro development of rat neuronal and human non-neuronal cells. *Neurosci Lett.* 2001, 297, 9.

190. Hill J.M., Glazner G.W., Lee S.J., Gozes I., Gressens P., Brenneman D.E.: Vasoactive intestinal peptide regulates embryonic growth through the action of activity-dependent neurotrophic factor. *Ann N Y Acad Sci.* 1999, 897, 92.
191. Hindley S., Juurlink B.H., Gysbers J.W., Middlemiss P.J., Herman M.A., Rathbone M.P.: Nitric oxide donors enhance neurotrophin-induced neurite outgrowth through a cGMP-dependent mechanism. *J Neurosci Res.* 1997, 47, 427.
192. Hinova-Palova D.V.: Identification of degenerated boutons in claustrum dorsale after lesions of visual cortex. *C R Acad Bulg Sci.* 1981, 34, 449.
193. Hinova-Palova D.V., Paloff A., Christova T., Ovtscharoff W.: Topographical distribution of NADPH-diaphorase-positive neurons in the cat's claustrum. *Eur J Morphol.* 1997, 35, 105.
194. 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.* 1988, 29, 255.
195. Hof P.R., Glezer I.I., Condé F., Flagg R.A., Rubin M.B., Nimchinsky E.A., Weisenborn 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.* 1999, 16, 77.
196. Hofmann F., Dostmann W., Keilbach A., Landgraf W., Ruth P.: Structure and physiological role of cGMP-dependent protein kinase. *Biochim Biophys Acta.* 1992, 1135, 51.
197. Hogan D., Berman N.E.: The development of neuropeptide Y immunoreactive neurons in cat visual cortical areas. *Brain Res Dev Brain Res.* 1992, 67, 343.
198. Hogan D., Berman N.E.: The development of somatostatin immunoreactive neurons in cat visual cortical areas. *Brain Res Dev Brain Res.* 1993, 71, 221.
199. Hogan D., Terwilleger E.R., Berman N.E.: Development of subpopulations of GABAergic neurons in cat visual cortical areas. *Neuroreport.* 1992, 3, 1069.
200. Hohl-Abrahamo J.C., Creutzfeldt O.D.: Topographical mapping of the thalamocortical projections in rodents and comparison with that in primates. *Exp Brain Res.* 1991, 87, 283.

201. Hornung J.P., De T.N., Tork I.: Morphology and distribution of neuropeptide-containing neurons in human cerebral cortex. *Neuroscience*. 1992, 51, 363.
202. Huang Z.J., Kirkwood A., Pizzorusso T., Porciatti V., Morales B., Bear M.F., Maffei L., Tonegawa S.: BDNF regulates the maturation of inhibition and the critical period of plasticity in mouse visual cortex. *Cell*. 1999, 98, 739.
203. Hubener M., Gotz M., Klostermann S., Bolz J.: Guidance of thalamocortical axons by growth-promoting molecules in developing rat cerebral cortex. *Eur J Neurosci*. 1995, 7, 1963.
204. Huntley G.W., Benson D.L.: Neural (N)-cadherin at developing thalamocortical synapses provides an adhesion mechanism for the formation of somatopically organized connections. *J Comp Neurol*. 1999, 407, 453.
205. Hunziker W., Schrickel S.: Rat brain calbindin D28: six domain structure and extensive amino acid homology with chicken calbindin D28. *Mol Endocrinol*. 1988, 2, 465.
206. Husum H., Mikkelsen J.D., Mork A.: Extracellular levels of neuropeptide Y are markedly increased in the dorsal hippocampus of freely moving rats during kainic acid-induced seizures. *Brain Res*. 1998, 781, 351.
207. Ichihara K., Eng J., Yalow R.S.: Ontogeny of immunoreactive CCK, VIP and secretin in rat brain and gut. *Biochem Biophys Res Commun*. 1983, 112, 891.
208. Irle E., Markowitsch H.J., Streicher M.: Cortical and subcortical, including sensory-related, afferents to the thalamic mediodorsal nucleus of the cat. *J Hirnforsch*. 1984, 25, 29.
209. Jakubowska-Sadowska K., Moryś J., Sadowski M., Kowiański P., Karwacki Z., Narkiewicz O.: Visual zone of the claustrum shows localizational and organizational differences among rat, guinea pig, rabbit and cat. *Anat Embryol (Berl)*. 1998, 198, 63.
210. Jayaraman A., Updyke B.V.: Organization of visual cortical projections to the claustrum in the cat. *Brain Res*. 1979, 178, 107.
211. Jolkkonen J., Kahkonen K., Pitkanen A.: Cholinergic deafferentation exacerbates seizure-induced loss of somatostatin-immunoreactive neurons in the rat hippocampus. *Neuroscience*. 1997, 80, 401.
212. Joo K.M., Chung Y.H., Kim M.K., Nam R.H., Lee B.L., Lee K.H., Cha C.I.: Distribution of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors (VPAC1, VPAC2, and PAC1 receptor) in the rat brain. *J Comp Neurol*. 2004, 476, 388.

213. Juraniec J., Narkiewicz O.: Synaptic structure of the claustrum in the cat. *Folia Histochem Cytochem.* 1971, 12, 408.
214. Juraniec J., Narkiewicz O., Wrzołkowa T.: Changes in axon terminals of the claustrum following cortical lesions--electron microscopic investigations. *Neuropat Pol.* 1974, 12, 1.
215. Juraniec J., Narkiewicz O., Wrzołkowa T.: Axon terminals in the claustrum of the cat: an electron microscope study. *Brain Res.* 1971, 35, 277.
216. Juraniec J., Wrzołkowa T., Narkiewicz O.: Types of synapses in the claustrum of the cat. *Acta Neurobiol Exp.* 1974, 34, 233.
217. Jurgens U.: The efferent and afferent connections of the supplementary motor area. *Brain Res.* 1984, 300, 63.
218. Karacay B., O'Dorisio M.S., Summers M., Bruce J.: Regulation of vasoactive intestinal peptide receptor expression in developing nervous systems. *Ann N Y Acad Sci.* 2000, 921, 165.
219. Katchanov J., Waeber C., Gertz K., Gietz A., Winter B., Bruck W., Dirnagl U., Veh R.W., Endres M.: Selective neuronal vulnerability following mild focal brain ischemia in the mouse. *Brain Pathol.* 2003, 13, 452.
220. Kawaguchi Y.: Groupings of nonpyramidal and pyramidal cells with specific physiological and morphological characteristics in rat frontal cortex. *J Neurophysiol.* 1993, 69, 416.
221. Kawaguchi Y., Kubota Y.: Physiological and morphological identification of somatostatin- or vasoactive intestinal polypeptide-containing cells among GABAergic cell subtypes in rat frontal cortex. *J Neurosci.* 1996, 16, 2701.
222. Kawaguchi Y., Kubota Y.: GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cereb Cortex.* 1997, 7, 476.
223. Kawaguchi Y., Kubota Y.: Neurochemical features and synaptic connections of large physiologically-identified GABAergic cells in the rat frontal cortex. *Neuroscience.* 1998, 85, 677.
224. Kawaguchi Y., Kubota Y.: Correlation of physiological subgroupings of nonpyramidal cells with parvalbumin- and calbindin(D28k)-immunoreactive neurons in layer V of rat frontal cortex. *J Neurophysiol.* 1993, 70, 387.
225. Keilhoff G., Seidel B., Noack H., Tischmeyer W., Stanek D., Wolf G.: Patterns of nitric oxide synthase at the messenger RNA and protein levels during early rat brain development. *Neuroscience.* 1996, 75, 1193.

226. Kempainen S., Pitkänen A.: Distribution of parvalbumin, calretinin, and calbindin-D28k immunoreactivity in the rat amygdaloid complex and colocalization with gamma-aminobutyric acid. *J Comp Neurol.* 2000, 426, 441.
227. Kennedy H., Salin P., Bullier J., Horsburgh G.: Topography of developing thalamic and cortical pathways in the visual system of the cat. *J Comp Neurol.* 1994, 348, 298.
228. Klapstein G.J., Colmers W.F.: Neuropeptide Y suppresses epileptiform activity in rat hippocampus in vitro. *J Neurophysiol.* 1997, 78, 1651.
229. Klapstein G.J., Vietla S., Lieberman D.N., Gray P.A., Airaksinen M.S., Thoenen H., Meyer M., Mody I.: Calbindin-D28k fails to protect hippocampal neurons against ischemia in spite of its cytoplasmic calcium buffering properties: evidence from calbindin-D28k knockout mice. *Neuroscience.* 1998, 85, 361.
230. Knowles R.G., Palacios M., Palmer R.M., Moncada S.: Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989, 86, 5159.
231. Koticha D.K., McCarthy E.E., Baldini G.: Plasma membrane targeting of SNAP-25 increases its local concentration and is necessary for SNARE complex formation and regulated exocytosis. *J Cell Sci.* 2002, 115, 3341.
232. Kowall N.W., Beal M.F.: Cortical somatostatin, neuropeptide Y, and NADPH diaphorase neurons: Normal anatomy and alterations in Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 1988, 23, 105.
233. Kowiański P., Dziewiątkowski J., Berdel B., Lipowska M., Moryś J.: The corticoclaustral connections in the rat studied by means of fluorescent retrograde axonal transport method. *Folia Morphol (Warsz).* 1998, 57, 85.
234. Kowiański P., Dziewiątkowski J., Karwacki Z., Moryś J.: The different patterns of maturation of the claustricortical connections in a rabbit. *Folia Morphol.* 2000, 59, 193.
235. Kowiański P., Dziewiątkowski J., Kowiańska J., Moryś J.: Comparative anatomy of the claustrum in selected species: A morphometric analysis. *Brain Behav Evol.* 1999, 53, 44.
236. 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).* 1996, 55, 350.

237. Kowiański P., Moryś J., Karwacki Z., Dziewiątkowski J., Narkiewicz O.: The cortico-related zones of the rabbit claustrum - study of the claustricortical connections based on the retrograde axonal transport of fluorescent tracers. *Brain Res.* 1998, 784, 199.
238. Kowiański P., Moryś J., Sadowski M., Dziewiątkowski J.: Qualitative and quantitative differences in the motor and somatosensory cortical projections of the rat claustrum - combined retrograde transport and stereologic studies. *Folia Morphol.* 2000, 59, 111.
239. Kowiański P., Moryś J.M., Wójcik S., Dziewiątkowski J., Łuczynska 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.* 2004, 996, 97.
240. Kowiański P., Moryś J.M., Wójcik S., Dziewiątkowski J., Moryś J.: Colocalization of NOS with calcium binding proteins during postnatal development of the rat claustrum. *Folia Morphol.* 2003, 62, 11.
241. Kowiański P., Moryś J.M., Wójcik S., Dziewiątkowski J., Moryś J.: Postnatal development of NOS-ir neurons in the rat claustrum. *Folia Morphol (Warsz.)* 2003, 62, 11.
242. 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.* 2001, 905, 63.
243. Krettek J., Price J.L.: Projections from the amygdaloid complex to the cerebral cortex and thalamus in the rat and cat. *J Comp Neurol.* 1977, 172, 682.
244. Kubasik-Juraniec J., Dziewiątkowski J., Moryś J., Narkiewicz O.: Ultrastructural organization of the visual zone in the claustrum of the cat. *Folia Morphol (Warsz.)* 1998, 57, 287.
245. Kubasik-Juraniec J., Narkiewicz O., Moryś J.: Relationship of cortico-claustral axon terminals to neurons of the claustrum in the cat. *Folia Morphol (Warsz.)* 1994, 53, 69.
246. Kubota Y., Hattori R., Yui Y.: Three distinct subpopulations of GABAergic neurons in rat frontal agranular cortex. *Brain Res.* 1994, 649, 159.
247. Kubota Y., Kawaguchi Y.: Spatial distributions of chemically identified intrinsic neurons in relation to patch and matrix compartments of rat neostriatum. *J Comp Neurol.* 1993, 332, 499.

248. Kubota Y., Kawaguchi Y.: Three classes of GABAergic interneurons in neocortex and neostriatum. *Jpn J Physiol.* 1994, 44 Suppl 2, S145-S148.
249. Kubota Y., Kawaguchi Y.: Two distinct subgroups of cholecystokinin-immunoreactive cortical interneurons. *Brain Res.* 1997, 752, 175.
250. Kudo T., Wada J.A.: Effect of unilateral claustral lesion on intermittent light stimulation-induced convulsive response in D,L-allylglycine treated cats. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1995, 95, 63.
251. Künzle H., Radtke-Schuller S.: Cortical connections of the claustrum and subjacent cell groups in the hedgehog tenrec. *Anat Embryol.* 2001, 203, 403.
252. Kweon D.H., Kim C.S., Shin Y.K.: Regulation of neuronal SNARE assembly by the membrane. *Nat Struct Biol.* 2003, 10, 440.
253. Laburthe M., Couvineau A., Marie J.C.: VPAC receptors for VIP and PACAP. *Receptors Channels.* 2002, 8, 137.
254. Lamas S., Marsden P.A., Li G.K., Tempst P., Michel T.: Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992, 89, 6348.
255. Landau E.: The comparative anatomy of the nucleus amygdalae, the claustrum and insular cortex. *J Anat.* 1919, 53, 351.
256. Landgraf R., Neumann I.D.: Vasopressin and oxytocin release within the brain: a dynamic concept of multiple and variable modes of neuropeptide communication. *Front Neuroendocrinol.* 2004, 25, 150.
257. Larhammar D., Soderberg C., Lundell I.: Evolution of the neuropeptide Y family and its receptors. *Ann N Y Acad Sci.* 1998, 839, 35.
258. Larhammar D., Wraith A., Berglund M.M., Holmberg S.K.S., Lundell I.: Origins of the many NPY-family receptors in mammals. *Peptides.* 2001, 22, 295.
259. Lau W.K., Lui P.W., Wong C.K., Chan Y.S., Yung K.K.: Differential expression of N-methyl-D-aspartate receptor subunit messenger ribonucleic acids and immunoreactivity in the rat neostriatum during postnatal development. *Neurochem Int.* 2003, 43, 47.
260. Lee E.W., Grant D.S., Movafagh S., Zukowska Z.: Impaired angiogenesis in neuropeptide Y (NPY)-Y2 receptor knockout mice. *Peptides.* 2003, 24, 99.
261. Lee E.Y., Lee T.S., Baik S.H., Cha C.I.K.: Postnatal development of somatostatin- and neuropeptide Y-immunoreactive neurons in rat cerebral cor-

- tex: A double-labeling immunohistochemical study. *Int J Dev Neurosci.* 1998, 16, 63.
262. Leibowitz S.F.: Brain neuropeptide Y: an integrator of endocrine, metabolic and behavioral processes. *Brain Res Bull.* 1991, 27, 333.
263. Leibowitz S.F.: Brain peptides and obesity: pharmacologic treatment. *Obes Res.* 1995, 3 Suppl 4, 573S.
264. Leibowitz S.F.: Hypothalamic neuropeptide Y in relation to energy balance. *Ann N Y Acad Sci.* 1990, 611, 284.
265. Leroux P., Bodenant C., Bologna E., Gonzalez B., Vaudry H.: Transient expression of somatostatin receptors in the brain during development. *Ciba Found Symp.* 1995, 190, 127.
266. Letinic K., Kostovic I.: Postnatal development of calcium-binding proteins calbindin and parvalbumin in human visual cortex. *Cereb Cortex.* 1998, 8, 660.
267. LeVay S., Sherk H.: The visual claustrum of the cat. I. Structure and connections. *J Neurosci.* 1981, 1, 956.
268. LeVay S., Sherk H.: The visual claustrum of the cat. II. The visual field map. *J Neurosci.* 1981, 1, 981.
269. Liapakis G., Tallent M., Reisine T.: Molecular and functional properties of somatostatin receptor subtypes. *Metabolism.* 1996, 45, 12.
270. Lipton S.A., Choi Y.B., Pan Z.H., Lei S.Z., Chen H.S., Sucher N.J., Loscalzo J., Singel D.J., Stamler J.S.: A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature.* 1993, 364, 626.
271. Lipton S.A., Singel D.J., Stamler J.S.: Nitric oxide in the central nervous system. *Prog Brain Res.* 1994, 103, 359.
272. Lowe W.L., Jr., Schaffner A.E., Roberts C.T., Jr., LeRoith D.: Developmental regulation of somatostatin gene expression in the brain is region specific. *Mol Endocrinol.* 1987, 1, 181.
273. Łuczynska A., Dziwiątkowski J., Jagalska-Majewska H., Kowiański P., Spodnik J., Moryś J.: Postnatal development of the somatosensory thalamocortical projection in rat and rabbit - a combined retrograde transport and stereological comparative study. *Folia Morphol.* 2003, 62, 129.
274. Lumsden A., Gulisano M.: Neocortical neurons: where do they come from? *Science.* 1997, 278, 402.

275. Lundell I., Berglund M.M., Larhammar D.: Y4 receptor in different species. Functional expression and binding. *Methods Mol Biol.* 2000, 153, 45.
276. Lundell I., Eriksson H., Marklund U., Larhammar D.: Cloning and characterization of the guinea pig neuropeptide Y receptor Y5. *Peptides.* 2001, 22, 357.
277. Macchi G., Bentivoglio M., Minciacchi D., Molinari M.: Claustroneocortical projections studied in the cat by means of multiple retrograde fluorescent tracing. *J Comp Neurol.* 1983, 215, 121.
278. Maciejewska B., Berdel B., Dziewiątkowski J., Moryś J.: The developmental changes of the "paraclaustral reservoir" of migrating cells in the rat brain: A study using morphometric and in situ DNA end labeling techniques. *Brain Res Bull.* 1999, 48, 615.
279. Maciejewska B., Moryś J., Berdel B., Dziewiątkowski J., Narkiewicz O.: The development of the rat claustrum - a study using morphometric and in situ DNA end labelling techniques. *Eur J Anat.* 1997, 1, 137.
280. Magistretti P.J.: VIP neurons in the cerebral cortex. *Trends Pharmacol Sci.* 1990, 11, 250.
281. Magistretti P.J.: Regulation of glycogenolysis by neurotransmitters in the central nervous system. *Diabete Metab.* 1988, 14, 237.
282. Magistretti P.J., Cardinaux J.R., Martin J.L.: VIP and PACAP in the CNS: regulators of glial energy metabolism and modulators of glutamatergic signaling. *Ann N Y Acad Sci.* 1998, 865, 213.
283. Magistretti P.J., Morrison J.H., Shoemaker W.J., Sapin V., Bloom F.E.: Vasoactive intestinal polypeptide induces glycogenolysis in mouse cortical slices: a possible regulatory mechanism for the local control of energy metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981, 78, 6535.
284. Majak K., Kowiański P., Dziewiątkowski J., Karwacki Z., Łuczynska A., Moryś J.: Claustroringulate connections in the rabbit and rat - the stereological study. *Folia Morphol.* 2000, 59, 47.
285. Majak K., Kowiański P., Moryś J., Spodnik J., Karwacki Z., Wiśniewski H.M.: The limbic zone of the rabbit and rat claustrum: A study of the claustroringulate connections based on the retrograde axonal transport of fluorescent tracers. *Anat Embryol (Berl).* 2000, 201, 15.
286. Majak K., Pikkarainen M., Kemppainen S., Jolkkonen E., Pitkänen A.: Projections from the amygdaloid complex to the claustrum and the endopiriform nucleus: A Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study in the rat. *J Comp Neurol.* 2002, 451, 236.

287. Mamos L.: Morphology of claustral neurons in the rat. *Folia Morphol (Warsz)*. 1984, 43, 73.
288. Mamos L., Narkiewicz O., Moryś J.: Neurons of the claustrum in the cat; a Golgi study. *Acta Neurobiol Exp*. 1986, 46, 171.
289. Man-Son-Hing H., Zoran M.J., Lukowiak K., Haydon P.G.: A neuromodulator of synaptic transmission acts on the secretory apparatus as well as on ion channels. *Nature*. 1989, 341, 237.
290. Markowitsch H.J., Irle E., Bang-Olsen R., Flindt-Egebak P.: Claustral efferent to the cat's limbic cortex studied with retrograde and anterograde tracing techniques. *Neuroscience*. 1984, 12, 409.
291. Marletta M.A.: Nitric oxide: biosynthesis and biological significance. *Trends Biochem Sci*. 1989, 14, 488.
292. Marletta M.A.: Nitric oxide synthase: function and mechanism. *Adv Exp Med Biol*. 1993, 338, 281.
293. Marletta M.A.: Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell*. 1994, 78, 927.
294. Mascagni F., McDonald A.J.: Immunohistochemical characterization of cholecystokinin containing neurons in the rat basolateral amygdala. *Brain Res*. 2003, 976, 171.
295. Matsutani S., Senba E., Tohyama M.: Neuropeptide- and neurotransmitter-related immunoreactivities in the developing rat olfactory bulb. *J Comp Neurol*. 1988, 272, 331.
296. Mattson M.P., Rychlik B., Chu C., Christakos S.: Evidence for calcium-reducing and excitoprotective roles for the calcium-binding protein calbindin-D28k in cultured hippocampal neurons. *Neuron*. 1991, 6, 41.
297. Mayanil C.S., Knepper P.A.: Synaptic vesicle and synaptic membrane glycoproteins during pre- and postnatal development of mouse cerebral cortex, cerebellum and spinal cord. *Dev Neurosci*. 1993, 15, 133.
298. McCullough L.A., Egan T.M., Westfall T.C.: Neuropeptide Y receptors involved in calcium channel regulation in PC12 cells. *Regul Pept*. 1998, 75-76, 101.
299. McDonald A.J.: Coexistence of somatostatin with neuropeptide Y, but not with cholecystokinin or vasoactive intestinal peptide, in neurons of the rat amygdala. *Brain Res*. 1989, 500, 37.
300. McDonald A.J.: Morphology of peptide-containing neurons in the rat basolateral amygdaloid nucleus. *Brain Res*. 1985, 338, 186.

301. McDonald A.J., Mascagni F., Augustine J.R.: Neuropeptide Y and somatostatin-like immunoreactivity in neurons of the monkey amygdala. *Neuroscience*. 1995, 66, 959.
302. McDonald A.J., Pearson J.C.: Coexistence of GABA and peptide immunoreactivity in non-pyramidal neurons of the basolateral amygdala. *Neurosci Lett*. 1989, 100, 53.
303. Mehra R.D., Hendrickson A.E.: A comparison of the development of neuropeptide and MAP2 immunocytochemical labeling in the macaque visual cortex during pre- and postnatal development. *J Neurobiol*. 1993, 24, 101.
304. Metin C., Deleglise D., Serafini T., Kennedy T.E., Tessier-Lavigne M.: A role for netrin-1 in the guidance of cortical efferents. *Development*. 1997, 124, 5063.
305. Meynert Th.: Neue Untersuchungen über den Bau der Grobhirnrinde und ihre örtlichen Verschiedenheiten. *Allg Wien Med Zeitung*. 1868, 13, 419.
306. Michel M.C., Rascher W.: Neuropeptide Y: a possible role in hypertension? *J Hypertens*. 1995, 13, 385.
307. Miller B., Blake N.M.J., Erinjeri J.P., Reistad C.E., Sexton T., Admire P., Woolsey T.A.: Postnatal growth of intrinsic connections in mouse barrel cortex. *J Comp Neurol*. 2001, 436, 17.
308. Miller B., Chou L., Finlay B.L.: The early development of thalamocortical and corticothalamic projections. *J Comp Neurol*. 1993, 335, 16.
309. Milosevic A., Zecevic N.: Developmental changes in human cerebellum: expression of intracellular calcium receptors, calcium-binding proteins, and phosphorylated and nonphosphorylated neurofilament protein. *J Comp Neurol*. 1998, 396, 442.
310. Minciacchi D., Granato A., Barbaresi P.: Organization of claustror-cortical projections to the primary somatosensory area of primates. *Brain Res*. 1991, 553, 309.
311. Minciacchi D., Molinari M., Bentivoglio M.: The bilateral claustror-cortical system as studied in rat with fluorescent retrograde tracers. In: 1982, p 236.
312. Minciacchi D., Molinari M., Bentivoglio M., Macchi G.: The organization of the ipsi- and contralateral claustror-cortical system in rat with notes on the bilateral claustror-cortical projections in cat. *Neuroscience*. 1985, 16, 557.
313. Mize R.R., Banfro F.T., Scheiner C.A.: Pre- and postnatal expression of amino acid neurotransmitters, calcium binding proteins, and nitric oxide

- synthase in the developing superior colliculus. *Prog Brain Res.* 1996, 108, 313.
314. Mohapel P., Hannesson D.K., Armitage L.L., Gillespie G.W., Corcoran M.E.: Claustral lesions delay amygdaloid kindling in the rat. *Epilepsia.* 2000, 41, 1095.
315. 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.* 2001, 13, 1501.
316. Molnar Z., Adams R., Blakemore C.: Mechanisms underlying the early establishment of thalamocortical connections in the rat. *J Neurosci.* 1998, 18, 5723.
317. Molnar Z., Blakemore C.: Development of signals influencing the growth and termination of thalamocortical axons in organotypic culture. *Exp Neurol.* 1999, 156, 363.
318. Molnar Z., Blakemore C.: Guidance of thalamocortical innervation. *Ciba Found Symp.* 1995, 193, 127.
319. Molnar Z., Blakemore C.: How do thalamic axons find their way to the cortex? *Trends Neurosci.* 1995, 18, 389.
320. Molnar Z., Knott G.W., Blakemore C., Saunders N.R.: Development of thalamocortical projections in the South American gray short-tailed opossum (*Monodelphis domestica*). *J Comp Neurol.* 1998, 398, 491.
321. Molnar Z., Kurotani T., Higashi S., Yamamoto N., Toyama K.: Development of functional thalamocortical synapses studied with current source-density analysis in whole forebrain slices in the rat. *Brain Res Bull.* 2003, 60, 355.
322. Molnar Z., Lopez-Bendito G., Small J., Partridge L.D., Blakemore C., Wilson M.C.: Normal development of embryonic thalamocortical connectivity in the absence of evoked synaptic activity. *J Neurosci.* 2002, 22, 10313.
323. Moody T.W., Hill J.M., Jensen R.T.: VIP as a trophic factor in the CNS and cancer cells. *Peptides.* 2003, 24, 163.
324. Moon J.S., Kim J.J., Chang I.Y., Chung Y.Y., Jun J.Y., You H.J., Yoon S.P.: Postnatal development of parvalbumin and calbindin D-28k immunoreactivities in the canine anterior cingulate cortex: transient expression in layer V pyramidal cells. *Int J Dev Neurosci.* 2002, 20, 511.

325. Moryś J., Berdel B., Maciejewska B., Sadowski M., Sidorowicz M., Kowiańska J., Narkiewicz O.: Division of the human claustrum according to its architectonics and morphometric parameters. *Folia Morphol (Warsz)*. 1996, 55, 69.
326. Moryś J., Bobiński M., Maciejewska B., Berdel B., Kozłowski P.B., Dąbska M., Wiśniewski H.M., Narkiewicz O.: The insular claustrum in the methylazoxymethanol acetate (MAM) treated rats shows two different populations of neurons. *Folia Neuropathol*. 1994, 32, 107.
327. Moryś J., Bobiński M., Węgiel J., Wiśniewski H.M.: Pathology of the claustrum-cortical loop in Alzheimer disease. In: 1992, p 139.
328. Moryś J., Narkiewicz O., Wiśniewski H.M.: Neuronal loss in the human claustrum following ulegyria. *Brain Res*. 1993, 616, 176.
329. Moryś J., Słoniewski P.: Projections of the claustrum to some areas of the neocortex in the rat-an HRP study. *Folia Morphol (Warsz)*. 1986, 45, 175.
330. Moryś J., Słoniewski P., Narkiewicz O.: The posterior part of the thalamus and anterior pretectum have two systems of connections with insula and claustrum in the rat. *Folia Morphol (Warsz)*. 1987, 46, 67.
331. Moryś J., Słoniewski P., Narkiewicz O., Pilgrim Ch.: Origin and terminals of the pretecto-thalamoclaustal connections in the cat. *Folia Morphol (Warsz)*. 1987, 46, 129.
332. Murphy S., Simmons M.L., Agullo L., Garcia A., Feinstein D.L., Galea E., Reis D.J., Minc-Golomb D., Schwartz J.P.: Synthesis of nitric oxide in CNS glial cells. *Trends Neurosci*. 1993, 16, 323.
333. Nacher J., Ramirez C., Molowny A., Lopez-Garcia C.: Ontogeny of somatostatin immunoreactive neurons in the medial cerebral cortex and other cortical areas of the lizard *Podarcis hispanica*. *J Comp Neurol*. 1996, 374, 118.
334. Narkiewicz O.: Degenerations in the claustrum after regional neocortical ablations in the cat. *J Comp Neurol*. 1964, 123, 335.
335. Narkiewicz O.: Connections of the claustrum with the cerebral cortex. *Folia Morphol (Warsz)*. 1966, 25, 517.
336. Narkiewicz O., Mamos L.: Relation of the insular claustrum to the neocortex in Insectivora. *J Hirnforsch*. 1990, 31, 623.
337. Narkiewicz O., Mamos L.: The prepiriform claustrum and its connections. *Verh Anat Ges*. 1987, 81, 897.

338. Narkiewicz O., Nitecka L., Mamos L.: Neurons with GABA-like immunoreactivity in the claustrum and adjacent cortex of the rat. *Verh Anat Ges.* 1989, 82, 209.
339. Narkiewicz O., Nitecka L., Mamos L., Moryś J.: The pattern of the GABA-like immunoreactivity in the claustrum. *Folia Morphol (Warsz).* 1988, 47, 21.
340. Narkiewicz O., Słoniewski P., Moryś J.: Pretectal projections to the claustrum in the cat. *Verh Anat Ges.* 1983, 77, 685.
341. Naus C.C.: Developmental appearance of somatostatin in the rat cerebellum: in situ hybridization and immunohistochemistry. *Brain Res Bull.* 1990, 24, 583.
342. Naus C.C., Miller F.D., Morrison J.H., Bloom F.E.: Immunohistochemical and in situ hybridization analysis of the development of the rat somatostatin-containing neocortical neuronal system. *J Comp Neurol.* 1988, 269, 448.
343. Naus C.C., Morrison J.H., Bloom F.E.: Development of somatostatin-containing neurons and fibers in the rat hippocampus. *Brain Res.* 1988, 468, 113.
344. Neal J.W., Pearson R.C., Powell T.P.: The relationship between the auditory cortex and the claustrum in the cat. *Brain Res.* 1986, 366, 145.
345. Nelson R.J., Demas G.E., Huang P.L., Fishman M.C., Dawson V.L., Dawson T.M., Snyder S.H.: Behavioural abnormalities in male mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Nature.* 1995, 378, 383.
346. Nitsch R., Bergmann I., Kuppers K., Mueller G., Frotscher M.: Late appearance of parvalbumin-immunoreactivity in the development of GABAergic neurons in the rat hippocampus. *Neurosci Lett.* 1990, 118, 147.
347. Nobou F., Besson J., Rostene W., Rosselin G.: Ontogeny of vasoactive intestinal peptide and somatostatin in different structures of the rat brain: effects of hypo- and hypercorticism. *Brain Res.* 1985, 352, 296.
348. Norita M.: Demonstration of bilateral claustrum-cortical connections in the cat with the method of retrograde axonal transport of horseradish peroxidase. *Arch Histol Jpn.* 1977, 40, 1.
349. Norita M.: Claustral neurons projecting to the visual cortical areas in the cat: A retrograde double labeling study. *Neurosci Lett.* 1983, 36, 33.
350. Norita M., Hirata Y.: Some electron microscope findings of the claustrum of the cat. *Arch Histol Jpn.* 1976, 39, 33.

351. Nussdorfer G.G., Malendowicz L.K.: Role of VIP, PACAP, and related peptides in the regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Peptides*. 1998, 19, 1443.
352. Obrietan K., Van Den Pol A.N.: Neuropeptide Y depresses GABA-mediated calcium transients in developing suprachiasmatic nucleus neurons: a novel form of calcium long-term depression. *J Neurosci*. 1996, 16, 3521.
353. Obst K., Wahle P.: Areal differences of NPY mRNA-expressing neurons are established in the late postnatal rat visual cortex in vivo, but not in organotypic cultures. *Eur J Neurosci*. 1995, 7, 2139.
354. Ogilvie P., Schilling K., Billingsley M.L., Schmidt H.H.: Induction and variants of neuronal nitric oxide synthase type I during synaptogenesis. *FASEB J*. 1995, 9, 799.
355. Okoyama S., Kudo M.: Development of the tecto-thalamic projection neurons and the differential expressions of calcium-binding proteins in the rat. *Int J Dev Neurosci*. 1997, 15, 813.
356. Olson C.R., Graybiel A.M.: Sensory maps in the claustrum of the cat. *Nature*. 1980, 288, 479.
357. Oppenheim R.W.: Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci*. 1991, 14, 453.
358. Otellin V.A.: Connections of the auditory cortex (zone Ep) with the claustrum. *Dokl Akad Nauk SSSR*. 1969, 187, 1198.
359. Otellin V.A.: Connection of the auditory and vestibular cortex of the cat with the claustrum (light-optic and electron microscopic study). *Arch Anat Histol Embryol*. 1971, 61, 81.
360. Otto H., Hanson P.I., Jahn R.: Assembly and disassembly of a ternary complex of synaptobrevin, syntaxin, and SNAP-25 in the membrane of synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997, 94, 6197.
361. Oyler G.A., Polli J.W., Wilson M.C., Billingsley M.L.: Developmental expression of the 25-kDa synaptosomal-associated protein (SNAP-25) in rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991, 88, 5247.
362. Palczewska M., Groves P., Ambrus A., Kaleta A., Kover K.E., Batta G., Kuznicki J.: Structural and biochemical characterization of neuronal calretinin domain I-II (residues 1-100). Comparison to homologous calbindin D28k domain I-II (residues 1-93). *Eur J Biochem*. 2001, 268, 6229.
363. Palkovits M.: Neuropeptide messenger plasticity in the CNS neurons following axotomy. *Mol Neurobiol*. 1995, 10, 91.

364. Papadopoulos G.C., Cavanagh M.E., Antonopoulos J., Michaloudi H., Parnavelas J.G.: Postnatal development of somatostatin-containing neurons in the visual cortex of normal and dark-reared rats. *Exp Brain Res.* 1993, 92, 473.
365. Papadopoulos G.C., Parnavelas J.G., Cavanagh M.E.: Extensive co-existence of neuropeptides in the rat visual cortex. *Brain Res.* 1987, 420, 95.
366. Parent A., Pare D., Smith Y., Steriade M.: Basal forebrain cholinergic and noncholinergic projections to the thalamus and brainstem in cats and monkeys. *J Comp Neurol.* 1988, 277, 281.
367. Parker R.M., Herzog H.: Comparison of Y-receptor subtype expression in the rat hippocampus. *Regul Pept.* 1998, 75-76, 109.
368. Parker R.M.C., Herzog H.: Regional distribution of Y-receptor subtype mRNAs in rat brain. *Eur J Neurosci.* 1999, 11, 1431.
369. Parnavelas J.G.: The origin and migration of cortical neurones: new vistas. *TINS.* 2000, 23, 126.
370. Pascual M., Pozas E., Barallobre M.J., Tessier-Lavigne M., Soriano E.: Coordinated functions of Netrin-1 and Class 3 secreted Semaphorins in the guidance of reciprocal septohippocampal connections. *Mol Cell Neurosci.* 2004, 26, 24.
371. Patel Y.C., Greenwood M.T., Warszynska A., Panetta R., Srikant C.B.: All five cloned human somatostatin receptors (hSSTR1-5) are functionally coupled to adenylyl cyclase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994, 198, 605.
372. Patz S., Grabert J., Gorba T., Wirth M.J., Wahle P.: Parvalbumin expression in visual cortical interneurons depends on neuronal activity and TrkB ligands during an Early period of postnatal development. *Cereb Cortex.* 2004, 14, 342.
373. Paupardin-Tritsch D., Hammond C., Gerschenfeld H.M., Nairn A.C., Greengard P.: cGMP-dependent protein kinase enhances Ca²⁺ current and potentiates the serotonin-induced Ca²⁺ current increase in snail neurones. *Nature.* 1986, 323, 812.
374. Paxinos G., Tork I., Tecott L.H., Valentino K.L.: Atlas of the developing rat brain, Academic Press, Inc., San Diego 1991.
375. Paxinos G., Watson C.: The rat brain in stereotaxic coordinates, Academic Press, San Diego 1997.

376. Pellegrini G., Magistretti P.J., Martin J.L.: VIP and PACAP potentiate the action of glutamate on BDNF expression in mouse cortical neurones. *Eur J Neurosci.* 1998, 10, 272.
377. Perez-Cerda F., Martinez-Millan L., Matute C.: Anatomical evidence for glutamate and/or aspartate as neurotransmitters in the geniculo-, claustr-, and cortico-cortical pathways to the cat striate cortex. *J Comp Neurol.* 1996, 373, 422.
378. Peunova N., Scheinker V., Cline H., Enikolopov G.: Nitric oxide is an essential negative regulator of cell proliferation in *Xenopus* brain. *J Neurosci.* 2001, 21, 8809.
379. Pimstone B.L., Berelowitz M., Kronheim S.: Somatostatin, 1976. *S Afr Med J.* 1976, 50, 1471.
380. Porter L.L., Rizzo E., Hornung J.P.: Dopamine affects parvalbumin expression during cortical development in vitro. *J Neurosci.* 1999, 19, 8990.
381. Poyner D., Cox H., Bushfield M., Treherne J.M., Demetrikopoulos M.K.: Neuropeptides in drug research. *Prog Drug Res.* 2000, 54, 121.
382. Przybylska-Gornowicz B., Helboe L., Lewczuk B., Moller M.: Somatostatin and somatostatin receptors in the pig pineal gland during postnatal development: An immunocytochemical study. *Anat Rec.* 2000, 259, 141.
383. Puelles L., Kuwana E., Puelles E., Rubenstein J.L.R.: Comparison of the mammalian and avian telencephalon from the perspective of gene expression data. *Eur J Morphol.* 1999, 37, 39.
384. Puyal J., Devau G., Venteo S., Sans N., Raymond J.: Calcium-binding proteins map the postnatal development of rat vestibular nuclei and their vestibular and cerebellar projections. *J Comp Neurol.* 2002, 451, 374.
385. Quetglas S., Iborra C., Sasakawa N., De H.L., Kumakura K., Sato K., Leveque C., Seagar M.: Calmodulin and lipid binding to synaptobrevin regulates calcium-dependent exocytosis. *EMBO J.* 2002, 21, 3970.
386. Rapp P.R., Amaral D.G.: The time of origin of somatostatin-immunoreactive neurons in the rat hippocampal formation. *Brain Res.* 1988, 469, 231.
387. Real M.A., Dávila J.C., Guirado S.: Expression of calcium-binding proteins in the mouse claustrum. *J Chem Neuroanat.* 2003, 25, 151.
388. 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.* 2000, 11, 162.

389. Reitstetter R., Yool A.J.: Morphological consequences of altered calcium-dependent transmembrane signaling on the development of cultured cerebellar Purkinje neurons. *Dev Brain Res.* 1998, 107, 165.
390. Reynhout K., Baizer J.S.: Immunoreactivity for calcium-binding proteins in the claustrum of the monkey. *Anat Embryol.* 1999, 199, 75.
391. Roberts L.A., Morris B.J., O'Shaughnessy C.T.: Involvement of two isoforms of SNAP-25 in the expression of long-term potentiation in the rat hippocampus. *Neuroreport.* 1998, 9, 33.
392. Rodrigo J., Springall D.R., Uttenthal O., Bentura M.L., Abadia-Molina F., Riveros-Moreno V., Martinez-Murillo R., Polak J.M., Moncada S.: Localization of nitric oxide synthase in the adult rat brain. *Philos Trans R Soc Lond [Biol].* 1994, 345, 175.
393. Rogers J.H.: Immunohistochemical markers in rat cortex: co-localization of calretinin and calbindin-D28k with neuropeptides and GABA. *Brain Res.* 1992, 587, 147.
394. Rogers J.H.: Calretinin: a gene for a novel calcium-binding protein expressed principally in neurons. *J Cell Biol.* 1987, 105, 1343.
395. Rose M.: Die Ontogenie der Inselrinde. Zugleich ein Beitrag zur histogenetischen Rindeneinteilung. *J Psychol Neurol.* 1928, 36, 182.
396. Rose M.: Cytoarchitektonischer Atlas der Grobhirnrinde des Kaninchens. *J Psychol Neurol.* 1931, 43, 353.
397. Rosen S.C., Susswein A.J., Cropper E.C., Weiss K.R., Kupfermann I.: Selective modulation of spike duration by serotonin and the neuropeptides, FMRFamide, SCPB, buccalin and myomodulin in different classes of mechanosensitive neurons in the cerebral ganglion of *Aplysia*. *J Neurosci.* 1989, 9, 390.
398. Rothman J.E.: Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature.* 1994, 372, 55.
399. Równiak M., Sztejn S., Robak A., Klawon M.: The types of neurons in the claustrum of bison *bonasus*: Nissl and Golgi study. *Folia Morphol (Warsz).* 1994, 53, 231.
400. Sadikot A.F., Burhan A.M., Belanger M.C., Sasseville R.: NMDA receptor antagonists influence early development of GABAergic interneurons in the mammalian striatum. *Dev Brain Res.* 1998, 105, 35.
401. Sadowski M., Moryś J., Jakubowska-Sadowska K., Narkiewicz O.: Organization of claustricocortical connections in the rat. In: 1995, p 61.

402. Sadowski M., Moryś J., Jakubowska-Sadowska K., Narkiewicz O.: Rat's claustrum shows two main cortico-related zones. *Brain Res.* 1997, 756, 147.
403. Said S.I., Mutt V.: Polypeptide with broad biological activity: isolation from small intestine. *Science.* 1970, 169, 1217.
404. Sanchez M.P., Frassoni C., Alvarez-Bolado G., Spreafico R., Fairen A.: Distribution of calbindin and parvalbumin in the developing somatosensory cortex and its primordium in the rat: an immunocytochemical study. *J Neurocytol.* 1992, 21, 717.
405. Sanchez-Islas E., Leon-Olea M.: Nitric oxide synthase inhibition during synaptic maturation decreases synapsin I immunoreactivity in rat brain. *Nitric Oxide.* 2004, 10, 141.
406. Santacana M., Uttenthal L.O., Bentura M.L., Fernandez A.P., Serrano J., Martinez d., V, Alonso D., Martinez-Murillo R., Rodrigo J.: Expression of neuronal nitric oxide synthase during embryonic development of the rat cerebral cortex. *Brain Res Dev Brain Res.* 1998, 111, 205.
407. 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.* 1997, 7, 130.
408. Schlosser B., Klaus G., Prime G., Ten B.G.: Postnatal development of calretinin- and parvalbumin-positive interneurons in the rat neostriatum: an immunohistochemical study. *J Comp Neurol.* 1999, 405, 185.
409. Scholz N.L., Chang E.S., Graubard K., Truman J.W.: The NO/cGMP pathway and the development of neural networks in postembryonic lobsters. *J Neurobiol.* 1998, 34, 208.
410. Schulman H.: Nitric oxide: a spatial second messenger. *Mol Psychiatry.* 1997, 2, 296.
411. Schwartz J.P., Ji Z., Epelbaum J.: Somatostatin as a neurotrophic factor. Which receptor/second messenger transduction system is involved? *Perspect Dev Neurobiol.* 1998, 5, 427.
412. Sekitani M., Shiosaka S., Kuriyama H., Lee Y., Ikeda M., Tohyama M.: Transient expression of somatostatin mRNA in the auditory system of neonatal rat. *Brain Res Mol Brain Res.* 1990, 7, 177.
413. Seo-Hiraiwa M.L., Seto-Ohshima A., Kato K.: The surface evoked potential and parvalbumin-immunoreactivity in the somatosensory cortex of the developing rat. *Dev Psychobiol.* 1995, 28, 337.

414. Seroogy K.B., Bayliss D.A., Szymeczek C.L., Hokfelt T., Millhorn D.E.: Transient expression of somatostatin messenger RNA and peptide in the hypoglossal nucleus of the neonatal rat. *Brain Res Dev Brain Res.* 1991, 60, 241.
415. Seroogy K.B., Tsuruo Y., Hokfelt T., Walsh J., Fahrenkrug J., Emson P.C., Goldstein M.: Further analysis of presence of peptides in dopamine neurons. Cholecystokinin, peptide histidine-isoleucine/vasoactive intestinal polypeptide and substance P in rat supramammillary region and mesencephalon. *Exp Brain Res.* 1988, 72, 523.
416. Setzer M., Ulfing N.: Differential expression of calbindin and calretinin in the human fetal amygdala. *Microsc Res Tech.* 1999, 46, 1.
417. Sharma R.K., Perez M.T., Ehinger B.: Immunocytochemical localisation of neuronal nitric oxide synthase in developing and transplanted rabbit retinas. *Histochem Cell Biol.* 1997, 107, 449.
418. Sheerin A.H., Nysten K., Zhang X., Saucier D.M., Corcoran M.E.: Further evidence for a role of the anterior claustrum in epileptogenesis. *Neuroscience.* 2004, 125, 57.
419. Sherk H.: The claustrum and the cerebral cortex. W: *Cerebral cortex. vol.5. Sensory-motor areas and aspects of cortical connectivity*, Jones E.G., Peters A. (red), Plenum Press, New York, London 1988, 467.
420. Sherk H., LeVay S.: Visual claustrum: topography and receptive field properties in the cat. *Science.* 1981, 212, 87.
421. Sherk H., LeVay S.: Contribution of the cortico-claustral loop to receptive field properties in area 17 of the cat. *J Neurosci.* 1983, 3, 2121.
422. Sheth A.N., McKee M.L., Bhide P.G.: The sequence of formation and development of corticostriate connections in mice. *Dev Neurosci.* 1998, 20, 98.
423. Shima K., Hoshi E., Tanji J.: Neuronal activity in the claustrum of the monkey during performance of multiple movements. *J Neurophysiol.* 1996, 76, 2115.
424. Shine J., Potter E.K., Biden T., Selbie L.A., Herzog H.: Neuropeptide Y and regulation of the cardiovascular system. *J Hypertens Suppl.* 1994, 12, S41-S45.
425. Shiosaka S., Takatsuki K., Sakanaka M., Inagaki S., Takagi H., Senba E., Kawai Y., Iida H., Minagawa H., Hara Y., Matsuzaki T., Tohyama M.: Ontogeny of somatostatin-containing neuron system of the rat: immunohistochemical analysis. II. Forebrain and diencephalon. *J Comp Neurol.* 1982, 204, 211.

426. 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.* 1980, 186, 165.
427. Słoniewski P., Pilgrim Ch.: Claustro-neocortical connections in the rat as demonstrated by retrograde tracing with Lucifer Yellow. *Neurosci Lett.* 1984, 49, 29.
428. Słoniewski P., Usunoff K.G., Pilgrim C.: Retrograde transport of fluorescent tracers reveals extensive ipsi- and contralateral claustrocortical connections in the rat. *J Comp Neurol.* 1986, 246, 467.
429. Słoniewski P., Usunoff K.G., Pilgrim Ch.: Efferent connections of the claustrum to the posterior thalamic and pretectal region in the rat. *Neurosci Lett.* 1985, 60, 195.
430. Słoniewski P., Usunoff K.G., Pilgrim Ch.: Diencephalic and mesencephalic afferents of the rat claustrum. *Anat Embryol (Berl).* 1986, 173, 401.
431. Smiley J.F., McGinnis J.P., Javitt D.C.: Nitric oxide synthase interneurons in the monkey cerebral cortex are subsets of the somatostatin, neuropeptide Y, and calbindin cells. *Brain Res.* 2000, 863, 205.
432. Snyder S.H., Jaffrey S.R., Zakhary R.: Nitric oxide and carbon monoxide: parallel roles as neural messengers. *Brain Res Brain Res Rev.* 1998, 26, 167.
433. Solbach S., Celio M.R.: Ontogeny of the calcium binding protein parvalbumin in the rat nervous system. *Anat Embryol (Berl).* 1991, 184, 103.
434. Sollner T., Bennett M.K., Whiteheart S.W., Scheller R.H., Rothman J.E.: A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell.* 1993, 75, 409.
435. Sollner T., Whiteheart S.W., Brunner M., Erdjument-Bromage H., Gero-manos S., Tempst P., Rothman J.E.: SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature.* 1993, 362, 318.
436. Sorvari H., Soininen H., Paljärvi L., Karkola K., Pitkänen A.: Distribution of parvalbumin-immunoreactive cells and fibers in the human amygdaloid complex. *J Comp Neurol.* 1995, 360, 185.
437. Spahn B., Braak H.: Percentage of projection neurons and various types of interneurons in the human claustrum. *Acta Anat.* 1985, 122, 245.

438. Squatrito S., Battaglini P.P., Galletti C., Riva Sanseverino E.: Projections from the visual cortex to the contralateral claustrum of the cat revealed by an anterograde axonal transport method. *Neurosci Lett.* 1980, 19, 271.
439. 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.* 1988, 21, 207.
440. Striedter G.F.: The telencephalon of Tetrapods in evolution. *Brain Behav Evol.* 1997, 49, 179.
441. Stuehr D.J., Kwon N.S., Nathan C.F., Griffith O.W., Feldman P.L., Wiseman J.: N omega-hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. *J Biol Chem.* 1991, 266, 6259.
442. Sun L., Philipson L.H., Miller R.J.: Regulation of K⁺ and Ca⁺⁺ channels by a family of neuropeptide Y receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998, 284, 625.
443. Świtka A., Scheuermann D.W., Adiaensen D., Timmermans J.-P., Narkiewicz O.: NADPH-diaphorase enzyme activity, serotonin and tyrosine hydroxylase immunocytochemistry in the claustrum of the domestic cat. W: *Verhandlungen der Anatomischen Gesellschaft*, Kühnel W. (red), Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart 1994, 182.
444. Szabo C.: Physiological and pathophysiological roles of nitric oxide in the central nervous system. *Brain Res Bull.* 1996, 41, 131.
445. Tallent M.K., Siggins G.R.: Somatostatin acts in CA1 and CA3 to reduce hippocampal epileptiform activity. *J Neurophysiol.* 1999, 81, 1626.
446. Taniwaki T., Schwartz J.P.: Somatostatin enhances neurofilament expression and neurite outgrowth in cultured rat cerebellar granule cells. *Brain Res Dev Brain Res.* 1995, 88, 109.
447. Tatemoto K.: Neuropeptide Y: complete amino acid sequence of the brain peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982, 79, 5485.
448. Tatemoto K., Carlquist M., Mutt V.: Neuropeptide Y--a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature.* 1982, 296, 659.
449. ten Donkelaar H.J., Dederen P.J.: Neurogenesis in the basal forebrain of the Chinese hamster (*Cricetulus griseus*). I. Time of neuron origin. *Anat Embryol (Berl).* 1979, 156, 331.
450. ten Donkelaar H.J., Geysberts L.G., Dederen P.J.: Stages in the prenatal development of the Chinese hamster (*Cricetulus griseus*). *Anat Embryol (Berl).* 1979, 156, 1.

451. Tentler J.J., Hadcock J.R., Gutierrez-Hartmann A.: Somatostatin acts by inhibiting the cyclic 3',5'-adenosine monophosphate (cAMP)/protein kinase A pathway, cAMP response element-binding protein (CREB) phosphorylation, and CREB transcription potency. *Mol Endocrinol.* 1997, 11, 859.
452. Terada H., Nagai T., Okada S., Kimura H., Kitahama K.: Ontogenesis of neurons immunoreactive for nitric oxide synthase in rat forebrain and mid-brain. *Dev Brain Res.* 2001, 128, 121.
453. Terubayashi H., Okamura H., Fujisawa H., Itoi M., Yanaihara N., Iyata Y.: Postnatal development of vasoactive intestinal polypeptide immunoreactive amacrine cells in the rat retina. *Neurosci Lett.* 1982, 33, 259.
454. Tessier-Lavigne M., Goodman C.S.: The molecular biology of axon guidance. *Science.* 1996, 274, 1123.
455. Theveniau M., Reisine T.: Developmental changes in expression of a 60-kDa somatostatin receptor immunoreactivity in the rat brain. *J Neurochem.* 1993, 60, 1870.
456. Thompson K., Holm A.M., Schousboe A., Popper P., Micevych P., Westerglain C.: Hippocampal stimulation produces neuronal death in the immature brain. *Neuroscience.* 1998, 82, 337.
457. Tohyama M., Koichi T.: Atlas of neuroactive substances and their receptors in the rat, Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo 1998.
458. Tsumoto T., Suda K.: Effects of stimulation of the dorsocaudal claustrum on activities of striate cortex neurons in the cat. *Brain Res.* 1982, 240, 345.
459. Tuor U.I., Edvinsson L., Kelly P.A., McCulloch J.: Local cerebral blood flow following the intrastriatal administration of vasoactive intestinal peptide or peptide histidine isoleucine in the rat. *Regul Pept.* 1990, 28, 255.
460. Tuttle R., Schlaggar B.L., Braisted J.E., O'Leary D.D.: Maturation-dependent upregulation of growth-promoting molecules in developing cortical plate controls thalamic and cortical neurite growth. *J Neurosci.* 1995, 15, 3039.
461. Tuunanen J., Halonen T., Pitkanen A.: Decrease in somatostatin-immunoreactive neurons in the rat amygdaloid complex in a kindling model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 1997, 26, 315.
462. Ulfing N.: Expression of calbindin and calretinin in the human ganglionic eminence. *Pediatr Neurol.* 2001, 24, 357.
463. Ulfing N.: Calcium-binding proteins in the human developing brain. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 2002, 165, III-92.

464. Ulupinar E., Datwani A., Behar O., Fujisawa H., Erzurumlu R.: Role of semaphorin III in the developing rodent trigeminal system. *Mol Cell Neurosci.* 1999, 13, 281.
465. Unger J.W., Lange W.: NADPH-diaphorase-positive cell populations in the human amygdala and temporal cortex: neuroanatomy, peptidergic characteristics and aspects of aging and Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 1992, 83, 636.
466. Van Groen T., Wyss J.M.: Connections of the retrosplenial granular cortex in the rat. *J Comp Neurol.* 1990, 300, 593.
467. Vercelli A., Garbossa D., Biasiol S., Repici M., Jhaveri S.: NOS inhibition during postnatal development leads to increased ipsilateral retinocollicular and retinogeniculate projections in rats. *Eur J Neurosci.* 2000, 12, 473.
468. Vercelli A., Garbossa D., Repici M., Biasiol S., Jhaveri S.: Role of nitric oxide in the development of retinal projections. *Ital J Anat Embryol.* 2001, 106, 489.
469. Veruki M.L., Yeh H.H.: Vasoactive intestinal polypeptide modulates GABAA receptor function through activation of cyclic AMP. *Vis Neurosci.* 1994, 11, 899.
470. Vezzani A., Hoyer D.: Brain somatostatin: a candidate inhibitory role in seizures and epileptogenesis. *Eur J Neurosci.* 1999, 11, 3767.
471. Vincent S.R., Johansson O., Hokfelt T., Skirboll L., Elde R.P., Terenius L., Kimmel J., Goldstein M.: NADPH-diaphorase: a selective histochemical marker for striatal neurons containing both somatostatin- and avian pancreatic polypeptide (APP)-like immunoreactivities. *J Comp Neurol.* 1983, 217, 252.
472. Vizi E.S., Kiss J.P., Lendvai B.: Nonsynaptic communication in the central nervous system. *Neurochem Int.* 2004, 45, 443.
473. Vogt Weisenhorn D.M., Celio M.R., Rickmann M.: The onset of parvalbumin-expression in interneurons of the rat parietal cortex depends upon extrinsic factor(s). *Eur J Neurosci.* 1998, 10, 1027.
474. Wada J.A., Kudo T.: Involvement of the claustrum in the convulsive evolution of temporal limbic seizure in feline amygdaloid kindling. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1997, 103, 249.
475. Wahle P., Meyer G.: Early postnatal development of vasoactive intestinal polypeptide- and peptide histidine isoleucine-immunoreactive structures in the cat visual cortex. *J Comp Neurol.* 1989, 282, 215.

476. Wasilewska B., Najdzion J.: Types of neurons of the claustrum in the rabbit - Nissl, Klüver-Barrera and Golgi studies. *Folia Morphol.* 2001, 60, 41.
477. Weiss S., Hochman D., MacVicar B.A.: Repeated NMDA receptor activation induces distinct intracellular calcium changes in subpopulations of striatal neurons in vitro. *Brain Res.* 1993, 627, 63.
478. Wettstein J.G., Earley B., Junien J.L.: Central nervous system pharmacology of neuropeptide Y. *Pharmacol Ther.* 1995, 65, 397.
479. Widdowson P.S., Upton R., Henderson L., Buckingham R., Wilson S., Williams G.: Reciprocal regional changes in brain NPY receptor density during dietary restriction and dietary-induced obesity in the rat. *Brain Res.* 1997, 774, 1.
480. Wilhite B.L., Teyler T.J., Hendricks C.: Functional relation of rodent claustral-entorhinal-hippocampal system. *Brain Res.* 1986, 365, 54.
481. Wirth M.J., Gorba T., Wahle P.: Epigenetic factors regulate the NPY expression in rat cortical neurons. *Regul Pept.* 1998, 75-76, 283.
482. Witter M.P., Room P., Groenewegen H.J., Lohman A.H.: Reciprocal connections of the insular and piriform claustrum with limbic cortex: an anatomical study in the cat. *Neuroscience.* 1988, 24, 519.
483. Wójcik S., Dziewiątkowski J., Kowiański P., Ludkiewicz B., Jagalska-Majewska H., Moryś J.: Qualitative and quantitative study of the postnatal development of the rabbit insular claustrum. *Int J Dev Neurosci.* 2002, 20, 113.
484. 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)*. 2004, 64, 449.
485. Woldbye D.P., Larsen P.J., Mikkelsen J.D., Klemp K., Madsen T.M., Bolwig T.G.: Powerful inhibition of kainic acid seizures by neuropeptide Y via Y5-like receptors. *Nat Med.* 1997, 3, 761.
486. Wood P.L., Choksi S., Bocchini V.: Inducible microglial nitric oxide synthase: a large membrane pool. *Neuroreport.* 1994, 5, 977.
487. Woodhams P.L., Allen Y.S., McGovern J., Allen J.M., Bloom S.R., Balazs R., Polak J.M.: Immunohistochemical analysis of the early ontogeny of the neuropeptide Y system in rat brain. *Neuroscience.* 1985, 15, 173.
488. Woźniak W.: Brain-derived neurotrophic factor (BDNF): role in neuronal development and survival. *Folia Morphol (Warsz)*. 1993, 52, 173.

489. Wu H.H., Selski D.J., El Fakahany E.E., McLoon S.C.: The role of nitric oxide in development of topographic precision in the retinotectal projection of chick. *J Neurosci.* 2001, 21, 4318.
490. Wu H.H., Williams C.V., McLoon S.C.: Involvement of nitric oxide in the elimination of a transient retinotectal projection in development. *Science.* 1994, 265, 1593.
491. Yacubova E., Komuro H.: Stage-specific control of neuronal migration by somatostatin. *Nature.* 2002, 415, 77.
492. Yamashita A., Hayashi M., Shimizu K., Oshima K.: Ontogeny of somatostatin in cerebral cortex of macaque monkey: an immunohistochemical study. *Brain Res Dev Brain Res.* 1989, 45, 103.
493. Yew D.T., Chan W.Y., Luo C.B., Zheng D.R., Yu M.C.: Neurotransmitters and neuropeptides in the developing human central nervous system. A review. *Biol Signals Recept.* 1999, 8, 149.
494. Yoon S.P., Chung Y.Y., Chang I.Y., Kim J.J., Moon J.S., Kim H.S.: Postnatal development of parvalbumin and calbindin D-28k immunoreactivities in the canine hippocampus. *J Chem Neuroanat.* 2000, 19, 143.
495. Zalutsky R.A., Miller R.F.: The physiology of somatostatin in the rabbit retina. *J Neurosci.* 1990, 10, 383.
496. Zar J.H.: *Biostatistical analysis*, Prentis-Hall International, Inc., London 1996.
497. 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.* 2001, 21, 3674.
498. Zhang Y.T., Zhang D.L., Cao Y.L., Zhao B.L.: Developmental expression and activity variation of nitric oxide synthase in the brain of golden hamster. *Brain Res Bull.* 2002, 58, 385.
499. Zilles K., Kalman M., Hajos F., Schleicher A.: Developmental gradients of vasoactive intestinal polypeptide (VIP)-containing neurons in the rat visual cortex detected by image analysis. *Brain Res Dev Brain Res.* 1991, 60, 137.
500. Zilles K., Zilles B., Schleicher A.: A quantitative approach to cytoarchitectonics. VI. The areal pattern of the cortex of the albino rat. *Anat Embryol (Berl).* 1980, 159, 335.
501. Zilles K.J.: *The cortex of the rat*, Springer-Verlag, Berlin;New York 1985.
502. Zingg H.H., Goodman R.H., Habener J.F.: Developmental expression of the rat somatostatin gene. *Endocrinology.* 1984, 115, 90.

-
503. Żukowska Z.: Roles and perspectives of neuropeptides in medicine. *Neuropeptides*. 2002, 36, 437.
 504. Żukowska Z., Grant D.S., Lee E.W.: Neuropeptide Y: a novel mechanism for ischemic angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med*. 2003, 13, 86.