

**ANNALES
ACADEMIAE MEDICAE
GEDANENSIS
TOM XXXX
2010
SUPPLEMENT 6**

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

Beata Ludkiewicz

**AKTYWACJA CIAŁA MIGDAŁOWATEGO SZCZURA
PO TEŚCIE OTWARTEGO POLA
ZE SZCZEGÓLNYM UWZGLĘDNIENIEM
ROLI NEURONÓW ZAWIERAJĄCYCH BIAŁKA
WIAŻĄCE WAPŃ I SYNTAZĘ TLENKU AZOTU**

*Activation of the amygdaloid body of the rat
after open field test
with a focus on the role of neurons containing calcium
binding proteins and nitric oxide synthase*

**Zakład Anatomii i Neurobiologii
Gdański Uniwersytet Medyczny
Kierownik: prof. dr hab. Janusz Moryś**

GDAŃSK 2010

Wydano za zgodą
Senackiej Komisji Wydawnictw Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

REDAKTOR NACZELNY

EDITOR-IN-CHIEF
prof. dr Marek Grzybiak

KOMITET REDAKCYJNY

EDITORIAL BOARD

dr hab. Tomasz Bączek, dr hab. Zdzisław Bereznowski, prof. nadzw., mgr inż. Anna Grygorowicz,
prof. dr hab. Andrzej Hellmann, dr hab. Jerzy Kuczkowski, dr Włodzimierz Kuta, mgr Józefa de Laval,
prof. dr hab. Krzysztof Narkiewicz, dr hab. Michał Obuchowski, prof. nadzw.,
prof. dr hab. Zbigniew Kmieć, prof. dr hab. Stefan Raszeja - członek honorowy,
dr hab. Adam Szarszewski, prof. dr hab. Julian Świerczyński, dr hab. Aleksandra Żurowska

ADRES REDAKCJI

ADDRESS OF EDITORIAL OFFICE
Annales Academiae Medicae Gedanensis
Zakład Anatomii Klinicznej
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk, Poland
e-mail: annales@gumed.edu.pl

Artykuły opublikowane w Annales Academiae Medicae Gedanensis
są zamieszczane w bazie EMBASE

Articles published in Annales Academiae Medicae Gedanensis
are covered by the Excerpta Medica database (EMBASE)

PL ISSN 0303-4135

Gdański Uniwersytet Medyczny

Wyrażam serdeczne podziękowania:

*Panu Profesorowi Januszowi Morysiowi,
za stworzenie sprzyjających warunków do pracy, życzliwe
uwagi merytoryczne i cierpliwość.*

*Koleżankom i Kolegom z Zakładu Anatomii i Neurobiologii GUMed
za nieocenioną pomoc w przygotowaniu i opracowaniu materiału
badawczego, cenne rady i wsparcie.*

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

Pracę dedykuję mojej Rodzinie.

SPIS TREŚCI

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	9
1 WSTĘP	11
1.1 STRESORY I REAKCJA STRESOWA	11
1.1.1 <i>Badanie aktywacji struktur układu nerwowego w odpowiedzi na działanie bodźca awersyjnego</i>	<i>14</i>
1.2 CIAŁO MIGDAŁOWATE	15
1.2.1 <i>Podział ciała migdałowego</i>	<i>16</i>
1.2.2 <i>Połączenia ciała migdałowego</i>	<i>18</i>
1.2.3 <i>Charakterystyka immunocytochemiczna ciała migdałowego</i>	<i>22</i>
1.2.4 <i>Zasadnicze znaczenie czynnościowe ciała migdałowego</i>	<i>24</i>
2 CELE PRACY	27
3 MATERIAŁ I METODY	29
3.1 MATERIAŁ	29
3.2 METODY	29
3.2.1 <i>Test otwartego pola</i>	<i>29</i>
3.2.2 <i>Procedura utrwalenia materiału</i>	<i>30</i>
3.2.3 <i>Metody immunocytochemiczne</i>	<i>30</i>
3.2.4 <i>Badania jakościowe, półilościowe i ilościowe</i>	<i>33</i>
3.2.5 <i>Ocena statystyczna wyników</i>	<i>35</i>
4 WYNIKI	37
4.1 OGÓLNY OPIS ROZMIESZCZENIA I MORFOLOGII KOMÓREK ZAWIERAJĄCYCH BIAŁKA WIAŻĄCE WAPŃ ORAZ SYNTAZĘ TLENKU AZOTU W JĄDRACH CIAŁA MIGDAŁOWATEGO W OKRESIE P0-P720	37
4.1.1 <i>Neurony zawierające kalretyninę</i>	<i>39</i>
4.1.2 <i>Neurony zawierające kalbindynę D-28k</i>	<i>44</i>
4.1.3 <i>Neurony zawierające parwalbuminę</i>	<i>49</i>
4.1.4 <i>Neurony zawierające syntazę tlenku azotu</i>	<i>54</i>
4.2 AKTYWACJA JĄDER CIAŁA MIGDAŁOWATEGO SZCZURA PO TEŚCIE OTWARTEGO POLA – ANALIZA ILOŚCIOWA	60
4.2.1 <i>Porównanie jąder ciała migdałowego pod względem gęstości neuronów c-Fos-ir w grupach wiekowych</i>	<i>61</i>
4.2.2 <i>Zmiany gęstości komórek c-Fos-ir w jądrach ciała migdałowego w zależności od wieku</i>	<i>64</i>
4.3 AKTYWACJA KOMÓREK ZAWIERAJĄCYCH BIAŁKA WIAŻĄCE WAPŃ I SYNTAZĘ TLENKU AZOTU W JĄDRACH CIAŁA MIGDAŁOWATEGO PO TEŚCIE OTWARTEGO POLA	66
4.3.1 <i>Morfologia komórek wykazujących podwójne wybarwienie c-Fos oraz kalretyniny, kalbindyny D-28k, parwalbuminy i syntazy tlenku azotu</i>	<i>67</i>

4.3.2	<i>Porównanie jąder ciała migdałowatego pod względem gęstości i procentu komórek wykazujących podwójne wybarwienie c-Fos oraz kalretyniny, kalbindyny D-28k, parwalbuminy i syntazy tlenu azotu w grupach wiekowych.....</i>	76
5	DYSKUSJA.....	89
5.1	OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA KOMÓREK ZAWIERAJĄCYCH BIAŁKA WIAŻĄCE WAPŃ ORAZ SYNTAZĘ TLENU AZOTU W JĄDRACH CIAŁA MIGDAŁOWATEGO.....	89
5.1.1	<i>Neurony zawierające białka wiążące wapń</i>	89
5.1.2	<i>Neurony zawierające syntazę tlenu azotu.....</i>	92
5.2	AKTYWACJA CIAŁA MIGDAŁOWATEGO PO TEŚCIE OTWARTEGO POLA.....	94
5.2.1	<i>Zmiany aktywacji jąder ciała migdałowatego w zależności od wieku.....</i>	94
5.2.2	<i>Zaangażowanie i rola jąder ciała migdałowatego</i>	98
5.3	AKTYWACJA NEURONÓW CIAŁA MIGDAŁOWATEGO ZAWIERAJĄCYCH BIAŁKA WIAŻĄCE WAPŃ I SYNTAZĘ TLENU AZOTU PO TEŚCIE OTWARTEGO POLA	103
5.3.1	<i>Aktywacja neuronów zawierających białka wiążące wapń</i>	104
5.3.2	<i>Aktywacja neuronów zawierających syntazę tlenu azotu</i>	107
6	PODSUMOWANIE WYNIKÓW I WNIOSKI	111
7	PIŚMIENNICTWO.....	113
8	STRESZCZENIE	155
9	SUMMARY.....	157

Wykaz stosowanych skrótów

ACTH	hormon adrenokortykotropowy (adrenokortykotropina) / <i>adrenocorticotrophic hormone</i>
BAOT	jądro łożyskowe dodatkowego pasma węchowego ciała migdałowego / <i>bed nucleus of the accessory olfactory tract</i>
BL	jądro podstawno-boczne ciała migdałowego / <i>basolateral nucleus</i>
BLC	zespół podstawno-boczny ciała migdałowego / <i>basolateral complex</i>
BST	jądro prążka krańcowego / <i>bed nucleus of stria terminalis</i>
CaBPs	białka wiążące wapń / <i>calcium binding proteins</i>
CB	kalbindyna D -28k / <i>calbindin D-28k</i>
CCK	cholecystokinina / <i>cholecystokinin</i>
Ce	jądro środkowe ciała migdałowego / <i>central nucleus</i>
cGMP	cykliczny guanozynomonofosforan / <i>cyclic guanosine monophosphate</i>
CoA	jądro korowe przednie ciała migdałowego / <i>anterior cortical nucleus</i>
CoPL	jądro korowe tylne boczne ciała migdałowego / <i>posterolateral cortical nucleus</i>
CoPM	jądro korowe tylne przyśrodkowe ciała migdałowego / <i>posteromedial cortical nucleus</i>
CR	kalretynina / <i>calretinin</i>
CRH	hormon uwalniający hormon kortykotropowy (kortykoliberyna) / <i>corticotropin-releasing hormone</i>
E	dzień życia przed urodzeniem / <i>day of prenatal life</i>
eNOS	śródbłonkowa forma syntazy tlenku azotu / <i>endothelial nitric oxide synthase</i>
GABA	kwas γ -aminomasłowy / <i>γ-aminobutyric acid</i>
Glu	glutaminian / <i>glutamate</i>
iNOS	indukcyjna forma syntazy tlenku azotu / <i>inducible nitric oxide synthase</i>
-ir	immunoreaktywność (immunobarwliwość) / <i>immunoreactivity</i>
L	jądro boczne ciała migdałowego / <i>lateral nucleus</i>
LTP	długotrwałe wzmocnienie synaptyczne / <i>long-term potentiation</i>
Me	jądro przyśrodkowe ciała migdałowego / <i>medial nucleus</i>
MeD	jądro przyśrodkowe ciała migdałowego – część grzbietowa / <i>medial nucleus - dorsal part</i>
MeV	jądro przyśrodkowe ciała migdałowego – część brzuszna / <i>medial nucleus - ventral part</i>
NADPH-d	diaforaza fosforanu dinukleotydu nikotynamidoadeninowego / <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase</i>
NDS	surowica ośła / <i>dankey serum</i>

NGS	surowica kozia / <i>goat serum</i>
NLOT	jądro bocznego pasma węchowego ciała migdałowatego / <i>nucleus of the lateral olfactory tract</i>
nNOS	neuronalna forma syntazy tlenku azotu/ <i>neuronal nitric oxide synthase</i>
NOS	syntaza tlenku azotu / <i>nitric oxide synthase</i>
OF	test otwartego pola / <i>open field test</i>
OUN	ośrodkowy układ nerwowy / <i>central nervous system</i>
P	dzień życia po urodzeniu / <i>day of postnatal life</i>
PAG	istota szara okołowodociągowa / <i>periaqueductal gray</i>
PBS	roztwór buforu fosforanowego / <i>phosphate-buffered saline</i>
PPN	oś podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowa / <i>hypothalamic–pituitary–adrenal axis</i>
PSA-NCAM	nerwowa cząsteczka adhezyjna z dołączonymi resztami kwasu polisialowego / <i>polysialylated form of neural cell adhesion molecule</i>
PV	parwalbumina / <i>parvalbumin</i>
PVN	jądro przykomorowe podwzgórza / <i>paraventricular nucleus</i>
SHRP	okres obniżonej reaktywności stresowej / <i>stress hypo-responsive period</i>
SO	jądro nadwzrokowe podwzgórza / <i>supraoptic nucleus</i>
SOM	somatostatyna / <i>somatostatin</i>
VIP	wazoaktywny peptyd jelitowy / <i>vasoactive intestinal peptide</i>

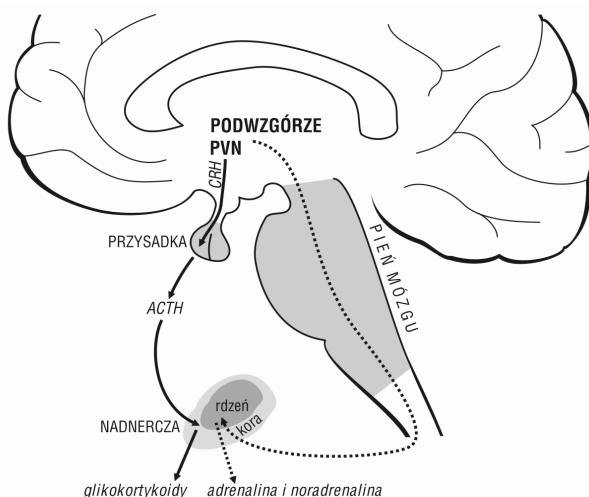
1 WSTĘP

Pojęcie emocji nie jest jasno zdefiniowane. Można je rozpatrywać jako behawioralne i wegetatywne zmiany (ekspresja emocji) na bodziec biologicznie znaczący lub też jako przeżywanie określonych, przyjemnych lub nieprzyjemnych stanów (dostępne dzięki introspekcji) [628]. Za szczególnie dogodny model do badań nad mechanizmami emocji uważa się strach (*fear*). Strach powstaje w odpowiedzi na bezwarunkowe bodźce awersyjne (specyficzne gatunkowo), bodźce warunkowane sygnalizujące niebezpieczeństwo, bądź też bodźce nowe, nieznane. Strach jest wszechobecny i podobnie wyraża się u człowieka i wielu innych zwierząt. Według Isaaca Marksa [333] istnieją cztery podstawowe strategie zachowania w obliczu zagrożenia: wycofanie się (unikanie niebezpieczeństwa albo ucieczka przed nim), bezruch (zastyganie), agresja defensywna (sprawianie wrażenia, że jest się niebezpiecznym i/lub walka) oraz poddanie się (w celu „ugłaskania przeciwnika”; cytowane za [297]). Działanie bodźca zagrażającego wewnętrznej równowadze organizmu skutkuje jego mobilizacją, czyli aktywacją układu zwanego przez LeDoux układem strachu [297]. Jest to system, który odkrywa niebezpieczeństwo i wywołuje reakcje maksymalizujące prawdopodobieństwo przetrwania w zaistniałej sytuacji w najbardziej korzystny sposób, czyli innymi słowy jest to układ zachowań obronnych. Zdaniem LeDoux interakcja między układem obrony, a świadomością leży u podłoża uczucia strachu [297].

1.1 Stresory i reakcja stresowa

Odpowiedź organizmu na działanie stresorów, czyli bodźców zagrażających bądź naruszających jego homeostazę, określa się mianem reakcji stresowej. Na reakcję stresową, która ma na celu przetrwanie i adaptację organizmu w niekorzystnych warunkach, składa się szereg zmian w funkcjonowaniu układów: hormonalnego, autonomicznego i behawioralnego. Szczególną rolę odgrywają tu: katecholaminy pnia mózgowia i rdzenia nadnerczy (aktywacja układu autonomicznego) oraz oś podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowa (PPN) [81, 219, 320, 367, 580] (ryc. 1). W przebiegu reakcji stresowej następuje: (1) podwyższenie poziomu adrenaliny we krwi i noradrenaliny w zakończeniach współczulnych włókien zazwojowych unerwiających większość narządów [341, 580] oraz (2) aktywacja osi PPN, która prowadzi do wzmożonej produkcji glikokortykoidów przez korę nadnerczy [4, 81, 219, 320, 396, 499] (ryc. 1). Glikokortykoidy, adrenalina i noradrenalina stymulują zmiany metaboliczne i narządowe celem adaptacji do zaistniałych warunków i przywrócenia homeostazy [81, 127, 281, 396, 580]. Miejszem „włączenia” reakcji stresowej jest podwzgórze, a szczególnie jądro przykomorowe podwzgórza (PVN) [18, 81, 469, 611]. Neuro-ny jądra przykomorowego produkują hormon uwalniający hormon adrenokorty-

kotropowy (kortykoliberyna; CRH), który z kolei wpływa na uwalnianie hormonu adrenokortykotropowego (adrenokortykotropina; ACTH) z przedniego płata przysadki mózgowej; ACTH stymuluje produkcję glikokortykoidów przez korę nadnerczy (oś PPN; ryc.1) [102, 611]. Aktywacja osi PPN jest jednym z najbardziej charakterystycznych i najlepiej poznanych elementów reakcji organizmu na awersyjne bodźce istotne emocjonalnie [81, 122, 219, 320, 340, 368, 396, 499, 611]. Neurony podwzgórza, poprzez bezpośredni lub pośredni wpływ na ośrodki pnia mózgowia oraz na rdzeń nadnerczy, wpływają również na aktywację układu autonomicznego [81, 152, 281, 587, 588] (ryc. 1).



Ryc. 1. Ogólny schemat osi podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowej (PPN; linia ciągła) oraz aktywacji układu autonomicznego (poprzez aktywację struktur pnia mózgowia i rdzenia nadnerczy; linia przerywana). Skróty: ACTH – adrenokortykotropina, CRF – kortykoliberyna, PVN – jądro przykomorowe podwzgórza

Fig. 1. General scheme of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis (PPN; continuous line) and the activation of the autonomic system (via activation of the brain stem's structures and adrenal medulla; dashed line). Abbreviations: ACTH – adrenocorticotropin hormone, CRF – corticotropin-releasing hormone, PVN – paraventricular nucleus of the hypothalamus

Ośrodkowy schemat aktywacji osi PPN i układu autonomicznego zależy od rodzaju bodźca stresowego [121, 217, 416, 503, 504], jego natężenia oraz czasu i częstotliwości działania [166, 311, 338, 375].

Istnieje szereg definicji i klasyfikacji stresorów [81, 121, 217, 219, 311, 504, 589]. Szczególnie interesujący wydaje się podział zaproponowany przez Hermanna i wsp. [219], którzy wyróżnili stresory reaktywne (*reactive*) i uprzedzające (*anticipatory*). Bodziec reaktywny wywołuje realną zmianę rozpoznawalną

przez układy czuciowe: somatyczny i trzewny (np. stymulacja hemo-, baro- i osmoreceptorów, ból somatyczny lub trzewny, uwolnienie cytokin); odpowiedź organizmu na ten bodziec jest stres reaktywny. Stresor uprzedzający nie narusza homeostazy bezpośrednio. W tym wypadku pobudzenie osi i związane z nim następstwa (stres uprzedzający), następują raczej przewencyjnie, w oczekiwaniu na ewentualne naruszenie równowagi wewnętrznej. Stres uprzedzający jest związany z nabytymi (warunkowanymi) i wrodzonymi, specyficznymi gatunkowo schematami zachowań (np. reakcja na zapach agresora [138, 570] czy nowego, nieprzyjaznego otoczenia [52]). Porównując powyższy podział z wcześniejszymi klasyfikacjami, można uznać, że odpowiedź reaktywna odpowiada stresowi systemowemu/fizycznemu, natomiast uprzedzająca, psychologicznemu/emocjonalnemu [121, 217, 311, 504]. Stresory psychologiczne, w porównaniu z systemowymi, w znacznie większym stopniu angażują kresomózgowie [140, 153, 217, 218, 503, 504].

Zdaniem Hermana i wsp. [219] stresory reaktywne aktywują krótką drogę odpowiedzi stresowej. Współtworzą ją struktury, które mają liczne, bezpośrednie połączenia z PVN (jądro pasma samotnego, jądra szwu, jądro przyramienne, jądro prążka krańcowego (BST), jądra podwzgórza i wzgórza). Indukcja tego systemu następuje bezpośrednio po zadziałaniu bodźca. Natomiast wpływ kresomózgowia (hipokampa, ciała migdałowatego, przegrody i kory przedczołowej) na PVN odbywa się zwykle z wykorzystaniem struktur drogi krótkiej. Liczne wzajemne połączenia między powyższymi rejonami kresomózgowia [80, 246, 347, 363, 364, 414, 428, 440, 442, 527] i nakładanie się ich stref projekcyjnych (np. w jądrze prążka krańcowego i podwzgórzu [49, 77, 80, 142, 221, 505, 530]), wskazują, że konwergencja impulsów następuje zanim dotrą one do PVN. Reasumując, ośrodkowa integracja stresu opiera się na zasadzie, według której droga reaktywna (krótka) jest szlakiem podstawowym, który w określonych warunkach, w zależności od rodzaju bodźca, jest modyfikowany przez struktury kresomózgowia, w oparciu o bieżące informacje, wrodzone schematy zachowań i nabyte doświadczenie [121, 219]. Przebieg odpowiedzi stresowej zależy od wielu czynników: aktualnego stanu organizmu [219], predyspozycji genetycznych [24, 224, 366, 377], wieku [224, 320, 426], doświadczenia nabytego w dzieciństwie [224, 283] oraz przeżytych urazów [73, 219, 224, 260, 317]. Stres jest czynnikiem ryzyka w wielu chorobach, w etiologię których włączone są te same hormony, które zapewniają przeżycie w warunkach stresowych [224]. Szczególnie znamienne w skutkach są traumatyczne doświadczenia we wczesnym etapie rozwoju, mające duży wpływ na funkcje poznawcze i zdrowie emocjonalne w wieku dorosłym [13, 68, 224, 494, 607].

1.1.1 Badanie aktywacji struktur układu nerwowego w odpowiedzi na działanie bodźca awersyjnego

Test otwartego pola

Jednym z testów stosowanych w celu wywołania niewarunkowanej reakcji stresowej u gryzoni jest test otwartego pola (*open field test*; OF) [20, 33, 52, 100, 207, 325, 384, 412, 453, 465]. Aparat do testu składa się z rozległej areny (dużo większej niż klatka hodowlana), w której zwierzę umieszczane jest na określony czas, bez możliwości ucieczki (arena otoczona jest gładkimi, wysokimi ścianami). Warunki testowania zmieniają się w zależności od: kształtu areny, jej koloru, oświetlenia, czasu ekspozycji zwierzęcia, metod rejestracji. Nieznane, nieprzyjemne, potencjalnie niebezpieczne otoczenie, uważane jest za awersyjny bodziec psychologiczny, stwarzający warunki do powstania reakcji stresowej o charakterze neurogennym, co skutkuje wzrostem aktywności neuronalnej [52].

Ekspresja protoonkogenu c-fos

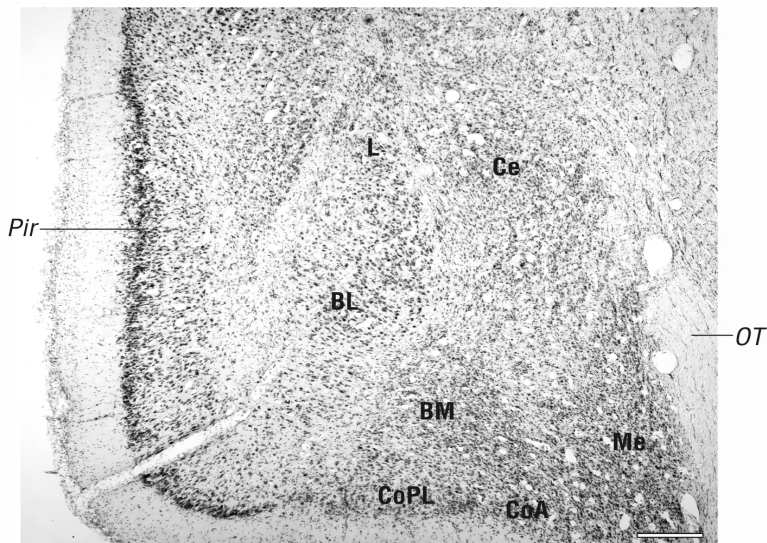
Aktywność neuronów, a co za tym idzie udział określonych struktur mózgowia w odpowiedzi na dany bodziec, można oceniać na podstawie poziomu ekspresji genów wczesnej odpowiedzi komórkowej, do których należy protoonkogen c-fos [419]. Ze względu na swoją powszechność, ale zarazem specyficzność, wzrost ekspresji c-fos sugeruje, że nowa informacja jest intensywnie analizowana przez wiele obszarów mózgowia, zawsze w sposób swoisty dla efektu behawioralnego [278].

Istnieją dwie hipotezy dotyczące biologicznej funkcji produktu genu c-fos [254-256, 270, 531]: 1) białko c-Fos stanowi czynnik transkrypcyjny dla genów kodujących białka, które są aktywnie używane, a zatem „wyczerpywane” w okresie intensywnej aktywności neuronów (analiza i reakcja na nowe informacje wymaga m.in. intensywnej syntezy enzymów produkujących neurotransmitery, receptory itp. [245, 257]), 2) białko c-Fos jest czynnikiem transkrypcyjnym dla genów, które kodują białka zaangażowane w procesy plastyczności. Reasumując, można powiedzieć, że neurony wykazujące wzrost poziomu białka c-Fos są włączone w analizę nowej, specyficznej informacji i ponadto gotowe do zmian plastycznych [256, 278].

W komórkach nie pobudzonych ekspresja genu c-fos jest mała [234, 256]. Ulega on jednak gwałtownemu wzbudzeniu po zadziałaniu adekwatnego bodźca – najwyższy poziom c-fos mRNA obserwuje się po 30-60 min, białka c-Fos po 1-3 h [240, 256, 531, 552]. Aktywacja protoonkogenu c-fos to powszechnie stosowany wskaźnik aktywności neuronalnej, pozwalający śledzić procesy pobudzenia w obrębie układu nerwowego [205, 208, 222, 284, 461, 484, 501].

1.2 Ciało migdałowe

W świetle dotychczasowych badań wydaje się, że istotną rolę w ośrodkowej integracji reakcji stresowej odgrywa ciało migdałowe, opisane po raz pierwszy na początku XIX wieku przez Burdacha (cytowane za [489]). Występuje u wszystkich kręgowców [347]. Stanowi grupę jąder położoną w przednio-przyśrodkowej części płata skroniowego (ryc. 2). Połączenia ciała migdałowego zapewniają dopływ informacji czuciowych wszelkich modalności i umożliwiają oddziaływanie na system ruchowy, autonomiczny i hormonalny. Przy-Przypuszcza się, że za pośrednictwem ciała migdałowego doświadczenia sensoryczne zyskują określoną wartość emocjonalną.



Ryc. 2. Ciało migdałowe szczura – przekrój czołowy (fiolet krezylu; bregma – 2,52 mm). Skróty: BAOT – jądro łożyskowe dodatkowego pasma węchowego, BL – jądro podstawno-boczne, BM – jądro podstawno-przyśrodkowe, Ce – jądro środkowe, CoA – jądro korowe przednie, CoPL – jądro korowe tylne boczne, L – jądro boczne, Me – jądro przyśrodkowe, OT – pasmo wzrokowe, Pir – kora gruszkowata. Długość skali = 250 μ m

Fig. 2. Amygdaloid body of the rat – coronal section (cresyl violet; bregma – 2.52). Abbreviations: BAOT – bed nucleus of the accessory olfactory tract, BL – basolateral nucleus, BM – basomedial nucleus, Ce – central nucleus, CoA – anterior cortical nucleus, CoPL – posterolateral cortical nucleus, L – lateral nucleus, Me – medial nucleus, OT – optic tract, Pir – piriform cortex. Scale bar = 250 μ m

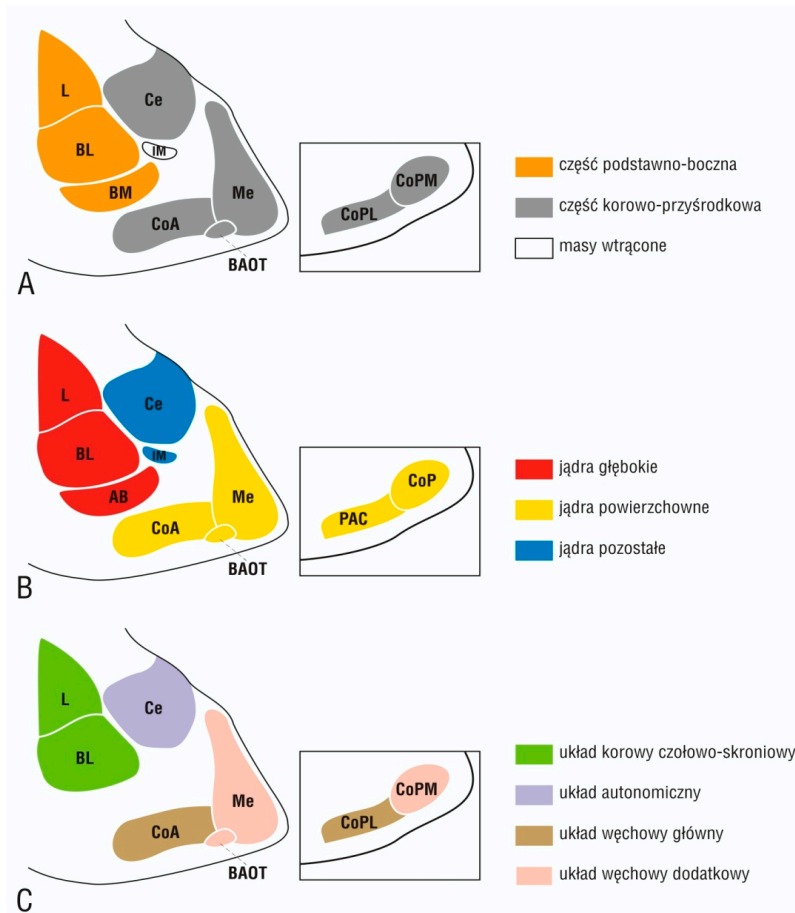
1.2.1 Podział ciała migdałowatego

Pomimo wielu lat badań nadal nie ma jednoznacznego, akceptowanego przez wszystkich badaczy podziału ciała migdałowatego. Spośród propozycji przedstawianych w literaturze dwa są najpowszechniej stosowane. Pierwszy z nich wprowadził Johnston w 1923 roku [249], a później zmodyfikowali go inni autorzy [108, 171, 201, 236]. Według powyższych badaczy w ciele migdałowatym wyróżnia się dwie główne części: korowo-przyśrodkową (filogenetycznie starszą) i podstawno-boczną (filogenetycznie młodszą; ryc. 3A). Główne obszary części korowo-przyśrodkowej to jądra: środkowe (Ce), przyśrodkowe (Me) i korowe. Na część podstawno-boczną składają się jądra: boczne (L), podstawno-boczne (BL) i podstawno-przyśrodkowe. Ponadto pomiędzy poszczególnymi jądrami ciała migdałowatego położone są tzw. masy wtrącone, zawierające skupiska neuronów hamujących, których głównym neuroprzekaźnikiem jest kwas γ -aminomasłowy (GABA; ryc. 3A).

Drugi stosunkowo często stosowany podział ciała migdałowatego, wprowadzony przez Price'a i wsp. [452], dzieli ciało migdałowate na trzy grupy jąder: (1) głębokie, (2) powierzchowne oraz (3) pozostałe (ryc. 3B). Do grupy jąder głębokich zaliczono jądra tworzące zespół podstawno-boczny (BLC); są to jądra: boczne, podstawno-boczne i podstawne dodatkowe. Jądra powierzchowne leżą na powierzchni półkuli i charakteryzują się warstwową budową. Zaliczono do nich jądra: bocznego i dodatkowego pasma węchowego (odpowiednio NLOT i BAOT), przyśrodkowe, korowe przednie (CoA), korowe tylne oraz korę okółmigdałową. Dwa ostatnie jądra, Paxinos i Watson [425] nazwali odpowiednio jądrem korowym tylnym przyśrodkowym (CoPM) i korowym tylnym bocznym (CoPL). Pozostałe jądra ciała migdałowatego to przede wszystkim jądro środkowe oraz masy wtrącone [10, 443, 452].

Nieco inną modyfikację podziału Price'a wprowadził McDonald [347], który w oparciu o dane rozwojowe i histologiczne wyróżnił część środkowo-przyśrodkową zawierającą Ce i Me, a Alhaied i wsp. [8] oraz Alhaied i Heimer [9], poszerzyli ją o jądro prążka krańcowego oraz tylny-grzbietowy obszar istoty bezmiennnej i wprowadzili termin „poszerzone ciało migdałowate” (*extended amygdala*).

W 1998 r. Swanson i Petrovich [565] poddali pod wątpliwość fakt łączenia jąder ciała migdałowatego w jedną strukturę. W oparciu o dane anatomiczne, elektrofizjologiczne i histochemiczne sugerują oni, że jądra: przyśrodkowe i środkowe stanowią tylny-brzusze przedłużenie prążkowie (projekcje z Me i Ce, podobnie jak te z prążkowie, są głównie GABAergiczne [563, 565]), natomiast pozostałe części ciała migdałowatego to w istocie obszar korowy (kora/przedmurze i kora węchowa), gdyż podobnie jak w korze neurony projekcyjne są tu glutaminergiczne, a GABA występuje w interneuronach [563, 565].



Ryc. 3. Porównanie podziałów ciała migdałowatego – schemat ogólny. **(A)** podział wprowadzony przez Johnstona, **(B)** podział wprowadzony przez Price'a i współpracowników, **(C)** podział czynnościowy wprowadzony przez Swanson i Petrovich. Skróty: AB – jądro podstawne dodatkowe, BAOT – jądro łożyskowe dodatkowego pasma węchowego, BL – jądro podstawno-boczne, BM – jądro podstawno-przyśrodkowe, Ce – jądro środkowe, CoA – jądro korowe przednie, CoP – jądro korowe tylne, CoPL – jądro korowe tylne boczne, CoPM – jądro korowe tylne przyśrodkowe, IM – masy wtrącone, L – jądro boczne, Me – jądro przyśrodkowe, PAC – kora około migdałowa

Fig. 3. Comparison of the subdivisions of the amygdaloid body – general scheme. **(A)** subdivision initiated by Johnston, **(B)** subdivision initiated by Price and colleagues, **(C)** functional partition made by Swanson and Petrovich. Abbreviations: AB – accessory basal nucleus, BAOT – bed nucleus of the accessory olfactory tract, BL – basolateral nucleus, BM – basomedial nucleus, Ce – central nucleus, CoA – anterior cortical nucleus, CoP – posterior cortical nucleus, CoPL – posterolateral cortical nucleus, CoPM – posteromedial cortical nucleus, IM – intercalated nucleus, L – lateral nucleus, Me – medial nucleus, PAC – periamygdaloid cortex

Powyżsi autorzy [565] uważają, że jądra ciała migdałowatego należą do czterech odrębnych układów czynnościowych (ryc. 3C). Jądra, które otrzymują zasadnicze projekcje z głównej opuszki węchowej (NLOT, CoA, CoPL), należą do układu węchowego głównego. Me, CoPM i BAOT stanowią główne miejsce docelowe projekcji z dodatkowej opuszki węchowej (związanej z układem feromonalnym) i należą do układu węchowego dodatkowego. Ce, wysyłające liczne połączenia do struktur włączonych w kontrolę układu autonomicznego należy do układu autonomicznego, natomiast L i BL, ściśle związane z korą płata czołowego i skroniowego współtworzą układ korowy czołowo-skroniowy (ryc. 3C).

1.2.2 Połączenia ciała migdałowatego

Ciało migdałowate posiada bogate połączenia z licznymi strukturami mózgowia. Topografia tych połączeń jest zbliżona u różnych gatunków zwierząt (szczur, kot, małpa) [347].

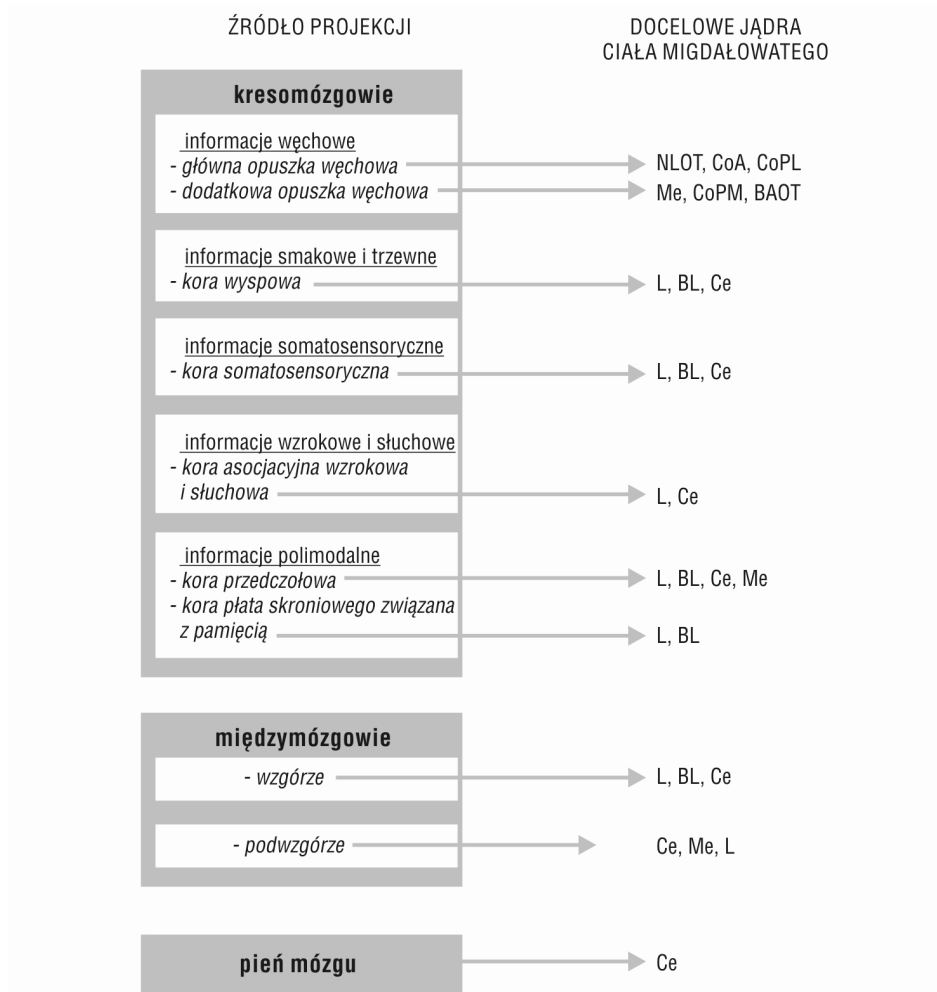
Główne połączenia aferentne (ryc. 4)

Poszczególne jądra ciała migdałowatego otrzymują połączenia z wielu rejonów mózgowia. Można je podzielić na projekcje z kory mózgu i wzgórza (obszary czuciowe i związane z pamięcią) oraz projekcje z podwzgórza i pnia (obszary włączone w układy: autonomiczny, behawioralny i hormonalny) [489].

Projekcje czuciowe dochodzące do ciała migdałowatego zaczynają się w polach projekcyjnych i asocjacyjnych kory mózgu oraz we wzgórzu i jądrze przyramiennym, a co za tym idzie ciało migdałowate otrzymuje informacje czuciowe o określonej modalności (węchowe, smakowe i trzewne, somatosensoryczne, słuchowe, wzrokowe) oraz informacje wielomodalne.

Informacje węchowe dochodzą do ciała migdałowatego ze rejonów mózgowia związanych z percepcją węchu: z głównej opuszki węchowej do NLOT, CoA, CoPL, z dodatkowej opuszki węchowej do BAOT, Me, CoPM [77, 508], z kory gruszkowatej do zespołu podstawno-bocznego [321]. Ponadto jądra korowe oraz jądro przyśrodkowe otrzymują połączenia z jądra śródgruszkowatego [30].

Informacje smakowe i trzewne z kory wyspowej [535] i wzgórza [401] dochodzą do jąder: bocznego, podstawno-bocznego oraz środkowego. Ce otrzymuje również informacje z jądra przyramiennego [37].



Ryc. 4. Główne połączenia aferentne ciała migdałowatego – schemat. Skróty: BAOT – jądro łożyskowe dodatkowego pasma węchowego, BL – jądro podstawno-boczne, Ce – jądro środkowe, CoA – jądro korowe przednie, CoPL – jądro korowe tylne boczne, CoPM – jądro korowe tylne przyśrodkowe, L – jądro boczne, Me – jądro przyśrodkowe, NLOT – jądro bocznego pasma węchowego

Fig. 4. Main afferent connections of the amygdaloid body – scheme. Abbreviations: BAOT – bed nucleus of the accessory olfactory tract, BL – basolateral nucleus, Ce – central nucleus, CoA – anterior cortical nucleus, CoPL – posterolateral cortical nucleus, CoPM – posteromedial cortical nucleus, L – lateral nucleus, Me – medial nucleus, NLOT – nucleus of the lateral olfactory tract

Większość informacji somatosensorycznych z kory dociera do ciała migdałowatego poprzez korę wyspową [534]. Połączenia te dochodzą głównie do L, BL i Ce [360, 534, 535]. Ciało migdałowate odbiera również informacje somatosensoryczne ze wzgórza i jądra przyramiennego [38, 48, 305].

Źródłem informacji wzrokowych i słuchowych są odpowiednio: asocjacyjna kora wzrokowa i słuchowa oraz wzgórze. Dochodzą one do jąder: bocznego i środkowego [300, 301, 303, 440, 535].

Informacje polimodalne docierają do ciała migdałowatego z kory przedczołowej oraz obszarów płata skroniowego związanych z pamięcią (kora śródwęchowa, kora okołowęchowa, zespół hipokampa). Kora przedczołowa, miejsce konwergencji informacji różnej modalności [466], wysyła liczne połączenia głównie do jądra podstawno-bocznego, ale również do L, Ce i Me [64, 364, 414]. Wśród wyżej wymienionych rejonów kory mózgu związanych z pamięcią, hipokamp wysyła projekcje głównie do BL [80, 442], kora okołowęchowa głównie do L [533], natomiast projekcje z kory śródwęchowej dochodzą do większości jąder ciała migdałowatego [363].

Główne jądra docelowe projekcji z podwzgórza to Ce i Me [78, 79, 290, 415, 440, 471], natomiast z pnia mózgowia to Ce [435].

Główne połączenia eferentne (ryc. 5)

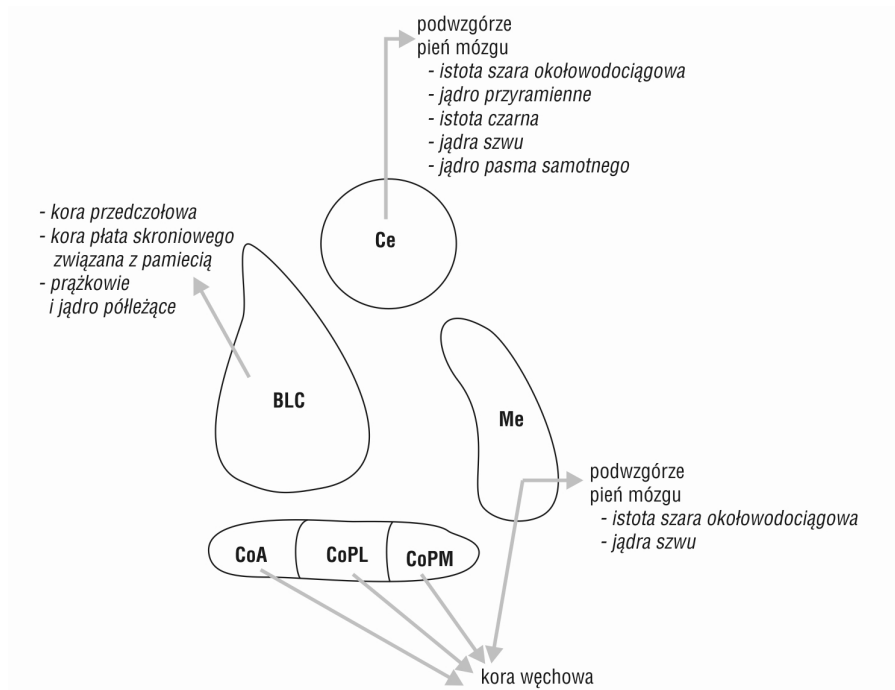
Ciało migdałowate wysyła połączenia głównie do podwzgórza i pnia mózgowia oraz kory mózgu. Część z tych projekcji przechodzi przez jądro prążka kręcowego [136, 142, 289, 440, 530].

Jądra powierzchniowe ciała migdałowatego wysyłają projekcje zwrotne do obszarów kory, z których otrzymują informacje węchowe [77, 269, 440, 489]. Stosunkowo nieliczne projekcje do pozostałych obszarów kory czuciowej wychodzą z jąder korowych i zespołu podstawno-bocznego, natomiast do kory przedczołowej z BLC oraz CoPL [435, 440].

Zespół podstawno-boczny, jest głównym źródłem projekcji do obszarów korowych płata skroniowego związanych z pamięcią [414, 428, 435, 440] oraz do prążkowania i jądra półleżącego [351, 440].

Jądro środkowe jest podstawowym źródłem projekcji bezpośrednich lub pośrednich (poprzez BST [142, 429, 440] i podwzgórze [304, 428, 564]), do struktur pnia mózgowia [594], które wpływają na działanie autonomicznego układu nerwowego. Główne miejsca docelowe projekcji z Ce do pnia to istota szara okołowodociągowa (PAG) [31, 474], jądro przyramienne [184, 388, 429], jądro pasma samotnego [490, 591]. Jądro środkowe wysyła również liczne projekcje do wielu okolic podwzgórza [289, 440, 451] oraz do struktur związanych z układami monoaminoergicznymi i cholinergicznym (istota czarna, miejsce sinawe, jądra szwu, jądro podstawne Meynerta) [10, 117, 289, 440, 452].

Liczne projekcje do podwzgórza wysyła również jądro przyśrodkowe [36, 77, 106, 193, 268, 289, 440, 540, 541]. Ponadto Me łączy się z przegrodą i hipokampem [72].



Ryc. 5. Główne połączenia eferentne ciała migdałowatego – schemat. Skróty: BLC – zespół podstawno-boczny, Ce – jądro środkowe, CoA – jądro korowe przednie, CoPL – jądro korowe tylne boczne, CoPM – jądro korowe tylne przyśrodkowe, Me – jądro przyśrodkowe

Fig. 5. Main efferent connections of the amygdaloid body – scheme. Abbreviations: BLC – basolateral complex, Ce – central nucleus, CoA – anterior cortical nucleus, CoPL – posterolateral cortical nucleus, CoPM – posteromedial cortical nucleus, Me – medial nucleus

Połączenia wewnątrzamygdalarne

Wewnątrz i pomiędzy jądrami ciała migdałowatego istnieje złożony system wzajemnych połączeń [250, 440, 443, 444, 544]. Połączenia wewnątrzamygdalarne stanowią drogi, dzięki którym dochodzi do kojarzenia i scalania informacji napływających do konkretnych jąder z różnych układów funkcjonalnych mózgu [445]. Większość tych połączeń jest wzajemna, co umożliwia tworzenie pętli, przez które neurony docelowe mogą zwrótnie wpływać na aktywność obszarów,

które je unerwiają [445]. Wyjątek stanowi tu jądro środkowe, które otrzymuje informacje z różnych obszarów ciała migdałowatego, ale samo nie wysyła do nich projekcji zwrotnych. Jądra środkowe i przyśrodkowe uważane są za główne miejsca „wyjścia” informacji z ciała migdałowatego [115, 298, 440, 443, 445].

Reasumując, połączenia ciała migdałowatego zapewniają mu m.in. możliwość kontroli/modulacji reakcji stresowej – otrzymuje informację czuciowe wszelkich modalności oraz może oddziaływać na układy: ruchowy, autonomiczny i hormonalny, a przez to wpływać na kształtowanie reakcji behawioralnej organizmu.

1.2.3 Charakterystyka immunocytochemiczna ciała migdałowatego

Ciało migdałowe charakteryzuje się dużym zróżnicowaniem immunocytochemicznym populacji komórkowych tworzących poszczególne jądra. Podstawowymi neurotransmiterami komórek projekcyjnych są: glutaminian (Glu) w zespole podstawno-bocznym oraz glutaminian i kwas γ -aminomasłowy w części środkowo-przyśrodkowej (Ce, Me) [97, 116, 349, 357, 456, 490, 562, 565]. Interneurony zespołu podstawno-bocznego są hamujące, GABAergiczne [265, 357, 358, 422, 436, 489]. Dane na temat klasycznych neuroprzekaźników pozostałych części ciała migdałowatego są nieliczne. Morfologicznie, neurony jąder korowych przypominają komórki zespołu podstawno-bocznego [346, 355]; neurony GABAergiczne jąder korowych odpowiadają neuronom wstawkowym [357].

W ciele migdałowatym różnych gatunków ssaków wykazano ponadto obecność wielu neuropeptydów/neuromodulatorów, w tym substancji P, wazoaktywnego peptydu jelitowego (VIP), neuropeptydu Y, somatostatyny (SOM), enkefaliny, cholecystokininy (CCK), angiotensyny [84, 313, 326, 339, 352, 354, 361, 379, 475, 539, 541] oraz hormonu uwalniającego hormon kortykotropowy [282, 491, 568] i wazopresyny [71, 584].

Istotną rolę w funkcjonowaniu ciała migdałowatego odgrywają liczne i zróżnicowane neurony zawierające białka wiążące wapń oraz komórki produkujące tlenek azotu.

Białka wiążące wapń

Jony wapnia (Ca^{2+}) odgrywają ważną rolę w funkcjonowaniu neuronów, włączając w to uwalnianie neurotransmiterów, pobudzenie błony komórkowej, indukcję genów, wzrost, regulację plastyczności neuronalnej oraz procesy komórkowe związane z uczeniem się i zapamiętywaniem [16, 17, 25, 87, 93, 178,

227, 391, 511, 522, 610]. Poziom jonów wapnia w komórce podlega stałej kontroli, w którą zaangażowane są wewnątrzkomórkowe białka wiążące wapń (CaBPs), w tym najbardziej swoiste dla ośrodkowego układu nerwowego (OUN): kalretynina (CR), kalbindyna D-28k (CB) i parwalbumina (PV) [16, 25, 86-89, 130, 382]. Neurony zawierające powyższe białka występują w różnych rejonach mózgowia; tworząc częściowo kolokalizujące lub niewykazujące wzajemnych kolokalizacji populacje komórkowe [25, 227, 265, 285, 348, 359, 420, 437, 438, 464, 614].

Kalretynina jest białkiem, które, spośród wyżej wymienionych pojawia się najwcześniej (ok. 14-16 dnia życia płodowego szczura) [227, 582]. Uważa się, że jest zaangażowana w podziały komórkowe, migrację, rozwój aksonów i drzewa dendrytyczne oraz synaptogenezę [16, 172, 510, 528]. Występuje zarówno w interneuronach jak i komórkach projekcyjnych [134, 265, 293, 362, 376, 380, 395, 624].

Kalbindyna D-28k, budową bardzo zbliżona do kalretyniny [418], podobnie jak ona pojawia się w już w okresie prenatalnym [154, 626] (ok. dwa dni po zakończeniu podziałów mitotycznych [154]). W okresie rozwoju i dojrzewania odgrywa rolę we wzroście aksonów i dendrytów oraz pośrednio w synaptogenezie [7, 385, 467]. Występuje zarówno w interneuronach jak i komórkach projekcyjnych [86, 93, 134, 390, 578, 624].

Parwalbumina pojawia się w rozwoju postnatalnym (ok. drugiego tygodnia życia) [7, 34, 35, 132, 512], w okresie, który odpowiada osiągnięciu dojrzałości czynnościowej komórek nerwowych [6, 7, 113, 132, 216, 387, 407]. Wpływa na dojrzewanie i funkcjonowanie neuronalnej sieci hamującej [35, 407].

Nadmiar jonów wapnia jest dla komórki toksyczny. Wydaje się, że białka wiążące wapń, w związku z ich zdolnością buforowania jonów Ca^{2+} , mogą spełniać rolę neuroprotekcyjną w przebiegu różnych stanów patologicznych. Dane na ten temat są jednak sprzeczne [16, 50, 139, 175, 215, 238, 242, 259, 273, 275, 549, 601].

Syntaza tlenu azotu

Tlenek azotu (NO), niekonwencjonalny neurotransmitter/neuromodulator, mając zdolność szybkiej dyfuzji, przenika do sąsiednich komórek, gdzie może aktywować różne szlaki sygnałowe [59, 61, 181, 449, 627]. Bezpośrednim skutkiem działania NO jest pobudzenie cykazy guanylowej i wzrost poziomu cyklicznego guanozynomonofosforanu (cGMP) [228, 449, 596]. W zależności od stężenia i stanu metabolicznego, NO pełni funkcje fizjologiczne i neuroprotektoryjne lub działa neurotoksycznie [119, 120, 315, 316, 547, 627]. Wśród wielu funkcji pełnionych przez tlenek azotu w ośrodkowym układzie nerwowym, jako zasadnicze wymienia się wpływ na uwalnianie neurotransmiterów, procesy długotrwałego wzmocnienia i hamowania synaptycznego oraz plastyczność synaptyczną [449, 519, 524, 571, 603, 606]). NO odgrywa rolę w procesach związanych z pamięcią, koordynacją ruchową, snem, bólem, zachowaniami seksual-

nyimi [103, 204, 230, 402, 606] i stresem [4, 12, 128, 129, 150, 210, 292, 402, 472, 473, 623].

Tlenek azotu jest wytwarzany przez syntazę tlenu azotu (NOS), która w ośrodkowym układzie nerwowym występuje w trzech izoformach: neuronalnej (nNOS; konstytutywna; występuje w neuronach i odpowiada za neurotransmisję), śródbłonkowej (eNOS; konstytutywna; występuje głównie w śródbłonku naczyń) oraz indukcyjnej (iNOS; indukowana; typowa dla makrofagów) [118, 295, 513]. Synteza NO w neuronach jest stymulowana przez napływ jonów Ca^{2+} , który z kolei jest indukowany przez aktywację receptorów glutaminergicznych, przede wszystkim receptorów NMDA [182, 183].

Neurony produkujące tlenek azotu występują w różnych rejonach mózgowia [41, 74, 185, 286, 288, 296, 365, 439, 585, 598, 615]. Pojawiają się w okresie prenatalnym (u szczura: w E10 – ekspresja NOS mRNA [262], w E15 – pierwsze neurony nNOS-ir w podwzgórzu i moście [573], a w E19 w korze mózgu [495]). Ich rozwój charakteryzuje zmienna dynamika [487], np. wysoka ekspresja nNOS w płycie korowej obserwowana w rozwoju płodowym, w korze dorosłego szczura ogranicza się głównie do określonych subpopulacji interneuronów [57, 58]. Zmiany ekspresji NOS w rozwoju są skorelowane z procesami neurogenezy, różnicowania, wytwarzania połączeń i synaptogenezy [94, 96, 105, 188, 408, 432].

Biorąc pod uwagę istotną rolę tlenu azotu i jonów wapnia w procesach związanych z przekazywaniem neuronalnym, plastycznością synaptyczną i pamięcią wydaje się, że komórki ciała migdałowatego zawierające białka wiążące wapń oraz neurony produkujące tlenek azotu mogą odrywać ważną rolę w kontroli/modulacji reakcji stresowej. Wiedza na ten temat wciąż jednak wymaga uzupełnienia.

1.2.4 Zasadnicze znaczenie czynnościowe ciała migdałowatego

Od ponad stu lat wiadomo, że płat skroniowy, w tym ciało migdałowate są włączone w kształtowanie emocji. Klüver i Bucy [277], opisali następstwa usunięcia dolnej części płata skroniowego – badane małpy nie odczuwały złości i strachu oraz cechowały się: zmniejszoną aktywnością eksploracyjną, hiperoralnością, hiperseksualnością, utratą funkcji socjalnych (zespół Klüver-Bucy’ego). Izolowane usunięcie ciała migdałowatego u zwierząt wywołuje wiele z powyższych objawów (zanik złości i strachu, obniżenie aktywności eksploracyjnej, hiperoralność) [191, 605, 630]. Usunięcie ciała migdałowatego u człowieka skutkuje pełnym rozwinięciem zespołu Klüver-Bucy’ego, co wiąże się z deficytami emocjonalnymi [2, 3]. Izolowane, obustronne zniszczenie ciała migdałowatego u ludzi jest niezwykle rzadkie, więc z konieczności badania przeprowadza się na zwierzętach, które nie potrafią powiedzieć „co czują”. Wobec powyższe-

go wnioski na temat roli ciała migdałowego w kształtowaniu emocji opiera się głównie na badaniach strachu [297], o którym wiadomo, że wiąże się z określonymi reakcjami ze strony układów autonomicznego, hormonalnego i somatycznego [66, 298, 328]. Elektryczna stymulacja ciała migdałowego wywołuje reakcje lękowe u ludzi i zwierząt [92, 191, 253]. Ciało migdałowe „opracowuje” przede wszystkim informacje o bodźcach zagrażających, dwuznacznych.

Badania stymulacyjne i zwyrodnieniowe wykazały, że ciało migdałowe jest włączone w układy sterujące zachowaniami motywacyjnymi i popędami, włączając w to zachowania obronne [42, 138, 202, 570], głód i pragnienie [81, 478], zachowania reprodukcyjne i związane z opieką nad potomstwem [97, 186, 280, 431], modulację bólu [604] oraz gatunkowo-specyficzne zachowania społeczne [63, 252, 280]. U człowieka zachowania te są zwykle związane z odczuwaniem emocji (np. strach towarzyszy ucieczce, gniew atakowi i zachowaniom ofensywnym).

Ciało migdałowe bierze udział w określaniu znaczenia aktualnych bodźców. Jest włączone w nadawanie emocjonalnego aspektu zdarzeniom o dużym znaczeniu motywacyjnym (tworzenie asocjacji pomiędzy bodźcem a jego aktualną wartością motywacyjną) [278, 397, 404, 405, 423].

Wielu autorów sugeruje udział ciała migdałowego w nabywaniu umiejętności (wyuczeniu) wykonywania zadań behawioralnych, konsolidacji/modulacji pamięci, jak również jej wygaszaniu [159, 267, 278, 279, 369, 370, 417, 477, 502].

Zdaniem LeDoux [297] ciało migdałowe jest włączone w tworzenie ukrytej (niedeklaratywnej) pamięci o sytuacjach niebezpiecznych i zagrażających. Pamięć tego typu, zwana pamięcią emocjonalną, tworzy się poprzez mechanizmy warunkowania strachu (awersyjny bodziec jest kojarzony z bodźcem obojętnym – powstawanie „kojarzeniowej” pamięci emocjonalnej) [14, 299, 304, 329, 331, 399, 509]. Warunkowanie strachu jest procesem nieświadomym w tym znaczeniu, że uczenie się nie zależy od naszej świadomości (nie mamy wpływu na to czy do niego dojdzie, ani świadomego dostępu do jego przebiegu) [297]. Pamięć emocjonalna, w przeciwieństwie do deklaratywnej (związanej głównie z hipokampem) nie ulega wymazaniu. Pytanie czy ciało migdałowe spełnia w tym procesie rolę kluczową czy raczej modulującą nadal pozostaje otwarte. Szerszej analizy wymaga też rola procesów warunkowania strachu w rozwoju, szczególnie w kontekście rozwoju emocjonalnego i socjalnego. Pamięć emocjonalna jest związana z obserwowanym w ciele migdałowatym długotrwałym wzmocnieniem synaptycznym (LTP) [91, 115, 336, 538, 603]. Ciało migdałowe bierze również udział w warunkowaniu apetytywnym [158, 179].

Ciało migdałowe jest miejscem specyficznych zmian plastycznych związanych z różnorodnymi emocjonalnymi aspektami zachowania. Cechuje się funkcjonalną heterogenicznością: plastyczność w zespole podstawno-bocznym ma na celu asocjacje: bieżący bodziec – jego znaczenie, przyśrodkowa część jądra środkowego jest włączona w procesy pamięciowe związane z pobieraniem

pokarmu (*alimentary learning*), boczna część jądra środkowego odgrywa rolę w procesach związanych z uwagą i czujnością, natomiast jądro przyśrodkowe jest włączone w opracowanie/przechowywanie informacji o nowych, emocjonalnych aspektach środowiska zewnętrznego [278].

Ciało migdałowe jest włączone patomechanizm wielu chorób neurologicznych i psychicznych takich jak choroba Alzheimera [53, 54, 515, 583], płasawica Huntingtona [324, 482, 629], padaczka skroniowa [162, 233, 445, 616], schizofrenia [43, 44, 532], choroba dwubiegunowa [206] czy autyzm [11, 27].

Podsumowując, należy zaznaczyć, że kluczowa rola ciała migdałowatego w ośrodkowej kontroli emocji jest powszechnie uznawana, ale mechanizmy jego działania, szczególnie w kontekście rozwoju i starzenia oraz zróżnicowania czynnościowego jego jąder wciąż pozostawiają wiele pytań.

2 CELE PRACY

W świetle dotychczasowych badań wydaje się, że istotną rolę w ośrodkowej integracji reakcji stresowej odgrywa ciało migdałowe. Połączenia ciała migdałowego umożliwiają z jednej strony dopływ informacji czuciowych wszelkich modalności, z drugiej zaś strony zapewniają oddziaływanie na system ruchowy, autonomiczny i hormonalny. O ile fakt kluczowej roli ciała migdałowego jako struktury związanej z ośrodkową kontrolą emocji jest powszechnie uznawany, to mechanizmy jego działania, szczególnie w kontekście rozwoju i starzenia oraz zróżnicowania czynnościowego jego jąder wciąż pozostawiają wiele pytań. Słabo poznana jest też natura immunocytochemiczna komórek ciała migdałowego zaangażowanych w odpowiedź na dany bodziec awersyjny.

W ciele migdałowatym licznie występują neurony zawierających białka wiążące wapń oraz komórki produkujące tlenek azotu. W kontekście funkcji jakie CaBPs i NO pełnią w ośrodkowym układzie nerwowym, wydaje się prawdopodobne, że mogą one odgrywać istotną rolę również w odpowiedzi na bodźce awersyjne. Komórki zawierające kalretyninę, kalbindynę, parwalbuminę oraz neurony produkujące NO opisano w ciele migdałowatym dojrzałych osobników wielu gatunków zwierząt i człowieka. Jednak dane dotyczące rozwoju, dojrzewania i starzenia są nadal jedynie fragmentaryczne i zazwyczaj ograniczone do zespołu podstawno-bocznego.

W związku z powyższym celem pracy była:

1. Ogólna charakterystyka występowania i morfologii komórek zawierających kalretyninę, kalbindynę D-28k, parwalbuminę i syntazę tlenu azotu w jądrach ciała migdałowego w rozwoju postnatalnym, dojrzewaniu i starzeniu mózgowia szczura.
2. Charakterystyka aktywacji ciała migdałowego w reakcji na działanie awersyjnego bodźca psychologicznego (test otwartego pola), w rozwoju postnatalnym, dojrzewaniu i starzeniu mózgowia szczura, w tym odpowiedź na pytania:
 - Czy aktywacja jąder ciała migdałowego wykazuje zależną od wieku dynamikę?
 - Czy jądra ciała migdałowego różnią się pod względem aktywacji w odpowiedzi na zastosowany bodziec?
 - Czy neurony jąder ciała migdałowego zawierające kalretyninę, kalbindynę D-28k, parwalbuminę oraz syntazę tlenu azotu są aktywowane po teście otwartego pola oraz jaki jest schemat tej aktywacji?

3 MATERIAŁ I METODY

3.1 Materiał

Badania przeprowadzono na 123 samcach szczurów rasy Wistar pochodzących z hodowli Instytutu Medycyny Pracy w Łodzi. Podzielono je na dwie grupy. Grupa eksperymentalna obejmowała zwierzęta, które zostały poddane jednorazowej ekspozycji na bodziec awersyjny. Były to szczury w wieku (P–dzień życia po urodzeniu): P0, P4, P7, P14, P21 – po 5 zwierząt w grupie, oraz szczury w wieku – P90, P270, P360, P720 – po 3 zwierzęta w grupie.

Grupę kontrolną stanowiły zwierzęta należące do tych samych grup wiekowych (P0, P4, P7, P14, P21 – po 10 zwierząt) oraz P90, P270, P360, P720 – po 6 zwierząt w grupie, które nie poddano ekspozycji na bodziec awersyjny. Dla oceny efektu stresu związanego z odstawieniem najmłodszych zwierząt od matek, dodatkową grupę kontrolną, stanowiły szczury w wieku P0-P14 – po 3 zwierzęta w grupie, odstawiane od matki, ale nie poddane działaniu bodźca awersyjnego.

Zastosowana procedura postępowania ze zwierzętami była zgodna z zaleceniami Międzynarodowej Rady do Spraw Wiedzy o Zwierzętach Laboratoryjnych (ICLAS) z 1974 roku oraz z zaleceniami Rady Europy nr 123 z 1986 roku [69]. Ponadto projekt badań uzyskał akceptację lokalnej Komisji do Spraw Etyki.

3.2 Metody

3.2.1 Test otwartego pola

Jako awersyjny bodziec psychologiczny zastosowano test otwartego pola z silnym oświetleniem. Szczury grupy eksperymentalnej umieszczano na 10 minut w kwadratowym boksie o gładkich, białych ścianach i białej podłodze o wymiarach 1m x 1m, który był oświetlony żarówką o mocy 500 W, po czym odstawiano je do klatek domowych (*home cage*). Aby zmniejszyć stres wywołany izolacją od grupy, szczury w wieku P0, P4, P7, P14 były testowane w małych grupach (3-5 zwierząt) [612]. Po godzinie od zakończenia ekspozycji szczury uśmiercano letalną dawką środka usypiającego, a mózgowia utrwalano drogą perfuzji przezsercowej.

Zwierzęta grup kontrolnych wyjmowano z klatek „domowych” bezpośrednio przed uśmierceniem, lub – dla oceny wpływu separacji od matki – zabierano od niej, przekładano do osobnej klatki, po 10 minutach oddawano z powrotem i po godzinie uśmiercano.

Doświadczenia wykonywano o stałej porze dnia (godz. 10-14). Po każdej ekspozycji boks był myty i przecierany 70% etanolem.

3.2.2 Procedura utrwalenia materiału

Zwierzętom podawano dootrzewnowo letalną dawkę Nembutalu (60 mg/kg wagi ciała) i po otwarciu klatki piersiowej wykonywano perfuzję przezsercową. Podawano 0,9% roztwór NaCl (10-100 ml) z dodatkiem 8000 j.m. heparyny, a następnie 4% roztwór paraformaldehydu w buforze fosforanowym o pH 7,4 w ilości: 25 ml (grupy P0, P4), 45 ml (grupy P7, P14) i 250 ml (wszystkie pozostałe grupy). Po dekapitacji i otwarciu czaszki, mózgowia wyjmowano i dotrwalano w płynie perfuzyjnym przez 2-3 godziny, a następnie odwadniano kolejno w 15% i 30% roztworze sacharozy w 0,1 M roztworze buforu fosforanowego (PBS) o pH 7,4 przez 1-3 dni. Utrwalone mózgowia zamrażano w kriostacie Jung CM 1800 (Reichert-Jung, Niemcy), a następnie krojono w płaszczyźnie czołowej na skrawki o grubości 30 μ m.

3.2.3 Metody immunocytochemiczne

Uzyskane mrożeniowe skrawki barwiono immunocytochemicznie przy użyciu przeciwciał skierowanych przeciwko:

- kalretyninie, kalbindynie D-28k i parwalbuminie – białka wiążące wapń
- neuronalnej formie syntazy tlenku azotu – marker komórek wytwarzających NO
- białku c-Fos (produkt protoonkogenu c-fos) – marker aktywności neuronów

W celu wyznakowania subpopulacji neuronów ciała migdałowatego zawierających białka wiążące wapń: CR, CB, PV oraz neuronów zawierających NOS, skrawki mrożeniowe uzyskane z mózgowi zwierząt grupy kontrolnej (P0, P4, P7, P14, P21 – po 5 zwierząt, P90, P270, P360, P720 – po 3 zwierzęta), poddano badaniom immunocytochemicznych z zastosowaniem poniższego protokołu pojedynczego barwienia skrawków wolnopływających.

Skrawki trzykrotnie płukano w 0,01 M roztworze PBS (pH 7,4), każdorazowo przez 15 min. W celu zablokowania niespecyficznych antygenów skrawki poddawano działaniu 3% roztworu surowicy koziej (NGS) bądź 3% roztworu surowicy oślej (NDS) z dodatkiem 0,3% roztworu Tritonu X-100 w 0,01 M roztworze PBS przez 60 min. Następnie preparaty inkubowano w temperaturze 4°C w roztworze zawierającym odpowiednie przeciwciało pierwotne (tab. 1) oraz 3% roztwór NGS (bądź NDS) z dodatkiem 0,1% roztworu Tritonu X-100 w PBS. Po 72 godzinach inkubacji preparaty trzykrotnie płukano w 0,01 M roztworze PBS (pH 7,4) i poddawano inkubacji w roztworze zawierającym odpowiednie przeciwciała wtórne związane ze znacznikiem fluorescencyjnym (tab. 1) przez okres 2 godzin w temperaturze pokojowej. Po wypłukaniu w 0,01 M roztworze PBS, skrawki umieszczano na szkiełkach podstawowych, suszono, zatapiano w Vectasheld (Vector Laboratories, Inc., USA) i pokrywano szkiełkami nakrywkowymi.

Dobór surowicy odbywał się zgodnie z zasadą, że surowica pochodzi od tego samego gatunku, co gospodarz przeciwciała wtórnego zastosowanego w danym doświadczeniu (np. przy użyciu przeciwciała wtórnego immunizowanego na ośle, używa się normalnej surowicy osłej).

W celu oszacowania podwójnego występowania białka c-Fos oraz odpowiednio CR, CB, PV oraz NOS w komórkach ciała migdałowatego, u zwierząt grupy eksperymentalnej i pozostałych zwierząt grup kontrolnych zastosowano poniższą procedurę podwójnego barwienia skrawków wolnopływających.

Skrawki trzykrotnie płukano w 0,01 M roztworze PBS (pH 7,4) każdorazowo przez 15 min, po czym poddawano je działaniu 3% roztworu surowicy koziej bądź 3% roztworu surowicy osłej z dodatkiem 0,3% roztworu Tritonu X-100 w 0,01 M roztworze PBS przez 60 min. Następnie preparaty inkubowano w temperaturze 4°C, w roztworze zawierającym mieszaninę odpowiednich przeciwciał pierwotnych (tab. 1) oraz 3% roztwór NGS (bądź NDS) z dodatkiem 0,1% roztworu Tritonu X-100 w PBS. Po 72 godzinach inkubacji preparaty trzykrotnie płukano w 0,01 M roztworze PBS (pH 7,4) i poddawano inkubacji w roztworze zawierającym mieszaninę odpowiednich przeciwciał wtórnych związanych z różnymi znacznikami fluorescencyjnymi (tab. 1), przez okres 2 godzin w temperaturze pokojowej. Po wypłukaniu w 0,01 M roztworze PBS, skrawki umieszczano na szkiełkach podstawowych, suszono, zatapiano w Vectasheld (Vector Laboratories, Inc., USA) i pokrywano szkiełkami nakrywkowymi.

Dobór przeciwciał pierwotnych użytych w podwójnym barwieniu odbywał się zgodnie z zasadą, że muszą one pochodzić od innego gospodarza, podczas gdy oba przeciwciała wtórne muszą pochodzić od tego samego gospodarza, ale każde z przeciwciał musi być wyznakowane innym znacznikiem fluorescencyjnym. Dobór surowicy odbywał się zgodnie z zasadą, że surowica pochodzi od tego samego gatunku, co gospodarz przeciwciał wtórnych zastosowanych w danym doświadczeniu

Kontrola swoistości reakcji

Aby sprawdzić swoistość reakcji immunocytochemicznej, skrawki kontrolne poddawano powyższym procedurom barwienia, z pominięciem inkubacji z pierwotnym bądź wtórnym przeciwciałem. W przypadku barwień podwójnych, w celu wykluczenia reakcji krzyżowej pomiędzy użytymi przeciwciałami pierwotnymi, a nieodpowiadającymi im przeciwciałami wtórnymi, pomijano jedno z przeciwciał pierwotnych. Wszystkie próby potwierdziły swoistość reakcji immunocytochemicznych.

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

Nazwa przeciwciała	Numer katalogowy	Producent	Rozcieńczenie
Przeciwciała pierwotne			
Goat Polyclonal Anti-Calretinin Antibody	AB 1550	Chemicon	1:2500
Mouse Monoclonal Anti-Calbindin D28k Antibody	C-8666	Sigma	1:200
Mouse Monoclonal Anti-Parvalbumin Antibody	P-3171	Sigma	1:1000
Mouse Monoclonal Anti-Nitric Oxide Synthase-Brain Antibody	N2280	Sigma	1:3000
Rabbit Polyclonal Anti-c-Fos Protein Antibody	sc-7202	Santa Cruz Biotechnology	1:500
Przeciwciała wtórne			
Cy3-conjugated Goat anti-Rabbit Antibody	111-165-144	Jackson ImmunoResearch	1:800
Cy3-conjugated Goat anti-Mouse Antibody	115-165-146	Jackson ImmunoResearch	1:800
Cy3-conjugated Donkey anti-Goat Antibody	705-165-003	Jackson ImmunoResearch	1:800
Fluorescein (FITC)-conjugated Donkey anti-Mouse Antibody	715-095-151	Jackson ImmunoResearch	1:100
Fluorescein (FITC)-conjugated Donkey anti-Rabbit Antibody	711-095-152	Jackson ImmunoResearch	1:100
Fluorescein (FITC)-conjugated Donkey anti-Goat Antibody	705-096-147	Jackson ImmunoResearch	1:100
Fluorescein (FITC)-conjugated Goat anti-Mouse Antibody	115-095-146	Jackson ImmunoResearch	1:50
Fluorescein (FITC)-conjugated Goat anti-Rabbit Antibody	F-9262	Sigma	1:50

3.2.4 Badania jakościowe, półilościowe i ilościowe

Analizowano następujące jądra ciała migdałowatego szczura: jądro boczne, jądro podstawno-boczne, jądro środkowe, część brzuszną i grzbietową jądra przyśrodkowego (odpowiednio – MeV i MeD), jądro łożyskowe dodatkowego pasma węchowego, jądro korowe przednie, jądro korowe tylne boczne oraz jądro korowe tylne przyśrodkowe. Ich granice wyznaczano w oparciu o atlasy Paxinos i Watson [425] oraz Paxinos i wsp. [424] (ryc. 6).

Badania jakościowe i półilościowe

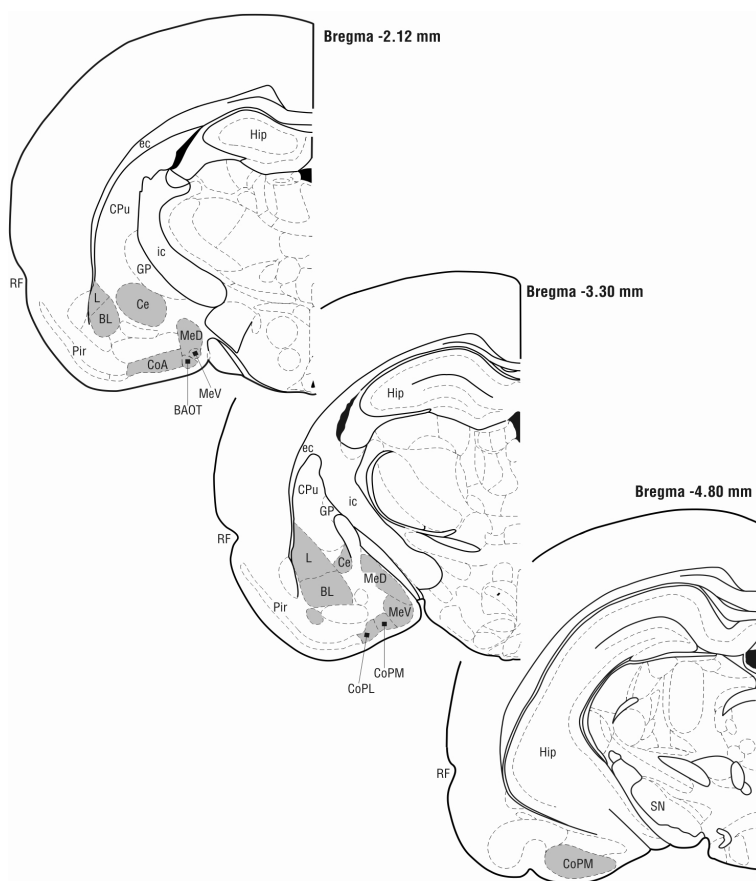
Ocenę morfologii wybarwionych immunocytochemicznie komórek dokonano głównie przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego Eclipse E600 (Nicon, Japonia), współpracującego z systemem konfokalnym MicroRadianc (Bio-Rad, W. Brytania), wyposażonym w laser argonowy – Argon Ion (25 mW). Laser ten, przy zastosowaniu odpowiednich filtrów, emituje światło monochromatyczne o długości fali 514 nm, wzbudzające znacznik Cy3 lub o długości fali 488 nm wzbudzające znacznik FITC. Kontrola wzbudzenia znaczników potwierdziła ich selektywność. Dokumentacja materiału w postaci zdjęć została wykonana przy pomocy systemu graficznego LaserPix v. 4.0 (Bio-Rad, W. Brytania).

Ocenę jakościową i półilościową rozmieszczenia komórek wybarwionych immunocytochemicznie wraz z dokumentacją fotograficzną przeprowadzono przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego Olympus BX-51 (Olympus, Japonia).

Badania ilościowe - morfometryczne

Badania morfometryczne przeprowadzono na mózgowiach szczurów grupy eksperymentalnej oraz odpowiadających im mózgowiach grup kontrolnych. W badanych jądrach ciała migdałowatego na podwójnie wybarwionych skrawkach oszacowano populacje komórek c-Fos-ir oraz komórek, w których białko c-Fos występowało jednocześnie odpowiednio z: kalretyniną, kalbindyną D-28k, parwalbuminą bądź syntazą tlenu azotu. Oceniano: liczbę komórek wykazujących występowanie białka c-Fos oraz odpowiednio CR, CB, PV lub NOS na mm² (gęstość) oraz procent komórek c-Fos-ir zawierających jednocześnie określone białko w stosunku do wszystkich komórek c-Fos-ir.

Do analizy wykorzystano system stereologiczny C.A.S.T. Grid (Olympus, Dania), w którego skład wchodziła jednostka centralna (komputer) z odpowiedniej jakości interfejsem graficznym, mikroskop BX-51 (Olympus, Japonia) wyposażony w stolik o przesuwie kontrolowanym w każdej z trzech głównych osi.



Ryc. 6. Wybrane przekroje czołowe półkuli mózgu szczura zawierające badane jądra ciała migdałowatego (oznakowane na szaro). Skróty: BAOT – jądro łożyskowe dodatkowego pasma węchowego, BL – jądro podstawno-boczne, Ce – jądro środkowe, CoA – jądro korowe przednie CoPL – jądro korowe tylne boczne, CoPM – jądro korowe tylne przyśrodkowe, CPu – prążkowie, ec – torebka zewnętrzna, GP – gałka biała, Hip – hipokamp, ic – torebka wewnętrzna, L – jądro boczne, MeD – jądro przyśrodkowe - część grzbietowa, MeV – jądro przyśrodkowe - część brzuszna, Pir – kora gruszkowata, RF – bruzda węchowa, SN – istota czarna. Wzorowane na Paxinos i Watson [425]

Fig. 6. Selected coronal sections of the cerebral hemisphere of the rat with the examined nuclei of the amygdaloid body (marked grey). Abbreviations: BAOT – bed nucleus of the accessory olfactory tract, BL – basolateral nucleus, Ce – central nucleus, CoA – anterior cortical nucleus, CoPL – posterolateral cortical nucleus, CoPM – posteromedial cortical nucleus, CPu – striatum, ec – external capsule, GP – globus pallidus, Hip – hippocampus, ic – internal capsule, L – lateral nucleus, MeD – medial nucleus - dorsal part, MeV – medial nucleus - ventral part, Pir – piriform cortex, RF – rhinal fissure, SN – substantia nigra. According to Paxinos and Watson [425]

Analizę ilości immunoreaktywnych profili neuronów (ciał komórek lub jąder) w jednostce pola testowego przeprowadzano każdorazowo według identycznego protokołu obejmującego:

- wykonanie pod powiększeniem 5x obrysów odpowiednich jąder na podstawie atlasów stereotaktycznych – przy użyciu kursora myszy na monitorze komputerowym.
- systematycznie losowe próbkowanie pod powiększeniem 20x obszarów badanych jąder, przy zachowaniu określonej kolejności w osi przednio-tylnej badanych skrawków, przy założeniu próbkowania przynajmniej 60% pola przekroju jądra na danym przekroju dla jąder dużych oraz prawie 100% powierzchni – dla jąder małych.
- zaznaczanie w polu testowym o ustalonej powierzchni (zależnej od wielkości badanego jądra, jak również od liczby komórek immunoreaktywnych), wszystkich jąder komórkowych c-Fos-ir oraz, po zmianie filtru w układzie optycznym, zaznaczanie neuronów odpowiednio CB-, CR-, PV-, NOS-ir, których jądra zawierają białko c-Fos; każdorazowo w polu testowym program C.A.S.T. zliczał automatycznie zaznaczane komórki.

Od przedstawionego powyżej protokołu odstępowano w przypadku, kiedy na wszystkich obecnych przekrojach przez dane jądro obecne były jedynie pojedyncze znakowane komórki c-Fos-ir.

Dane pochodzące z pól testowych dotyczące występowania komórek znakowanych na przekroju badanego jądra były następnie zapisywane w oddzielnych zbiorach.

Po ukończeniu analizy, dla wszystkich badanych jąder dane zostały zgromadzone w jednym zbiorze. Dla każdego jądra u danego zwierzęcia dokonano obliczenia średniej ważonej gęstości komórek c-Fos-ir i średniej ważonej gęstości komórek podwójnie wybarwionych (c-Fos/białko), poprzez podzielenie sumy liczby komórek wybarwionych przez sumę pól testowych. Wyliczono również procentowy udział komórek podwójnie wybarwionych (c-Fos/białko) w stosunku do wszystkich komórek c-Fos-ir w określonym podwójnym barwieniu (suma komórek podwójnie wybarwionych na wszystkich przekrojach danego jądra podzielona przez sumę komórek c-Fos-ir na tych samych przekrojach).

3.2.5 Ocena statystyczna wyników

Dane dotyczące analizowanych jąder ciała migdałowatego – gęstość komórek ($1/\text{mm}^2$) oraz procent komórek podwójnie wybarwionych – dla każdego przypadku, poddano analizie statystycznej. Wykonana analiza statystyczna dotyczyła:

- porównania gęstości komórek c-Fos-ir między badanymi jądrami ciała migdałowatego w poszczególnych grupach wiekowych
- porównania gęstości komórek c-Fos-ir między grupami wiekowymi w poszczególnych jądrach ciała migdałowatego
- porównania gęstości i procentu podwójnie wybarwionych komórek między badanymi jądrami ciała migdałowatego w poszczególnych grupach wiekowych.

Średnie wartości gęstości oraz procentu podwójnie wybarwionych komórek w poszczególnych grupach oraz wartości odchyleń standardowych zamieszczono w odpowiednich tabelach w rozdziale „Wyniki” oraz zilustrowano wykresami.

Ze względu na występującą znaczną zmienność pomiędzy badanymi przypadkami, gęstości porównano nieparametryczną analizą wariancji (testem Kruskal-Wallisa). W analizie nie wykonywano tzw. testów niezaplanowanych dla wykazania szczegółowych różnic. Zdecydowano się bowiem ograniczyć analizy do wskazania najbardziej istotnych dla danego parametru tendencji.

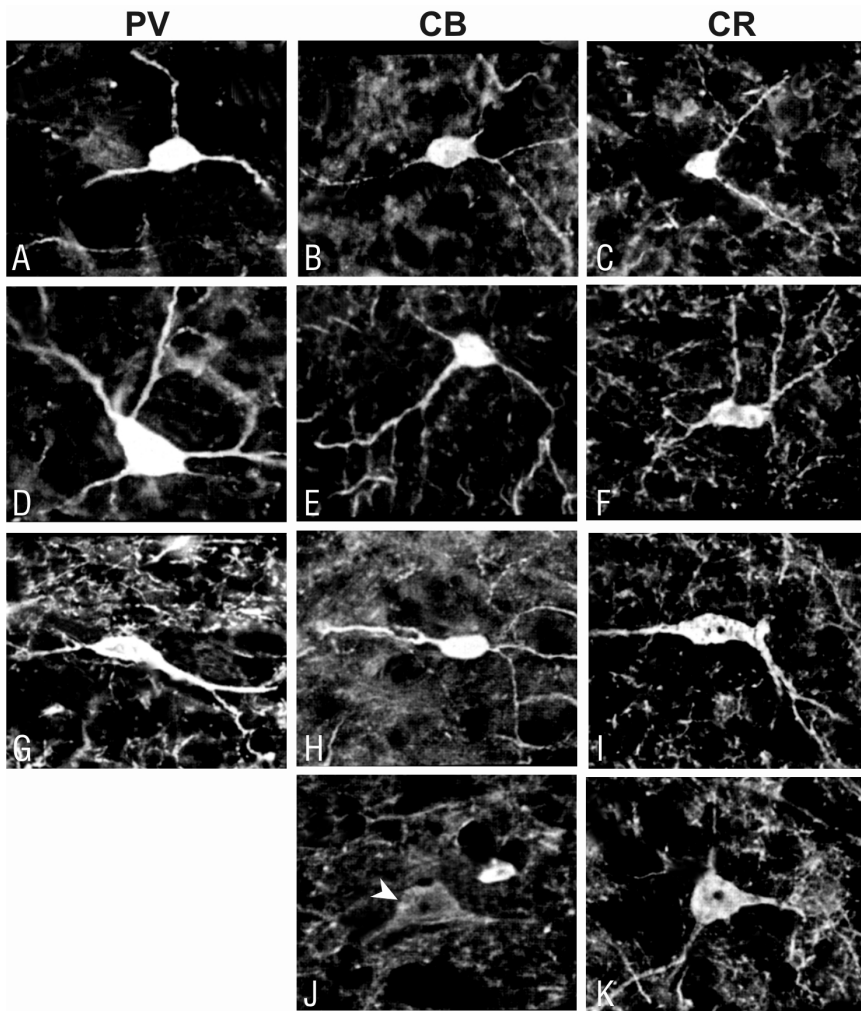
Analizę statystyczną przeprowadzono przy pomocy programu komputerowego: „Statistica v. 6.1” (Statsoft, Polska). Całość wnioskowania statystycznego przeprowadzono na poziomie istotności $p < 0,05$.

4 WYNIKI

4.1 Ogólny opis rozmieszczenia i morfologii komórek zawierających białka wiążące wapń oraz syntazę tlenku azotu w jądrach ciała migdałowatego w okresie P0-P720

Opis morfologiczny populacji komórek zawierających białka wiążące wapń: kalretyninę, kalbindynę D-28k i parwalbuminę oparto o podział zaproponowany przez Kemppainen i Pitkanen [265]. Na podstawie wielkości i kształtu ciała komórkowego oraz odejścia i przebiegu dendrytów w ciele migdałowatym dorosłego szczura opisano cztery typy neuronów (ryc. 7):

- 1 – małe, wielobiegunowe, owalne, okrągłe lub wieloboczne, z widocznymi 3 – 5 cienkimi dendrytami o zbliżonej grubości. Obserwuje się je w populacjach neuronów zawierających PV, CB, CR.
- 2 – średnie i duże, wielobiegunowe z widocznymi 3 – 5 dendrytami o różnej grubości. Obserwuje się je w populacjach neuronów zawierających PV, CB, CR.
- 3 – dwubiegunowe, różnej wielkości, na ogół wrzecionowate, o dendrytach wychodzących z przeciwległych biegunów ciała komórkowego. Obserwuje się je w populacjach neuronów zawierających PV, CB, CR.
- 4 – duże, piramidowe; dendryty, jeżeli są widoczne, to tylko na krótkim odcinku, w okolicach ich odejścia od ciała komórki. Obserwuje się je w populacjach neuronów zawierających CB i CR.



Ryc. 7. Typy morfologiczne komórek zawierających parwalbuminę, kalbindynę D-28k i kalretyninę w ciele migdałowatym dorosłego szczura. (A,B,C) typ 1; (D,E,F) typ 2; (G,H,I) typ 3; (J,K) typ 4. Opis w tekście. Według Kemppainen i Pitkanen [265]

Fig. 7. Morphological types of cells containing parvalbumin, calbindin D-28k and calretinin in the amygdaloid body of the adult rat. (A,B,C) type 1; (D,E,F) type 2; (G,H,I) type 3; (J,K) type 4. Description in the text. According to Kemppainen and Pitkanen [265]

4.1.1 Neurony zawierające kalretyninę

Rozmieszczenie i gęstość komórek CR-ir w badanych jądrach ciała migdałowego przedstawiają ryciny 8 i 10.

Jądro boczne, jądro podstawno-boczne

Przez cały badany okres komórki CR-ir występują w jądrze bocznym stosunkowo nielicznie (wyjątek stanowi część brzuszna jądra, gdzie jest ich wyraźnie więcej). Pod względem morfologii, wśród neuronów CR-ir wyróżnia się małe, wielobiegunowe komórki o okrągłym perikarionie (typ 1), średnie, wielobiegunowe neurony typu 2 oraz, znacznie rzadziej, komórki typu 3 i 4; do P7 występują również neurony jednobiegunowe (ryc. 9A). W pierwszym tygodniu życia obserwuje się wiele neuronów CR-ir o poszerzonych początkowych odcinkach wypustek (ryc. 9A).

Jądro podstawno-boczne, już od P0 charakteryzuje się dużą gęstością komórek CR-ir – szczególnie licznie występują one w części bocznej struktury. Podobnie jak w jądrze bocznym, w BL wyróżnia się wszystkie typy morfologiczne neuronów CR-ir, przy czym rzadziej obserwuje się neurony typu 3 (ryc. 9B), natomiast znacząco więcej jest tu dużych, słabo wybarwionych, piramidowych komórek typu 4 (zwłaszcza w tylnej części jądra; ryc. 9C).

Jądro środkowe

Komórki CR-ir występują w jądrze środkowym przez cały badany okres i już od P0 przyjmują rozkład obserwowany we wszystkich następnych grupach wiekowych – stosunkowo licznie lokalizują się w części przyśrodkowej Ce, natomiast w części bocznej jądra jest ich zdecydowanie mniej. Pod względem morfologii to głównie małe, okrągłe lub owalne neurony typu 1 i średniej wielkości neurony typu 2 o zróżnicowanej immunobarwliwości (ryc. 9F). W pierwszym tygodniu życia po urodzeniu obserwowano ponadto neurony CR-ir jedno- i dwubiegunowe; początkowe odcinki wypustek odchodzących od perikarionów zwykle były poszerzone (ryc. 9D, E).

Jądro przyśrodkowe

Część brzuszna – neurony CR-ir występują w MeV przez cały badany okres. Już w P0 wykazują dużą gęstość, która charakteryzuje ten rejon Me we wszystkich pozostałych grupach wiekowych. W P0, komórki CR-ir są stosunkowo słabo wyróżnialne z otaczającego je, silnie immunoreaktywnego neuropilu. Wśród neuronów CR-ir dominują małe, owalne komórki typu 1 oraz średnie i duże typu 2; obserwuje się również wrzecionowate neurony typu 3 (ryc. 9G). Zwykle uwidaczniają się bądź początkowe odcinki wypustek komórkowych, bądź jedynie miejsca ich odejścia (ryc. 9G). Immunoreaktywność neuronów CR-

ir części brzusznej jądra przyśrodkowego jest większa niż immunoreaktywność neuronów części grzbietowej.

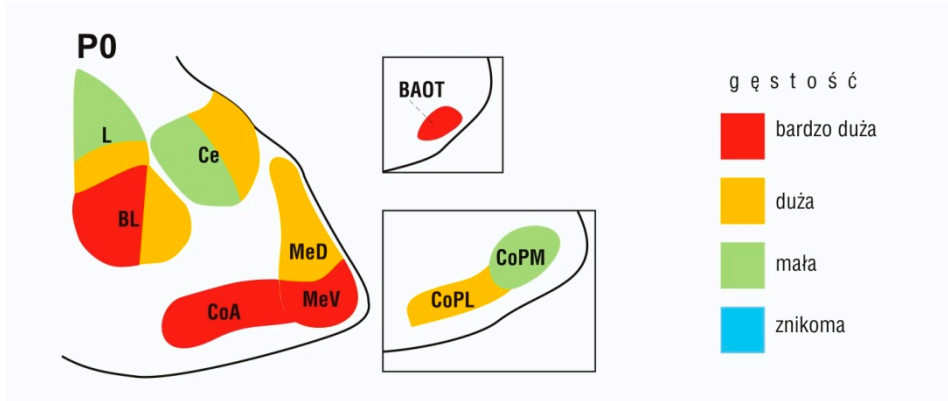
Cześć grzbietowa – neurony CR-ir występują w MeD przez cały badany okres. W P0 i P4 większość z nich to owalne i okrągłe komórki o dużym jądrze i wąskim rąbku cytoplazmy; ich immunobarwność jest zwykle niewiele wyższa od immunobarwności neuropilu. Ponadto obserwuje się komórki dwubiegunowe o wrzecionowatym perikarionie (jest ich zdecydowanie mniej; ryc. 9H). Od P7, w MeD dominują średnie neurony typu 2 oraz małe, owalne i okrągłe neurony typu 1 (ryc. 9I); wiele z nich charakteryzuje się stosunkowo niską CR-immunobarwnością. Sporadycznie obserwowano również duże, słabo wybarwione neurony typu 4.

Jądro łożyskowe dodatkowego pasma węchowego

Neurony CR-ir występują w BAOT przez cały badany okres; już od P0 ich duża gęstość i wysoka immunoreaktywność wyróżnia to jądro z sąsiadujących rejonów ciała migdałowatego. W pierwszym tygodniu życia po urodzeniu (P0, P4, P7), przeważają komórki o owalnym bądź okrągłym perikarionie. Od P14 dominują średnie i duże neurony o zróżnicowanych kształtach ciał komórkowych (wieloboczne, trójkątne, owalne; ryc. 9J); ich wypustki (o ile są widoczne), są różnej grubości. Znacznie rzadziej obserwuje się dwubiegunowe neurony typu 3.

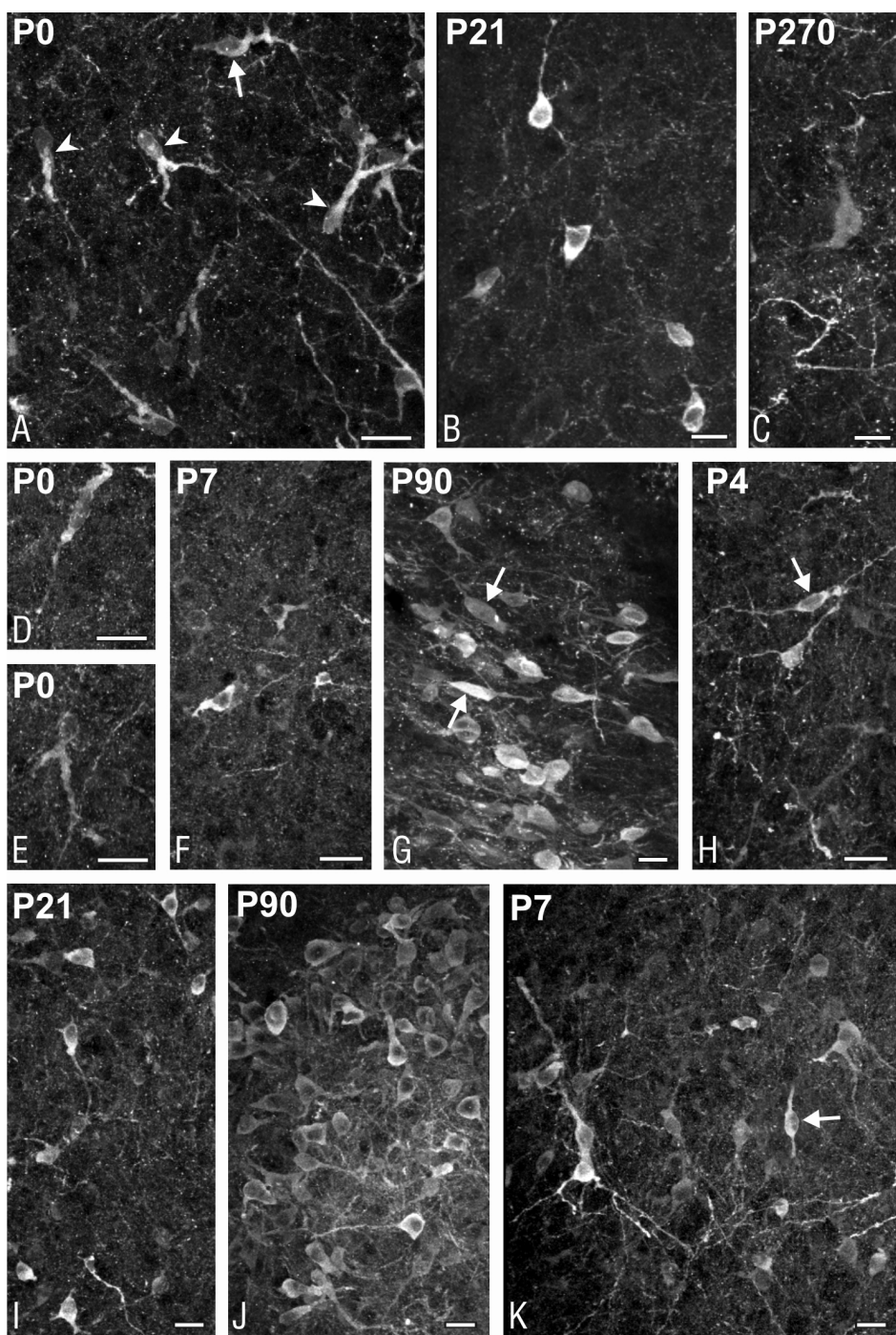
Jądra korowe

Komórki CR-ir występują w jądrach korowych przez cały badany okres i już w P0 uwidacznia się ich zróżnicowanie zwłaszcza pod względem ilościowym. Bardzo duża gęstość neuronów CR-ir, charakteryzuje jądro korowe przednie, wyraźnie mniej jest ich w jądrze korowym tylnym bocznym; w jądrze korowym tylnym przyśrodkowym komórki CR-ir występują stosunkowo nielicznie. W CoA, populacja neuronów CR-ir jest zróżnicowana morfologicznie (ryc. 9K) – większość to średniej wielkości, wielobiegunowe komórki typu 2, ale obserwuje się również wrzecionowate neurony typu 3 (często położone długą osią prostopadle do powierzchni podstawnej półkuli) oraz, rzadziej, małe owalne komórki typu 1 i duże delikatnie wybarwione neurony typu 4 (nie obserwowano ich w okresie P0–P7). W okresie P0–P4 występują również neurony jednobiegunowe. Dendryty często posiadają zylakowatości. W jądrach korowych tylnych: bocznym i przyśrodkowym dominują małe, stosunkowo intensywnie wybarwione neurony typu 1.



Ryc. 8. Ogólny schemat występowania i rozmieszczenia komórek zawierających kalretyninę w badanych jądrach ciała migdałowatego szczura. Schemat obserwowany w P0 utrzymuje się w pozostałych grupach wiekowych. Skróty: BAOT – jądro łożyskowe dodatkowego pasma węchowego, BL – jądro podstawno-boczne, Ce – jądro środkowe, CoA – jądro korowe przednie, CoPL – jądro korowe tylne boczne, CoPM – jądro korowe tylne przyśrodkowe, L – jądro boczne, MeD – jądro przyśrodkowe - część grzbietowa, MeV – jądro przyśrodkowe - część brzuszna

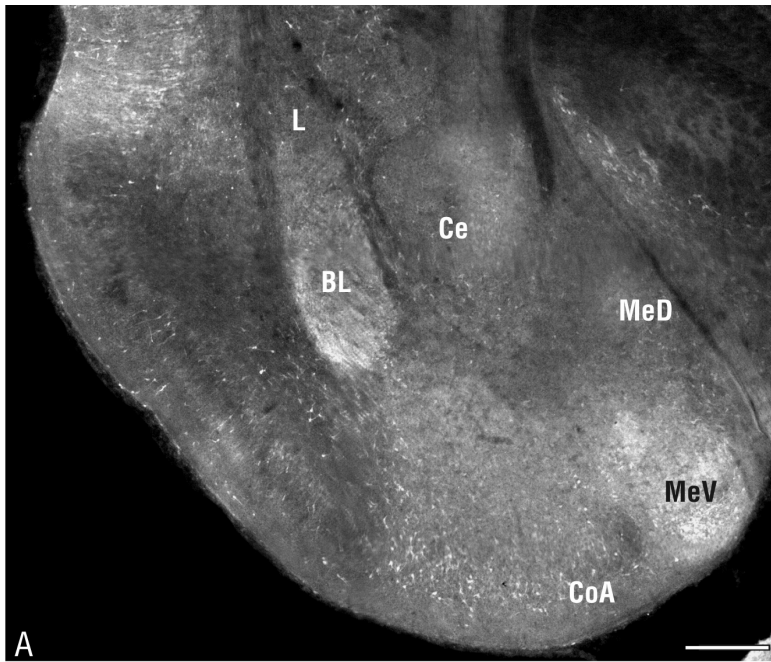
Fig. 8. General diagram of the occurrence and distribution of the cells containing calretinin in the examined nuclei of the rat's amygdaloid body at the selected age groups. Scheme observed at P0 did not change visibly for the remaining age groups. Abbreviations: BAOT – bed nucleus of the accessory olfactory tract, BL – basolateral nucleus, Ce – central nucleus, CoA – anterior cortical nucleus, CoPL – posterolateral cortical nucleus, CoPM – posteromedial cortical nucleus, L – lateral nucleus, MeD – medial nucleus - dorsal part, MeV – medial nucleus - ventral part



Ryc. 9. / Fig. 9

Ryc. 9. Neurony zawierające kalretyninę w wybranych jądrach ciała migdałowatego szczura. **Jądro boczne (A)**: neurony: jedno- (grot), dwu- (strzałka) oraz wielobiegunowe; widoczne, charakterystyczne dla wczesnego etapu rozwoju, poszerzone początkowe odcinki wypustek. **Jądro podstawno-boczne: (B)** małe (owalne) oraz średnie (owalne i trójkątne) komórki wielobiegunowe, **(C)** duża komórka piramidalna o charakterystycznej słabej immunobarwliwości. **Jądro środkowe: (D)** dwu- i **(E)** jednobiegunowe neurony o poszerzonych proksymalnych odcinkach wypustek oraz **(F)** małe i średnie neurony wielobiegunowe. **Jądro przyśrodkowe – część brzuszna (G)**: wielobiegunowe neurony o zróżnicowanych kształtach i wielkości (ich wypustki są słabo widoczne) oraz dwubiegunowe o wrzecionowatym ciele komórkowym (strzałka). **Jądro przyśrodkowe – część grzbietowa: (H)** dwubiegunowa (strzałka) oraz **(I)** małe (owalne) i większe (owalne i trójkątne) neurony wielobiegunowe. **Jądro łożyskowe dodatkowego pasma węchowego (J)**: średnie i duże, rzadziej małe neurony o różnej morfologii perikarionów i dużym, dobrze widocznym jądrze. **Jądro korowe przednie (K)**: dwu- (strzałka) i wielobiegunowe neurony o zróżnicowanej morfologii; dendryty, o ile są widoczne, posiadają żyłkowatości. Długość skali = 20 μm

Fig. 9. Neurons containing calretinin in the selected nuclei of the amygdaloid body of the rat. **Lateral nucleus (A)**: neurons: uni- (arrow-head), bi- (arrow) and multipolar; visible thicker proximal fragments of dendrites, typical for early stage of development **Basolateral nucleus: (B)** small (oval) and medium (oval and triangular), multipolar cells, **(C)** weakly immunostaining large pyramidal cell. **Central nucleus: (D)** bi- and **(E)** unipolar neurons with thicker proximal fragments of dendrites and **(F)** small and medium, multipolar neurons. **Medial nucleus - ventral part (G)**: multipolar neurons of variable shapes of bodies and size (their processes are weakly visible) and bipolar cells of fusiform bodies (arrow). **Medial nucleus - dorsal part: (H)** bipolar (arrow) and **(I)** small (oval) and greater (oval and triangular), multipolar neurons. **Bed nucleus of the accessory olfactory tract (J)**: medium and large, less frequently small neurons of variable shapes of cell body and with large, visible nucleus. **Anterior cortical nucleus (I)**: bi- (arrow) and multipolar neurons of variable morphology; dendrites, if visible, have varicosities. Scale bar = 20 μm



Ryc. 10. Neurony zawierające kalretyninę w ciele migdałowatym szczura w P14. Przekrój czołowy. Skróty: BL – jądro podstawno-boczne, Ce – jądro środkowe, CoA – jądro korowe przednie, CoPL – jądro korowe tylne boczne, L – jądro boczne, MeD – jądro przyśrodkowe - część grzbietowa, MeV – jądro przyśrodkowe - część brzuszna. Długość skali = 250 μ m

Fig. 10. Neurons containing calretinin in the rat's amygdaloid body at P14. Coronal section. Abbreviations: BL – basolateral nucleus, Ce – central nucleus, CoA – anterior cortical nucleus, CoPL – posterolateral cortical nucleus, L – lateral nucleus, MeD – medial nucleus - dorsal part, MeV – medial nucleus - ventral part. Scale bar = 250 μ m

4.1.2 Neurony zawierające kalbindynę D-28k

Rozmieszczenie i gęstość komórek CB-ir w badanych jądrach ciała migdałowatego przedstawiają ryciny 11 i 12.

Jądro boczne, jądro podstawno-boczne

Komórki CB-ir występują w jądrach bocznym i podstawno-bocznym przez cały badany okres. W P0 oraz w P4 i P7 charakteryzują się bardzo dużą gęstością (jedynie w części grzbietowo-bocznej jądra bocznego jest ich wyraźnie mniej). W drugim tygodniu gęstość neuronów CB-ir zmniejsza się, (ale nadal

pozostaje duża, szczególnie w BL) i osiąga poziom obserwowany we wszystkich pozostałych grupach wiekowych. Pod względem morfologii, neurony CB-ir obu jąder stanowią zróżnicowane populacje, w których dominują małe, wielobiegunowe komórki o owalnym i okrągłym perikarionie (typ 1) oraz większe, wielobiegunowe z 3-5 dendrytami z widocznymi żyłkowatościami (typ 2; ryc. 13A, C). Obserwuje się również dwubiegunowe neurony o wrzecionowatym perikarionie (typ 3; ryc. 13C) oraz, rzadziej, duże, piramidalne neurony typu 4 (zasadniczo od P90; ryc. 13D) i neurony jednobiegunowe (zasadniczo w okresie P0–P7; ryc. 13B). W P0 i P4 wybarwiają się głównie poszerzone początkowe odcinki wypustek.

Jądro środkowe

Komórki CB-ir występują w jądrze środkowym przez cały badany okres. Lokalizują się w części środkowej (największa gęstość) i przyśrodkowej jądra; w części bocznej jest ich wyraźnie mniej. Ich liczebność stabilizuje się w P21. W pierwszym tygodniu życia neurony CB-ir części środkowej Ce są stosunkowo słabo wyróżnialne z otaczającego je, silnie wybarwionego neuropilu. W dalszych etapach rozwoju następuje widoczne zmniejszenie się immunobarwliwości neuropilu, przez co komórki stają się lepiej wyróżnialne. Neurony CB-ir jądra środkowego to głównie średnie, wielobiegunowe, owalne, okrągłe lub trójkątne komórki o dużym jądrze (głównie typ 2; ryc. 13E); dendryty są słabo widoczne (czasami uwiadczenia się miejsce ich odejścia i ewentualnie odcinek proksymalny; ryc. 13E).

Jądro przyśrodkowe

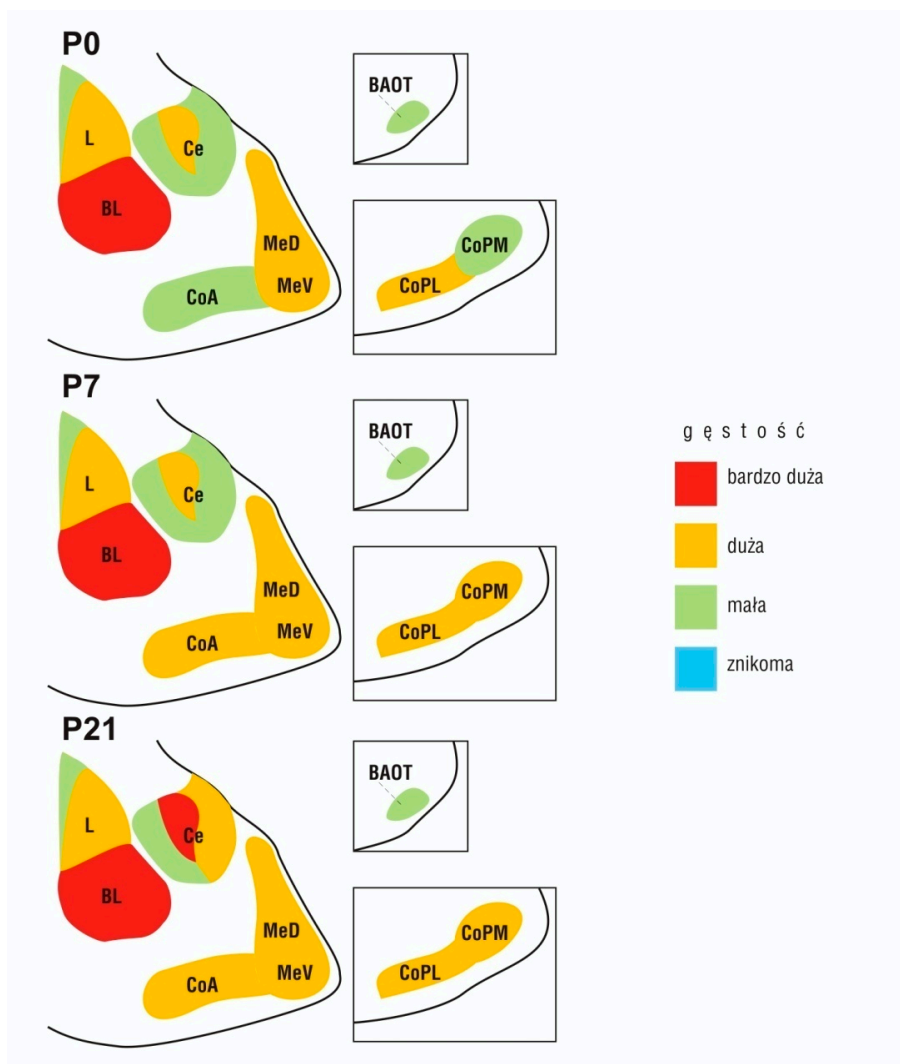
Komórki CB-ir występują w jądrze przyśrodkowym przez cały badany okres. Już od P0 charakteryzują się dużą gęstością, aczkolwiek w P0 i P4 wiele z nich, szczególnie w MeV wykazuje niską CB-immunoreaktywność. W następnych grupach wiekowych obserwuje się wyraźne zróżnicowanie neuronów CB-ir pod względem barwliwości – zarówno w grzbietowej, jak i w brzusznej części Me występują komórki silnie wybarwione oraz takie, których barwliwość jest niewiele wyższa od tła (szczególnie liczne w MeD; ryc. 13H). Morfologicznie, neurony CB-ir jądra przyśrodkowego stanowią populację zróżnicowaną (ryc. 13F,G,H), w której występują małe wielobiegunowe komórki o owalnym i okrągłym perikarionie (typ1) oraz większe komórki wielobiegunowe, zazwyczaj z trzema dendrytami odchodzącymi od ciała komórkowego (typ 2). Obserwuje się również dwubiegunowe neurony o perikarionach owalnych lub wrzecionowatych (typ 3; ryc. 13H).

Jądro łóżyskowe dodatkowego pasma węchowego

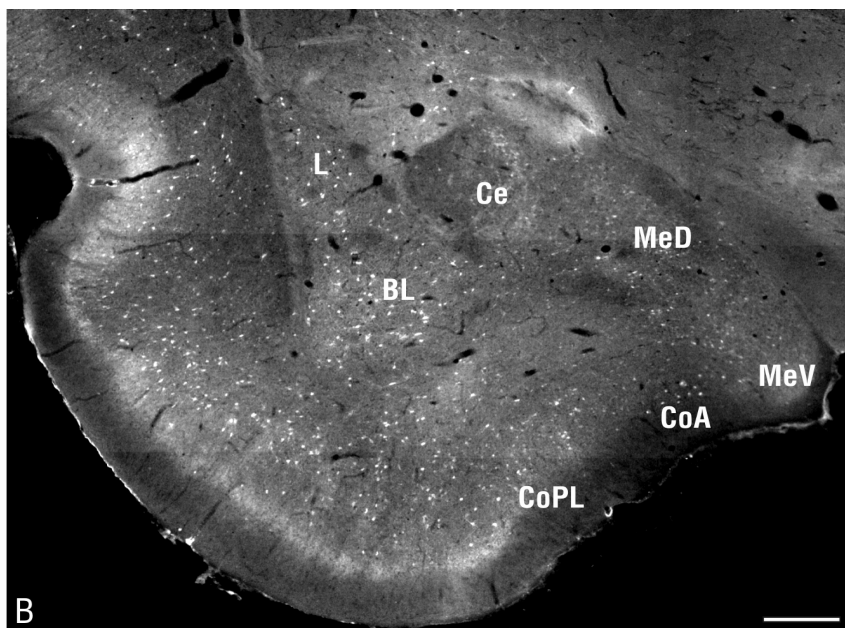
Komórki CB-ir występują w BAOT przez cały badany okres, aczkolwiek ich gęstość jest stosunkowo mała. Są to zazwyczaj komórki wielobiegunowe typu 2.

Jądra korowe

Komórki CB-ir występują w jądrach korowych przez cały badany okres. Od P4 (w CoPL od dnia urodzenia), charakteryzują się stosunkowo dużą gęstością, aczkolwiek w CoA, w pierwszych dwóch tygodniach przeważają neurony o niskiej immunobarwności. Pod względem morfologii, w jądrach korowych wyróżnia się komórki CB-ir typu 1 (głównie w CoA i w CoPL) i typu 2 (ryc. 13I) oraz sporadycznie typu 4 (tylko w CoA). Obserwuje się również zróżnicowanie immunobarwności neuronów – słabo wybarwione neurony CB-ir szczególnie licznie występują w CoPM.



Ryc. 11. / Fig. 11

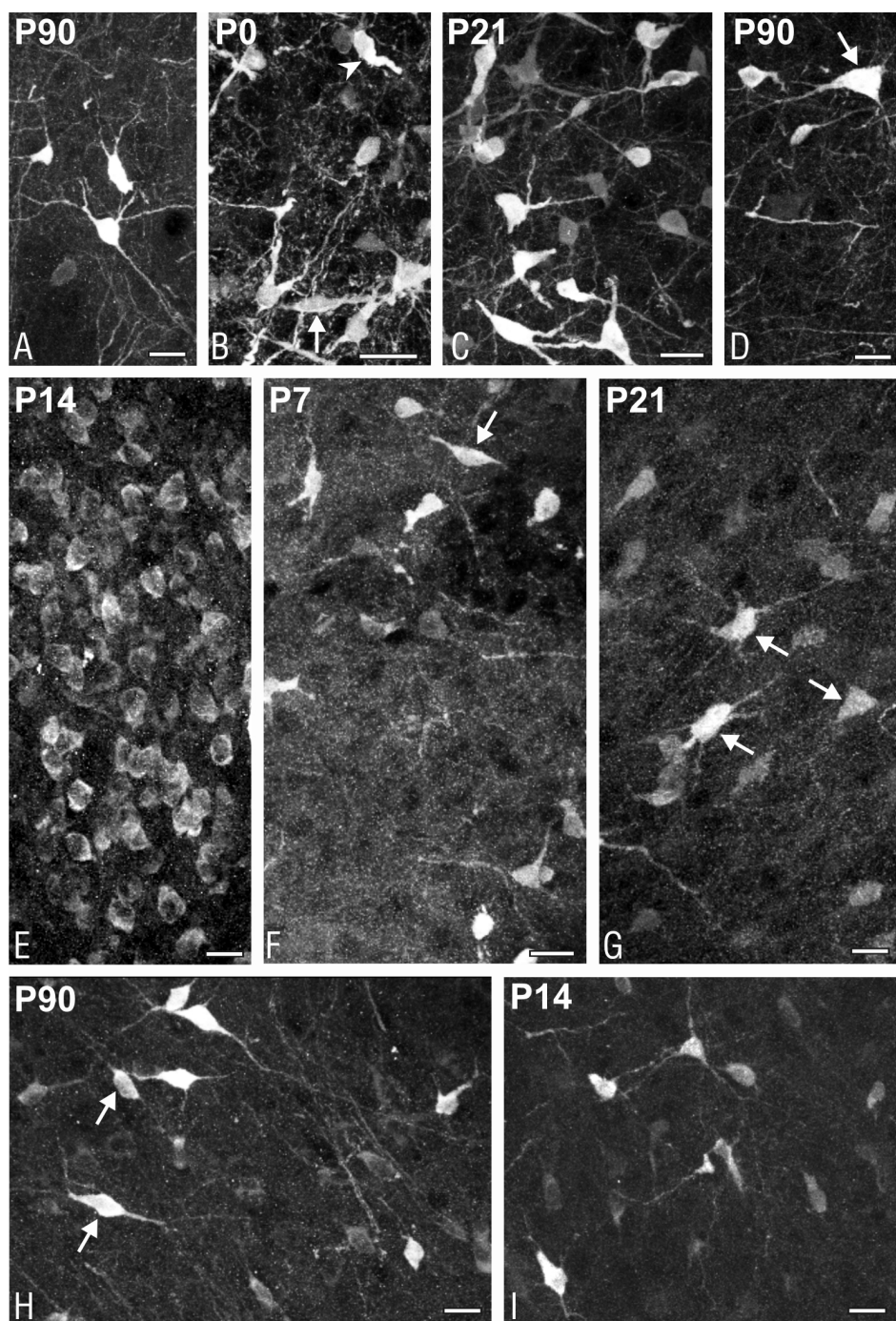


Ryc. 12. Neurony zawierające kalbindynę D-28k w ciele migdałowatym szczura w P360. Przekrój czołowy. Skróty: BL – jądro podstawno-boczne, Ce – jądro środkowe, CoA – jądro korowe przednie, CoPL – jądro korowe tylne boczne, L – jądro boczne, MeD – jądro przyśrodkowe - część grzbietowa, MeV – jądro przyśrodkowe - część brzuszna. Długość skali = 250 μ m

Fig. 12. Neurons containing calbindin D-28k in the rat's amygdaloid body at P360. Coronal section. Abbreviations: BL – basolateral nucleus, Ce – central nucleus, CoA – anterior cortical nucleus, CoPL – posterolateral cortical nucleus, L – lateral nucleus, MeD – medial nucleus - dorsal part, MeV – medial nucleus - ventral part. Scale bar=250 μ m

Ryc. 11. Ogólny schemat występowania i rozmieszczenia komórek zawierających kalbindynę D-28k w badanych jądrach ciała migdałowatego szczura w wybranych grupach wiekowych. Schemat obserwowany w P21 utrzymywał się w kolejnych grupach wiekowych (>P21). Skróty: BAOT – jądro łożyskowe dodatkowego pasma węchowego, BL – jądro podstawno-boczne, Ce – jądro środkowe, CoA – jądro korowe przednie, CoPL – jądro korowe tylne boczne, CoPM – jądro korowe tylne przyśrodkowe, L – jądro boczne, MeD – jądro przyśrodkowe-część grzbietowa, MeV – jądro przyśrodkowe-część brzuszna

Fig. 11. General diagram of the occurrence and distribution of the cells containing calbindin D-28k in the examined nuclei of the rat's amygdaloid body in the selected age groups. The scheme observed in P21 did not change visibly in the remaining age groups (>P21). Abbreviations: BAOT – bed nucleus of the accessory olfactory tract, BL – basolateral nucleus, Ce – central nucleus, CoA – anterior cortical nucleus, CoPL – posterolateral cortical nucleus, CoPM – posteromedial cortical nucleus, L – lateral nucleus, MeD – medial nucleus -dorsal part, MeV – medial nucleus - ventral part



Ryc. 13. / Fig. 13

4.1.3 Neurony zawierające parwalbuminę

Rozmieszczenie i gęstość komórek PV-ir w badanych jądrach ciała migdałowego przedstawiają ryciny 14 i 15.

Jądro boczne

Pierwsze, pojedyncze neurony PV-ir obserwowano w jądrze bocznym w P14; w P21 było ich nieco więcej, aczkolwiek ich gęstość nadal pozostawała mała. Duża gęstość komórek PV-ir obserwowana w P90 utrzymywała się w pozostałych grupach wiekowych (>P90). Neurony PV-ir lokalizują się głównie w części grzbietowo-bocznej jądra. Morfologicznie to głównie komórki typu 1, o okrągłym lub owalnym perikarionie oraz wieloboczne komórki typu 2 (ryc. 16A, B).

Ryc. 13. Neurony zawierające kalbindynę w wybranych jądrach ciała migdałowego szczura. **Jądro boczne (A)**: małe i średnie komórki wielobiegunowe z wypustkami posiadającymi żyłakowatości. **Jądro podstawno-boczne: (B)** jedno- (grot), dwu- (strzałka) oraz wielobiegunowe neurony o zróżnicowanym kształcie perikarionów; widoczne, charakterystyczne dla wczesnego etapu rozwoju, poszerzone początkowe odcinki wypustek, **(C)** dwu- i wielobiegunowe komórki o różnych kształtach perikarionów i wielkości, **(D)** duża komórka piramidowa (strzałka). **Jądro środkowe (E)**: okrągłe, owalne i trójkątne komórki o słabo widocznych wypustkach. **Jądro przyśrodkowe – część brzuszna: (F)** małe, wielobiegunowe i dwubiegunowe (strzałka) oraz **(G)** średnie wielobiegunowe (strzałki) komórki o zróżnicowanej immunobarwliwości. **Jądro przyśrodkowe – część grzbietowa (H)**: wielobiegunowe (małe i średnie) oraz dwubiegunowe (strzałka) komórki o zróżnicowanej immunobarwliwości. **Jądro korowe przednie (I)**: małe i średnie neurony wielobiegunowe (liczne o słabej immunobarwliwości). Długość skali = 20 μ m

*Fig. 13. Neurons containing calbindin in the selected nuclei of the amygdaloid body of the rat. **Lateral nucleus (A)**: small and medium multipolar cells having processes with varicosities. **Basolateral nucleus: (B)** uni- (arrow-head), bi- (arrow) and multipolar neurons of variable shapes of bodies; visible thicker proximal fragments of dendrites, typical for early stage of development. **(C)** bi- and multipolar cells of variable shapes of bodies and sizes, **(D)** large pyramidal cell (arrow). **Central nucleus (E)**: oval, round and triangular, multipolar cells with weakly visible processes. **Medial nucleus - ventral part: (F)** small multipolar, bipolar (arrow) and **(G)** medium multipolar (arrows) cells of variable immunostaining. **Medial nucleus - dorsal part (H)**: multipolar (small and medium) and bipolar (arrow) cells of variable immunostaining. **Anterior cortical nucleus (I)**: small and medium, multipolar neurons (numerous weakly immunostained). Scale bar = 20 μ m*

Jądro podstawno-boczne

Po raz pierwszy, neurony PV-ir obserwowano w jądrze podstawno-bocznym w P14. Już w P14 i P21 były stosunkowo liczne. Bardzo duża gęstość komórek PV-ir obserwowana w P90 utrzymywała się w kolejnych grupach wiekowych (>P90). Szczególnie licznie neurony PV-ir występują w grzbietowo-bocznej części jądra. Pod względem morfologii dominują wielobiegunowe komórki typu 2 z dobrze widocznymi dendrytami o różnej grubości (ryc. 16C). Ponadto występują również owalne i okrągłe neurony typu 1 oraz, rzadziej, wrzecionowate dwubiegunowe neurony typu 3 (ryc. 16C). Na przebiegu dendrytów często występują żyłakowatości (ryc. 16C).

Jądro korowe tylne boczne

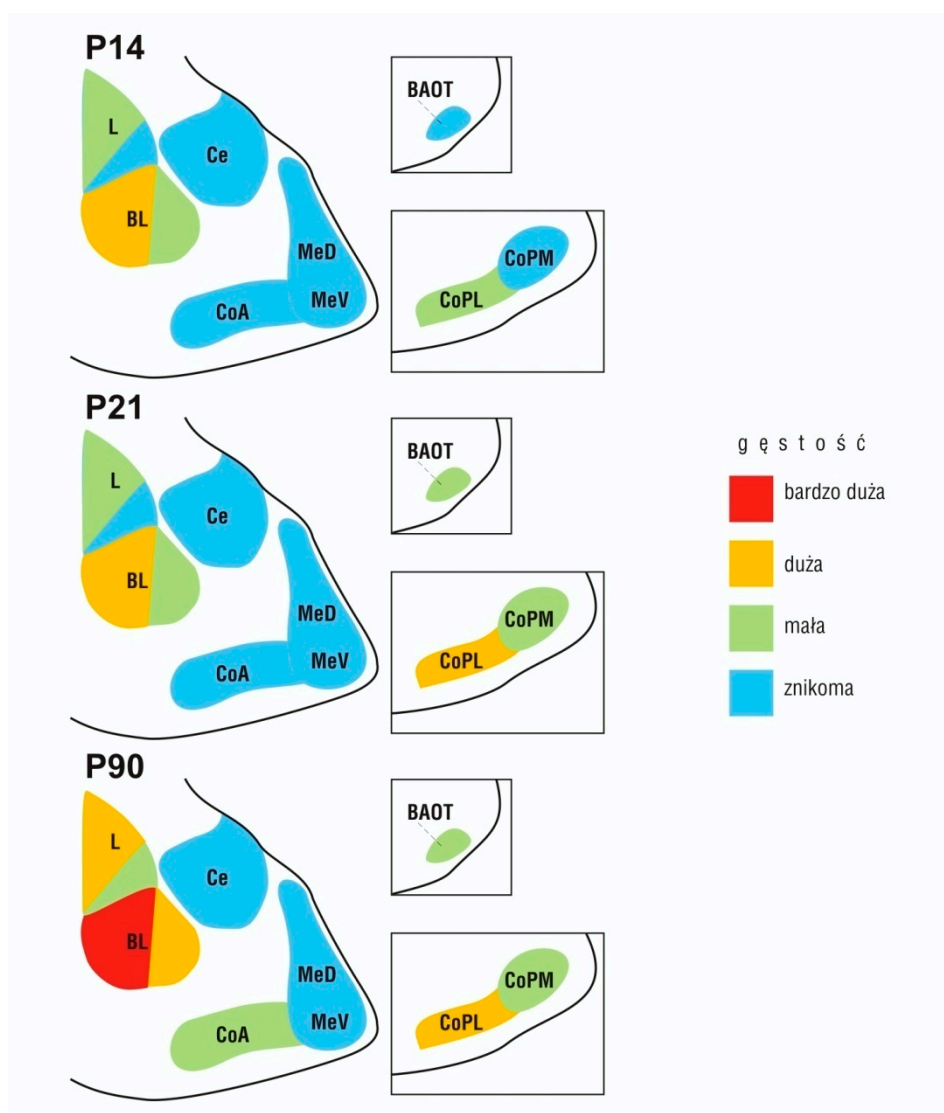
Pierwsze, nieliczne neurony PV-ir obserwowano w jądrze korowym tylnym bocznym w P14; w P21 było ich znacząco więcej. Duża gęstość komórek PV-ir obserwowana w P90 utrzymywała się w pozostałych grupach wiekowych (>P90). Najintensywniej wybarwione neurony PV-ir lokalizują się w II, a przede wszystkim w I warstwie komórkowej CoPL – są to głównie wielobiegunowe komórki typu 2, ale również komórki typu 1 i 3.

Nieliczne neurony PV-ir występują w jądrach: leżącym dodatkowego pasma węchowego, korowym przednim i korowym tylnym przyśrodkowym.

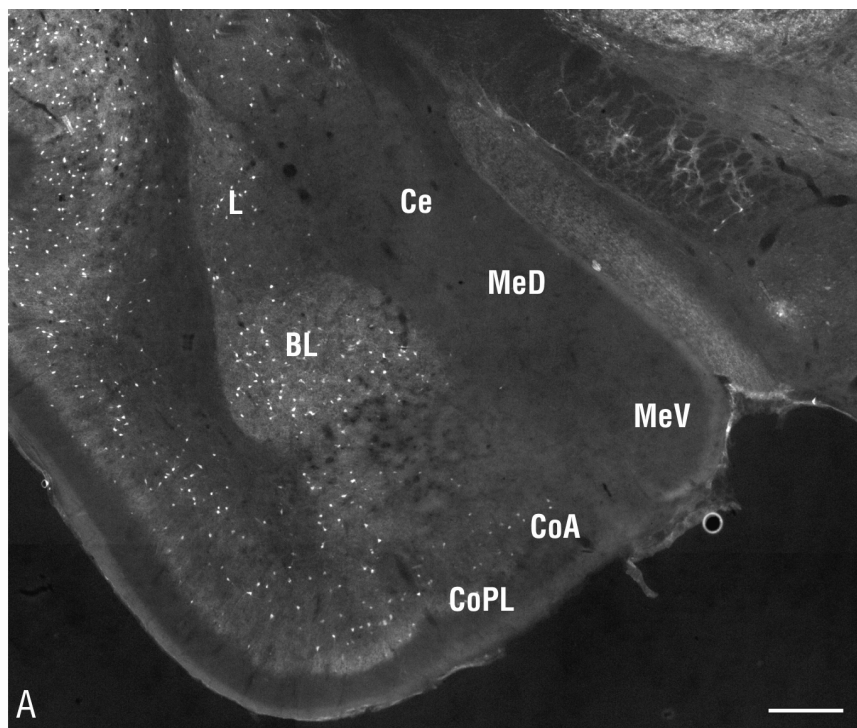
W jądrach: środkowym i przyśrodkowym neurony PV-ir obserwowano incydentalnie.

Ryc. 14. Ogólny schemat występowania i rozmieszczenia komórek zawierających parwalbuminę w badanych jądrach ciała migdałowego szczura w wybranych grupach wiekowych. Schemat obserwowany w P90 utrzymywał się w kolejnych grupach wiekowych (>P90). Skróty: BAOT – jądro łożyskowe dodatkowego pasma węchowego, BL – jądro podstawno-boczne, Ce – jądro środkowe, CoA – jądro korowe przednie, CoPL – jądro korowe tylne boczne, CoPM – jądro korowe tylne przyśrodkowe, L – jądro boczne, MeD – jądro przyśrodkowe - część grzbietowa, MeV – jądro przyśrodkowe - część brzuszna

Fig. 14. General diagram of the occurrence and distribution of the cells containin parvalbumin in the examined nuclei of the rat's amygdaloid body in the selected age groups. The scheme observed in P90 did not change visibly in the remaining age groups (>P90). Abbreviations: BAOT – bed nucleus of the accessory olfactory tract, BL – basolateral nucleus, Ce – central nucleus, CoA – anterior cortical nucleus, CoPL – posterolateral cortical nucleus, CoPM – posteromedial cortical nucleus, L – lateral nucleus, MeD – medial nucleus - dorsal part, MeV – medial nucleus - ventral part

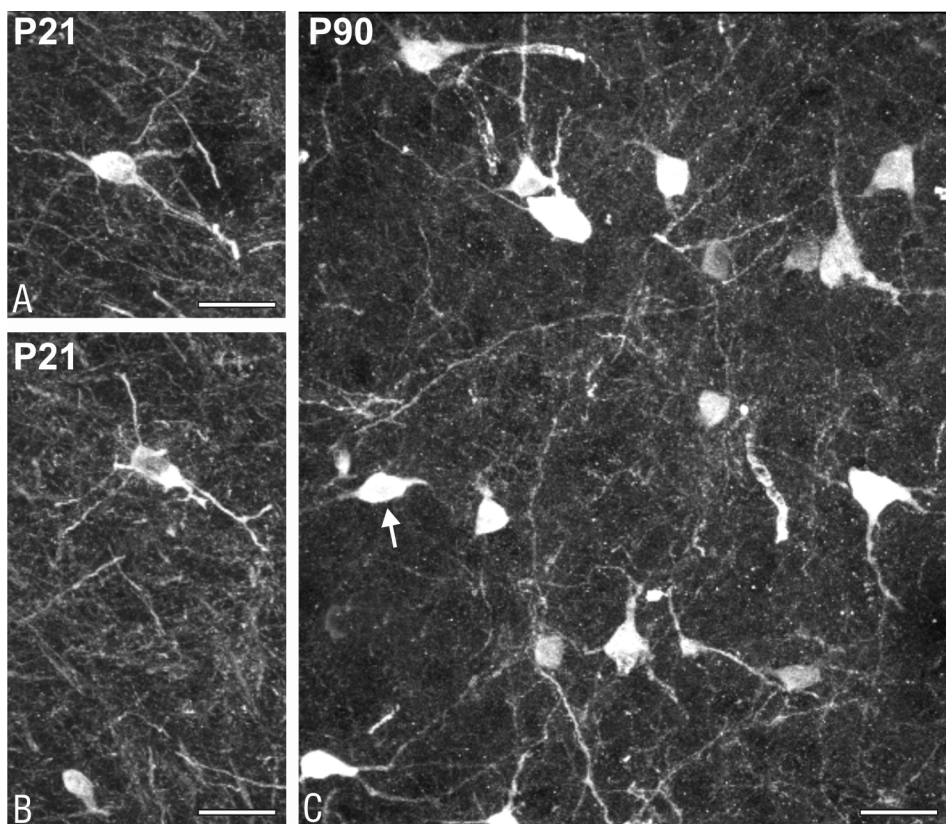


Ryc. 14 / Fig. 14



Ryc. 15. Neurony zawierające parwalbuminę w ciele migdałowatym szczura w P90. Przekrój czołowy. Skróty: BL – jądro podstawno-boczne, Ce – jądro środkowe, CoA – jądro korowe przednie, CoPL – jądro korowe tylne boczne, L – jądro boczne, MeD – jądro przyśrodkowe - część grzbietowa, MeV – jądro przyśrodkowe - część brzuszna. Długość skali = 250 μ m

Fig. 15. Neurons containing parvalbumin in the rat's amygdaloid body at P90. Coronal section. Abbreviations: BL – basolateral nucleus, Ce – central nucleus, CoA – anterior cortical nucleus, CoPL – posterolateral cortical nucleus, L – lateral nucleus, MeD – medial nucleus - dorsal part, MeV – medial nucleus - ventral part. Scale bar=250 μ m



Ryc. 16. Neurony zawierające parwalbuminę w wybranych jądrach ciała migdałowego szczura. **Jądro boczne (A, B):** wielobiegunowe komórki o różnej wielkości i morfologii perikarionów, z wypustkami posiadającymi żylakowatości. **Jądro podstawno-boczne: (C)** dwu- (strzałka) i wielobiegunowe neurony o zróżnicowanej morfologii i wielkości; ich wypustki posiadają żylakowatości. Długość skali = 20 μm

*Fig. 16. Neurons containing parvalbumin in the selected nuclei of the amygdaloid body of the rat. **Lateral nucleus (A, B):** multipolar cells of variable sizes and shapes of the somata having processes with varicosities. **Basolateral nucleus: (C)** bi- (arrow) and multipolar neurons of variable size and shapes of the somata; their processes have varicosities. Scale bar = 20 μm*

4.1.4 Neurony zawierające syntazę tlenku azotu

Rozmieszczenie i gęstość komórek NOS-ir w badanych jądrach ciała migdałowatego przedstawiają ryciny 17 i 18.

Jądro boczne, jądro podstawno-boczne

W pierwszym tygodniu życia po urodzeniu, w jądrze bocznym obserwuje się nieliczne komórki NOS-ir; w późniejszym okresie ich gęstość zwiększa się (głównie w części grzbietowo-bocznej) i stabilizuje około P21. Są to neurony o zróżnicowanej morfologii: dwubiegunowe o perikarionach okrągłych, owalnych i wrzecionowatych (ryc. 19A) oraz wielobiegunowe o perikarionach owalnych, wrzecionowatych bądź trójkątnych, z trzema lub czterema dendrytami odchodzącymi od ciała komórkowego (ryc. 19B). Wypustki często posiadają żylakowatości. Przez cały badany okres neurony NOS-ir (niezależnie od ich morfologii), charakteryzują się bardzo silną immunobarwnością.

W jądrze podstawno-bocznym neurony NOS-ir występują sporadycznie (ryc. 19C).

Jednocześnie, przez cały badany okres obserwuje się neurony NOS-ir lokalizujące się wzdłuż granic jąder: bocznego i podstawno-bocznego. Są to intensywnie wybarwione, dwubiegunowe komórki o owalnym bądź wrzecionowatym ciele komórkowym i dendrytach zorientowanych grzbietowo-brzusznym, wzdłuż włókien otaczających zespół podstawno-boczny (ryc. 19D).

Jądro środkowe

Liczne komórki NOS-ir obserwuje się w jądrze środkowym przez cały badany okres; lokalizują się one w części przyśrodkowej struktury. Są to niewielkie dwubiegunowe neurony o owalnym, okrągłym lub wrzecionowatym kształcie perikarionu i dużym jądrze (ryc. 19E). Dłuższa oś tych neuronów jest często zorientowana w kierunku grzbietowo-brzusznym. Obserwuje się również neurony wielobiegunowe (ryc. 19E). Do P21 charakteryzują się intensywną immunobarwnością, która od P90 wyraźnie się zmniejsza.

Jądro przyśrodkowe

Część brzuszna – neurony NOS-ir obserwuje się w MeV przez cały badany okres – od P7 stanowią populację o bardzo dużej gęstości. Są to neurony o owalnym, okrągłym lub wrzecionowatym (rzadziej trójkątnym) ciele komórkowym, dużym jądrze i stosunkowo wąskim rąbku cytoplazmy (ryc. 19G). Do P21 przeważają komórki o dobrze widocznych wypustkach, często odchodzących z przeciwnych biegunów ciała komórkowego (ryc. 19F); w późniejszym okresie NOS-immunoreaktywność wypustek znacząco się zmniejsza (ryc. 19G). U zwierząt starych ($\geq$ P360) zmniejsza się również immunobarwność ciała komórkowego.

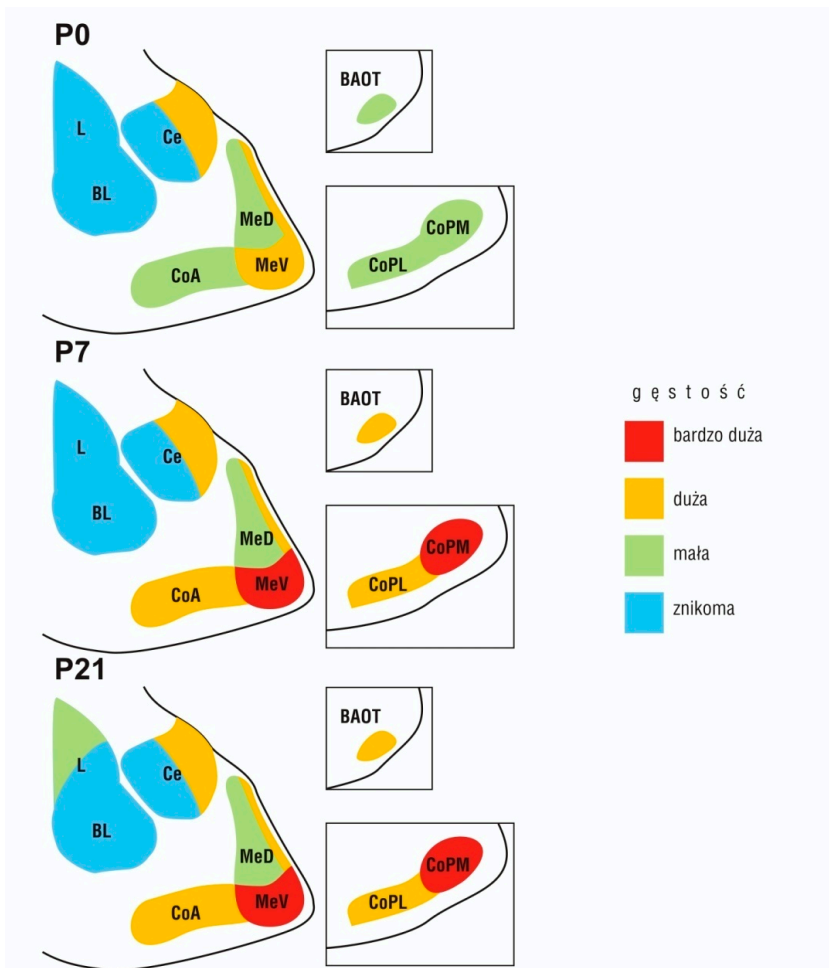
Część grzbietowa – neurony NOS-ir obserwuje się w MeD przez cały badany okres. Stosunkowo licznie lokalizują się one wzdłuż granicy przyśrodkowej jądra; w części bocznej MeD jest ich wyraźnie mniej. Pod względem morfologii, neurony NOS-ir grzbietowej części jądra przyśrodkowego to dwubiegunowe owalne i wrzecionowate komórki o dużych, dobrze widocznych jądrach i dendrytach zorientowanych grzbietowo-brzuszenie (lokalizują się głównie wzdłuż granicy przyśrodkowej; ryc. 19I) oraz wielobiegunowe o ciałach owalnych, trójkątnych bądź wielobocznych, zwykle z 3-5 dendrytami odchodzącymi od perikarionu (występują głównie w części bocznej MeD; ryc. 19H).

Jądro łożyskowe dodatkowego pasma węchowego

W P0 i P4 neurony NOS-ir występują w BAOT nielicznie. W drugim tygodniu życia postnatalnego (pomiędzy P7 a P14) następuje wyraźny wzrost ich gęstości; duża gęstość neuronów NOS-ir utrzymuje się do końca badanego okresu. Są to dwu- i wielobiegunowe neurony owalne, okrągłe lub wrzecionowate (rzadziej trójkątne), charakteryzujące się dużym jądrem (ryc. 19J); dendryty są słabo uwidocznione (ewentualnie widać miejsce ich odejścia i odcinek proksymalny; ryc. 19J).

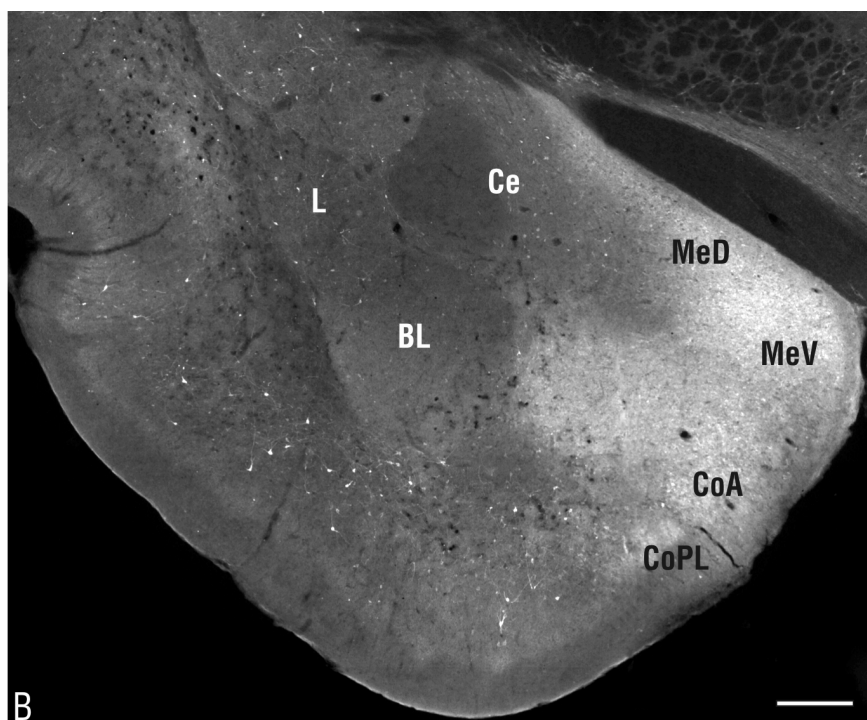
Jądra korowe

W P0, neurony NOS-ir występują w jądrach korowych stosunkowo nielicznie. W pierwszym tygodniu życia po urodzeniu ich gęstość wyraźnie wzrasta, zwłaszcza w jądrze korowym tylnym przyśrodkowym – od P7 stanowią populację o bardzo dużej gęstości. Jednocześnie przez cały badany okres komórki NOS-ir jąder korowych (szczególnie korowych tylnych) charakteryzują się stosunkowo niewysoką immunoreaktywnością – u zwierząt starszych ($\geq P360$) widać jedynie zarysy neuronów. Pod względem morfologii, neurony NOS-ir jąder korowych to wielobiegunowe, rzadziej dwubiegunowe, owalne, okrągłe lub wielokształtne komórki o dużych jądrach i widocznych początkowych odcinkach wypustek odchodzących od ciała komórkowego (ryc. 19K). Do P7 obserwuje się również neurony jednobiegunowe.



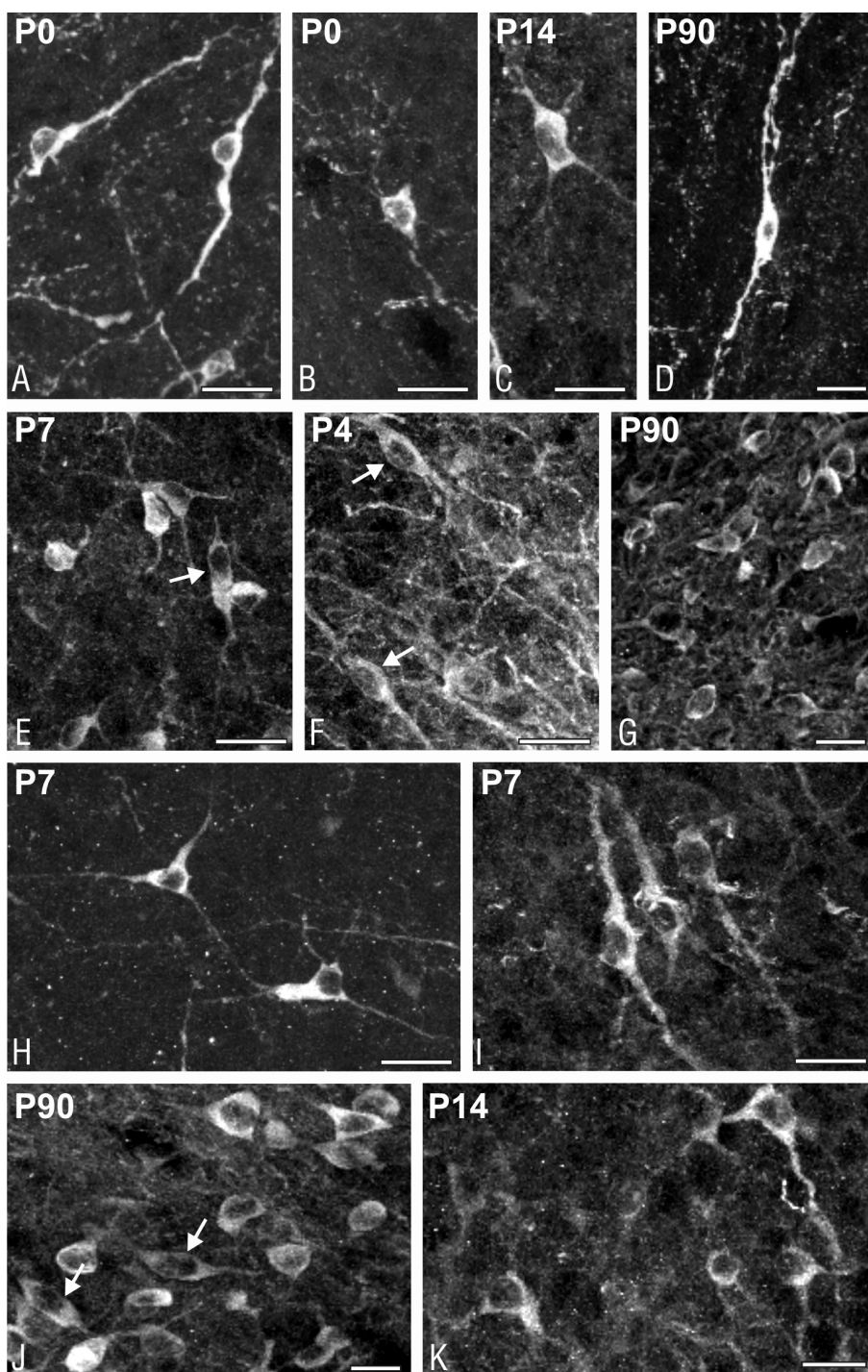
Ryc. 17. Ogólny schemat występowania i rozmieszczenia komórek zawierających syntazę tlenku azotu w badanych jądrach ciała migdałowatego szczura w wybranych grupach wiekowych. Schemat obserwowany w P21 utrzymywał się w kolejnych grupach wiekowych (>P21). Skróty: BAOT – jądro łożyskowe dodatkowego pasma węchowego, BL – jądro podstawno-boczne, Ce – jądro środkowe, CoA – jądro korowe przednie, CoPL – jądro korowe tylne boczne, CoPM – jądro korowe tylne przyśrodkowe, L – jądro boczne, MeD – jądro przyśrodkowe - część grzbietowa, MeV – jądro przyśrodkowe - część brzuszna

Fig. 17. General diagram of the occurrence and distribution of the cells containing nitric oxide synthase in the examined nuclei of the rat's amygdaloid body in the selected age groups. The scheme observed in P21 did not change visibly in the remaining age groups (>P21). Abbreviations: BAOT – bed nucleus of the accessory olfactory tract, BL – basolateral nucleus, Ce – central nucleus, CoA – anterior cortical nucleus, CoPL – posterolateral cortical nucleus, CoPM – posteromedial cortical nucleus, L – lateral nucleus, MeD – medial nucleus - dorsal part, MeV – medial nucleus - ventral part



Ryc. 18. Neurony zawierające syntazę tlenku azotu w ciele migdałowatym szczura w P90. Przekrój czołowy. Skróty: BL – jądro podstawno-boczne, Ce – jądro środkowe, CoA – jądro korowe przednie, CoPL – jądro korowe tylne boczne, L – jądro boczne, MeD – jądro przyśrodkowe - część grzbietowa, MeV – jądro przyśrodkowe - część brzuszna. Długość skali = 250 μ m

Fig. 18. Neurons containing nitric oxide synthase in the rat's amygdaloid body at P90. Coronal section. Abbreviations: BL – basolateral nucleus, Ce – central nucleus, CoA – anterior cortical nucleus, CoPL – posterolateral cortical nucleus, L – lateral nucleus, MeD – medial nucleus - dorsal part, MeV – medial nucleus - ventral part. Scale bar=250 μ m



Ryc. 19 / Fig. 19

Ryc. 19. Neurony zawierające syntazę tlenu azotu w wybranych jądrach ciała migdałowego szczura. **Jądro boczne:** (A) dwubiegunowe neurony o okrągłych perikarionach i grubych wypustkach oraz (B) wielobiegunowa komórka o trójkątnym ciele komórkowym. **Jądro podstawno-boczne:** (C) wielobiegunowy neuron z czterema dendrytami odchodzącymi od perikarionu oraz (D) dwubiegunowa komórka o wrzecionowatym ciele komórkowym i dendrytach zorientowanych grzbietowo-brzusznie, położona wzdłuż granicy BL. **Jądro środkowe:** (E) dwubiegunowy, wrzecionowaty neuron (strzałka) oraz komórki wielobiegunowe. **Jądro przyśrodkowe – część brzuszna:** (F) owalne neurony o grubych, dobrze widocznych wypustkach odchodzących z przeciwległych biegunów ciała komórkowego (strzałki) oraz (G) neurony o zróżnicowanej morfologii perikarionów (owalne, okrągłe, trójkątne), dużym jądrze i wąskim rąbku cytoplazmy; charakterystyczna dla wieku dorosłego słaba immunobarwność wypustek. **Jądro przyśrodkowe – część grzbietowa:** (H) komórki wielobiegunowe oraz (I) dwubiegunowe, owalne i okrągłe neurony o grubych, zorientowanych grzbietowo-brzusznie wypustkach. **Jądro łożyskowe dodatkowego pasma węchowego:** (J) dwu- (strzałki) i wielobiegunowe neurony o zróżnicowanej morfologii perikarionów i słabo widocznych wypustkach. **Jądro korowe tylne przyśrodkowe:** (K) wielobiegunowe neurony o okrągłych i trójkątnych perikarionach (liczne o słabej immunobarwności). Długość skali = 20 µm

Fig. 19. Neurons containing nitric oxide synthase in the selected nuclei of the amygdaloid body of the rat. **Lateral nucleus:** (A) bipolar neurones of round bodies and thick processes and (B) multipolar cell of triangular body. **Basolateral nucleus:** (C) multipolar neuron with four dendrites emanating from somata and (D) bipolar cell of fusiform body and dendrites dorsal–ventral oriented, situated along the BL border. **Central nucleus:** (E) bipolar, oval or fusiform neurones (arrow) and multipolar cells. **Medial nucleus – ventral part:** (F) oval neurones with thick, visible processes emanating from opposite poles of the somata (arrows) and (G) neurones of variable shapes of the somata (oval, round, triangular), large nucleus and a thin rim of cytoplasm; low immunostaining of processes typical for adult. **Medial nucleus – dorsal part:** (H) multipolar cells and (I) bipolar, oval and round neurones with thick, dorsal–ventral oriented processes. **Bed nucleus of the accessory olfactory tract:** (J) bi- (arrows) and multipolar neurones of variable shapes of the somata and weakly visible processes. **Posteromedial cortical nucleus:** (K) multipolar neurones of round and triangular body (numerous weakly immunostained). Scale bar=20 µm

Podsumowanie:

- Ilość i rozmieszczenie komórek CR-ir w badanych jądrach ciała migdałowego nie zmieniają się zasadniczo od dnia urodzenia.
- Niewielki wzrost ilości wyznakowanych komórek obserwowano w populacjach neuronów CB-ir jąder środkowego, korowego przedniego oraz korowego tylnego przyśrodkowego. W zespole podstawno-bocznym w drugim tygodniu życia ilość neuronów CB-ir zmniejsza się, (ale nadal pozostaje duża, szczególnie w BL). Ilość i rozmieszczenie komórek zawierających CB w ciele migdałowatym stabilizuje się w trzecim tygodniu życia po urodzeniu.
- Komórki zawierające PV pojawiają się w ciele migdałowatym w drugim tygodniu życia po urodzeniu. Ich ilość i rozmieszczenie w badanych jądrach ustalają się w trzecim tygodniu życia po urodzeniu (jądra korowe tylne), bądź nieco później – pomiędzy P21 a P90 (pozostałe jądra).
- Wśród neuronów zawierających CaBPs przez cały badany okres w jądrach ciała migdałowego przeważają komórki typu 1 i 2. W pierwszym tygodniu życia po urodzeniu w niektórych jądrach (L, BL, Ce, Me, CoA) obserwowano również morfologicznie niedojrzałe, jednobiegunowe (nie występują po P7) i dwubiegunowe (wyraźnie liczniejsze niż w okresie późniejszym) neurony CR- i CB-ir, o poszerzonych początkowych odcinkach wypustek. Podobnych zmian jakościowych nie obserwowano w populacjach komórek PV-ir.
- Ilość i rozmieszczenie komórek zawierających NOS w większości badanych jąder ciała migdałowego ustalają się w pierwszym tygodniu życia po urodzeniu – w BL, MeD i Ce już w P0, natomiast w MeV, BAOT i jądrach korowych w P7.
- W badanych jądrach ciała migdałowego neurony NOS-ir to dwu- i wielobiegunowe komórki o zróżnicowanej morfologii perikarionu. W niektórych jądrach obserwuje się związane z wiekiem, wyraźne zmniejszenie immunobarwności ciał komórkowych (w Ce od P90, w MeV i jądrach korowych od P360) i wypustek (w MeV od P21).

4.2 Aktywacja jąder ciała migdałowego szczura po teście otwartego pola – analiza ilościowa

W badanych jądrach ciała migdałowego u zwierząt z grup kontrolnych stwierdzono jedynie pojedyncze komórki c-Fos-ir. Wszystkie niżej opisane wyniki uzyskano na podstawie analizy komórek jąder ciała migdałowego zwierząt grupy eksperymentalnej.

4.2.1 Porównanie jąder ciała migdałowatego pod względem gęstości neuronów c-Fos-ir w grupach wiekowych

Wykres obrazujący zmiany gęstości komórek c-Fos-ir w badanych jądrach ciała migdałowatego w zależności od wieku przedstawia rycina 20.

Dane ilościowe (średnia wartość numeryczna i wartość odchylenia standardowego) dotyczące gęstości komórek c-Fos-ir w badanych jądrach ciała migdałowatego w poszczególnych grupach wiekowych zawiera tabela 2.

P0 – P7

Różnice w gęstości neuronów c-Fos-ir pomiędzy badanymi jądrami ciała migdałowatego w grupach wiekowych P0, P4, P7 były znamienne statystycznie (p = odpowiednio: 0,0094, 0,0132, 0,0001).

W dniu urodzenia najwyższą gęstość neuronów c-Fos-ir obserwowano w jądrze korowym tylnym bocznym i korowym przednim; mniejsza gęstość komórek c-Fos-ir cechowała jądra: przyśrodkowe, środkowe i korowe tylne przyśrodkowe. W pozostałych jądrach, gęstość komórek c-Fos-ir była bardzo mała. Zarówno w P4, jak i w P7 nadal wysokie pobudzenie po OF przejawiały jądra korowe (szczególnie CoPL i CoA) oraz MeV; nadal względnie niska pozostawała w tym okresie aktywność komórek jąder: bocznego i podstawno-bocznego.

P14 – P90

Różnice w gęstości neuronów c-Fos-ir pomiędzy badanymi jądrami ciała migdałowatego w grupach wiekowych P14, P21, P90 były znamienne statystycznie (p = odpowiednio: 0,0001, 0,0001, 0,0187).

W okresie P14 – P90 we wszystkich badanych jądrach ciała migdałowatego obserwowano zwiększenie gęstości komórek c-Fos-ir. Gwałtowny wzrost aktywności w odpowiedzi na zastosowany bodziec obserwowano zwłaszcza w jądrze łożyskowym dodatkowego pasma węchowego, które od P14 charakteryzowało się najwyższą spośród badanych jąder gęstością neuronów c-Fos-ir. Nieco niższą (aczkolwiek też wysoką) aktywację wykazywały neurony jądra korowego przedniego (P14, P21) oraz obu części jądra przyśrodkowego: brzusznej i grzbietowej (od P21).

Niezmiennie najniższą gęstość komórek c-Fos-ir obserwowano w jądrach tworzących zespół podstawno-boczny (L, BL) oraz w jądrze środkowym.

P270 – P360

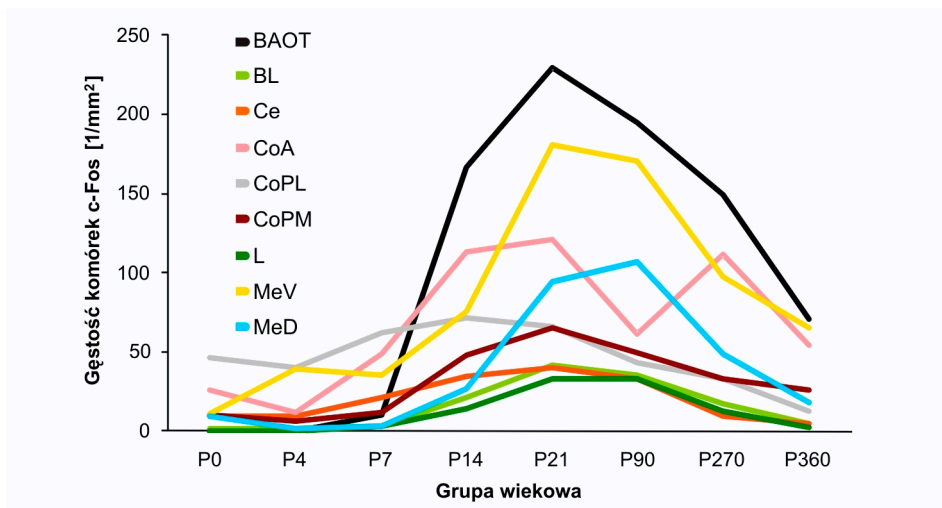
Różnice w gęstości neuronów c-Fos-ir pomiędzy badanymi jądrami ciała migdałowatego w grupie P270 były znamienne statystycznie (p = 0,00006), natomiast w grupie P360 były statystycznie nieistotne.

W P270 nadal wysoka gęstość neuronów c-Fos-ir charakteryzuje jądra: BAOT, korowe przednie i obie części jądra przyśrodkowego.

W P360 schemat c-Fos-immunoreaktywności badanych jąder ciała migdałowego w odpowiedzi na zastosowany bodziec awersyjny ulega znacznym zmianom – gęstość komórek c-Fos-ir we wszystkich badanych jądrach wyrównuje się.

P-720

Ekspozycja szczurów P720 w OF powoduje bardzo małą aktywację badanych jąder – pojedyncze komórki c-Fos-ir obserwowano w BL, Ce, BAOT, CoA i MeV.



Ryc. 20. Zmiany gęstości komórek c-Fos-ir w badanych jądrach ciała migdałowego szczura w okresie P0 – P360. Skróty: BAOT – jądro łożyskowe dodatkowego pasma węchowego, BL – jądro podstawno-boczne, Ce – jądro środkowe, CoA – jądro korowe przednie, CoPL – jądro korowe tylne boczne, CoPM – jądro korowe tylne przyśrodkowe, L – jądro boczne, MeD – jądro przyśrodkowe - część grzbietowa, MeV – jądro przyśrodkowe - część brzuszna

Fig. 20. Changes in c-Fos-ir cells density in the examined nuclei of the rat's amygdaloid body in period P0 – P360. Abbreviations: BAOT – bed nucleus of the accessory olfactory tract, BL – basolateral nucleus, Ce – central nucleus, CoA – anterior cortical nucleus, CoPL – posterolateral cortical nucleus, CoPM – posteromedial cortical nucleus, L – lateral nucleus, MeD – medial nucleus - dorsal part, MeV – medial nucleus - ventral part

Tab. 2. Średnia liczba komórek c-Fos-immunoreaktywnych ($\pm$ odchylenie standardowe) na 1 mm² w jądrach ciała migdałowego w poszczególnych grupach wiekowych

Tab. 2. Mean number of c-Fos-immunoreactive cells per 1 mm² ($\pm$ standard deviation) in the amygdaloid nuclei in studied age groups

	L	BL	Ce	BAOT	MeV	MeD	CoA	CoPL	CoPM
P0	0,2 $\pm$ 0,4	1,5 $\pm$ 1,8	9,2 $\pm$ 15,4		11,1 $\pm$ 5,0	9,5 $\pm$ 8,6	26,2 $\pm$ 12,8	46,6 $\pm$ 22,5	10,6 $\pm$ 6,9
P4	0,3 $\pm$ 0,8	1,2 $\pm$ 1,7	9,6 $\pm$ 10,0		39,3 $\pm$ 0,01	1,9 $\pm$ 0,01	12 $\pm$ 9,1	39,8 $\pm$ 0,01	6,6 $\pm$ 0,01
P7	3,3 $\pm$ 1,4	2,8 $\pm$ 0,5	21,2 $\pm$ 11,6	10,6 $\pm$ 4,7	35,7 $\pm$ 15,6	3,3 $\pm$ 1,5	48,9 $\pm$ 18	62,2 $\pm$ 12,4	11,6 $\pm$ 3,4
P14	13,8 $\pm$ 2,9	20,9 $\pm$ 6,5	34,3 $\pm$ 8,4	166,8 $\pm$ 76,1	75,8 $\pm$ 21	26,9 $\pm$ 20,4	113,6 $\pm$ 22,9	71,9 $\pm$ 11,4	47,8 $\pm$ 7,9
P21	32,9 $\pm$ 5,5	42 $\pm$ 3,8	40 $\pm$ 16,8	229,6 $\pm$ 61,9	180,6 $\pm$ 56,6	94,1 $\pm$ 34,9	121,3 $\pm$ 13,1	66 $\pm$ 9,9	65 $\pm$ 6,3
P90	33,3 $\pm$ 9,6	35,8 $\pm$ 17,5	33,2 $\pm$ 17,2	195 $\pm$ 87,2	170,8 $\pm$ 101	107,3 $\pm$ 77,8	61,2 $\pm$ 37,2	43,1 $\pm$ 29,8	49,7 $\pm$ 41,2
P270	12,2 $\pm$ 1,1	17,5 $\pm$ 0,8	9,8 $\pm$ 3,5	149,7 $\pm$ 11,7	97,7 $\pm$ 16	49,1 $\pm$ 13,1	111,9 $\pm$ 29,8	33,2 $\pm$ 13,7	32,7 $\pm$ 10,8
P360	2,2 $\pm$ 3,1	4,6 $\pm$ 0,1	5,1 $\pm$ 0,8	70,7 $\pm$ 45,7	65,5 $\pm$ 0,1	18,5 $\pm$ 2,3	54,1 $\pm$ 19,2	12,3 $\pm$ 3,4	25,9 $\pm$ 18,1

- Puste miejsce w tabeli wskazuje na brak komórek c-Fos-ir / Empty place in table indicates lack of c-Fos-ir cells.

- Różnice w gęstości neuronów c-Fos-ir pomiędzy jądrami ciała migdałowego w grupach wiekowych P0, P4, P7, P14, P21, P90, P270 są statystycznie istotne (wartości p zamieszczono w tekście) / Differences in the number of c-Fos-ir neurons per mm² between amygdaloid nuclei in studied age groups P0, P4, P7, P14, P21, P90, P270 are statistically significant (p values are placed in the text).

- Gęstości komórek c-Fos-ir w L, BL, Ce, BAOT, MeV, MeD, CoA, CoPL pomiędzy grupami wiekowymi różnią się istotnie (wartości p zamieszczono w tekście) / Differences in number of c-Fos-ir cells in L, BL, Ce, BAOT, MeV, MeD, CoA, CoPL between studied age groups are statistically significant (p-values are placed in the text).

Podsumowanie:

- W grupach wiekowych P0 – P270, jądra ciała migdałowego różnią się gęstością komórek c-Fos-ir.
- Wysoką aktywność w odpowiedzi na zastosowany bodziec awersyjny, wykazują jądra: część brzuszna jądra przyśrodkowego (P4-P360), korowe przednie (P7-P360) i łóżyskowe dodatkowego pasma węchowego (P14-P360).
- W grupie wiekowej P360 badane jądra nie wykazują zróżnicowania pod względem gęstości komórek c-Fos-ir.

4.2.2 Zmiany gęstości komórek c-Fos-ir w jądrach ciała migdałowego w zależności od wieku

Wykres obrazujący zmiany gęstości komórek c-Fos-ir w badanych jądrach ciała migdałowego w zależności od wieku przedstawia rycina 20.

Dane ilościowe (średnia wartość numeryczna i wartość odchylenia standardowego) dotyczące gęstości komórek c-Fos-ir w badanych jądrach ciała migdałowego, w określonych grupach wiekowych zawiera tabela 2.

Jądro boczne i podstawno-boczne

W jądrach: bocznym i podstawno-bocznym gęstość komórek c-Fos-ir w poszczególnych grupach wiekowych różniła się statystycznie znamienne (p= odpowiednio: 0,0001, 0,0002).

Do P4, c-Fos-immunoreaktywność w obu jądrach była bardzo mała. Wzrost gęstości komórek c-Fos-ir, który obserwowano od siódmego dnia po urodzeniu trwał odpowiednio do P21-P90 w L oraz P21 w BL, po czym nastąpiło stopniowe, ale systematyczne zmniejszanie się tego parametru, tak, że w P360 był on porównywalny do obserwowanego w P7. W P720 komórki c-Fos-ir występowały w tych jądrach sporadycznie.

Jądro środkowe

Gęstość komórek c-Fos-ir w jądrze środkowym w poszczególnych grupach wiekowych różniła się statystycznie znamienne (p= 0,0085).

Od P0 gęstość neuronów c-Fos-ir zwiększała się osiągając najwyższą wartość w P21. Od trzeciego tygodnia życia następuje systematyczny spadek gęstości neuronów c-Fos-ir, do poziomu pojedynczych komórek obserwowanych w Ce w P720.

Jądro łożyskowe dodatkowego pasma węchowego

Gęstość komórek c-Fos-ir w jądrze łożyskowym dodatkowego pasma węchowego w poszczególnych grupach wiekowych różniła się statystycznie znacząco ($p = 0,0095$).

Pierwsze, aczkolwiek nieliczne, neurony c-Fos-ir pojawiają się w BAOT pod koniec pierwszego tygodnia życia postnatalnego szczura, po czym następuje gwałtowny wzrost ich gęstości – parametr ten osiąga najwyższą wartość w P21. Od trzeciego tygodnia życia następuje systematyczny spadek gęstości komórek c-Fos-ir, aczkolwiek jeszcze w P360 ich gęstość jest w tym jądrze stosunkowo duża. W P720 w jądrze łożyskowym dodatkowego pasma węchowego obserwowano pojedyncze komórki c-Fos-ir.

Jądro przysrodkowe

Gęstość komórek c-Fos-ir w obu częściach jądra przysrodkowego w poszczególnych grupach wiekowych różniła się statystycznie znacząco (MeV $p = 0,0069$, MeD $p = 0,0062$).

Część brzuszna – od dnia urodzenia obserwuje się zwiększanie (pierwszy tydzień), a później gwałtowny wzrost gęstości komórek c-Fos-ir. Najwyższą wartość parametr ten osiąga w P21-P90, po czym gęstość aktywowanych komórek zmniejsza się, aczkolwiek w P360 nadal pozostaje względnie wysoka. W P720 występują pojedyncze komórki c-Fos-ir.

Część grzbietowa – ogólny schemat zmian w aktywacji komórek MeD po działaniu stresora jest zbliżony do obserwowanego w MeV, jednakże należy zaznaczyć, że gęstość komórek c-Fos-ir występujących w części grzbietowej w pierwszym tygodniu życia oraz w okresie P21-P90 jest niższa niż w brzusznej. W P720 w MeD obserwowano pojedyncze komórki c-Fos-ir.

Jądro korowe przednie

Gęstość komórek c-Fos-ir w jądrze korowym przednim w poszczególnych grupach wiekowych różniła się statystycznie znacząco ($p = 0,0032$).

Gęstość komórek c-Fos-ir w CoA zwiększa się od czwartego dnia życia po urodzeniu, osiąga wartość maksymalną w P14-P21, a następnie w P90 zmniejsza się. W przeciwieństwie do pozostałych jąder, w których od trzeciego miesiąca obserwowano zmniejszanie się gęstości aktywowanych komórek, w CoA gęstość neuronów c-Fos-ir w P270 była wyższa niż w P90, po czym nastąpiło ponowne zmniejszanie się wartości tego parametru. W P720 w jądrze korowym przednim występują pojedyncze komórki c-Fos-ir.

Jądro korowe tylne boczne

Gęstość komórek c-Fos-ir w jądrze korowym tylnym bocznym w poszczególnych grupach wiekowych nie różniła się statystycznie znacząco.

Gęstość komórek c-Fos-ir w CoPL, obserwowana w pierwszym tygodniu życia (relatywnie wysoka w porównaniu do pozostałych jąder), utrzymuje się na podobnym poziomie aż do P360. W P720 w jądrze korowym tylnym bocznym neurony c-Fos-ir obserwowano sporadycznie.

Jądro korowe tylne przyśrodkowe

Gęstość komórek c-Fos-ir w jądrze korowym tylnym przyśrodkowym w poszczególnych grupach wiekowych różniła się statystycznie znamienne (p=0,0079).

W pierwszym tygodniu życia szczura gęstość komórek c-Fos-ir w CoPM utrzymuje się na niskim poziomie; w ciągu następnych dwóch tygodni zwiększa się i osiąga wartość maksymalną w P21, a następnie systematycznie zmniejsza się. W P720 w jądrze korowym tylnym bocznym komórki c-Fos-ir występowały sporadycznie.

Podsumowanie:

Badane jądra ciała migdałowatego (z wyjątkiem jądra korowego tylnego bocznego), niezależnie od stopnia ich zaangażowania w odpowiedź na zastosowany bodziec awersyjny, charakteryzują się stosunkowo stałym schematem zmian zależnych od wieku. Zmiany te możemy podzielić na trzy okresy:

- P0 - P7 – który charakteryzuje się względnie niskim poziomem aktywności w odpowiedzi na zastosowany bodziec.
- P14 - P90 – w którym gęstość komórek c-Fos-ir zwiększa się, osiągając wartość maksymalną ok. trzeciego tygodnia życia.
- P270 - P360 – w którym następuje stopniowe zmniejszanie się gęstości komórek c-Fos-ir.

W jądrze korowym tylnym bocznym nie odnotowano statystycznie istotnych różnic w gęstości komórek c-Fos-ir pomiędzy grupami wiekowymi.

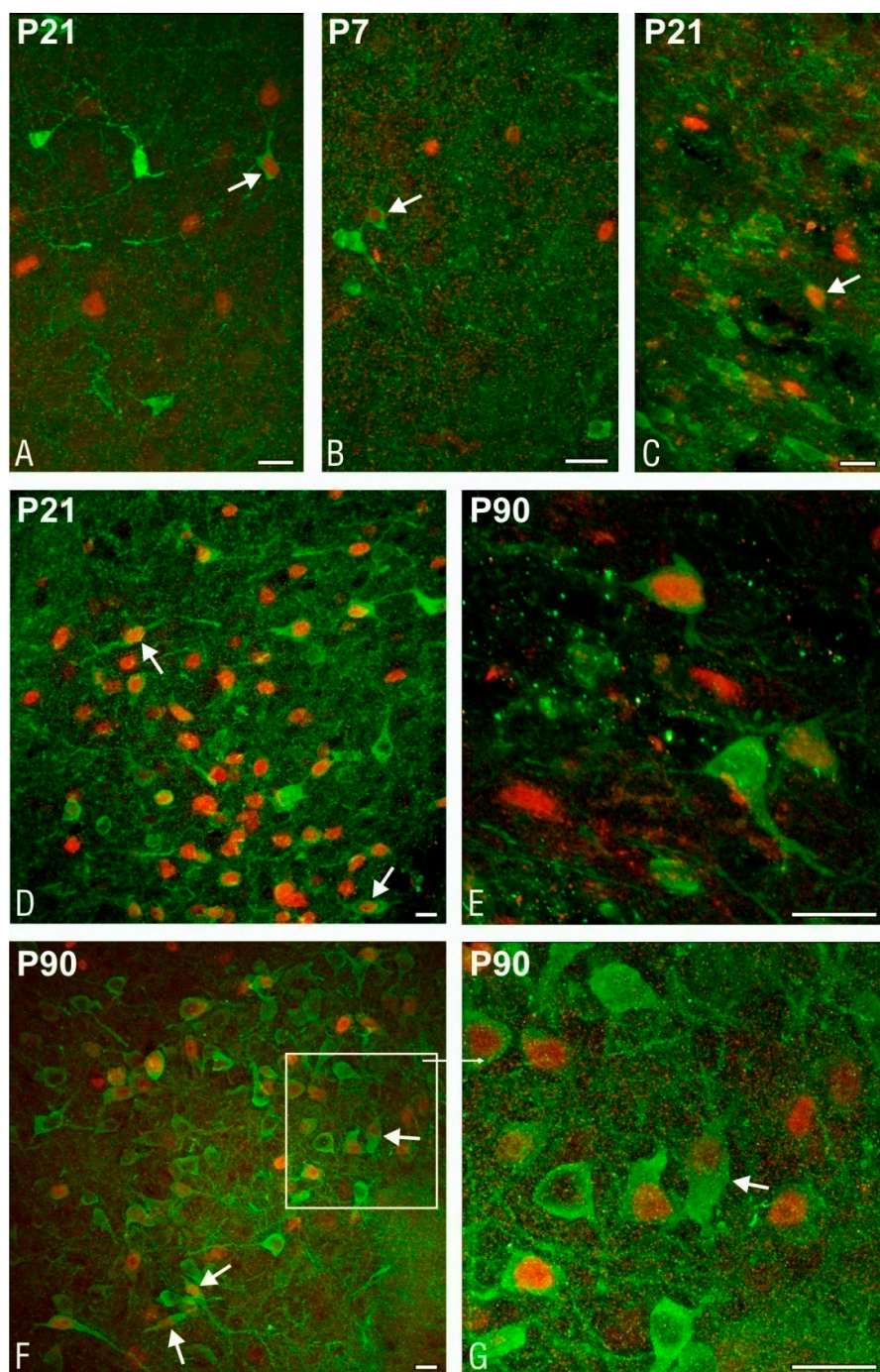
4.3 Aktywacja komórek zawierających białka wiążące wapń i syntazę tlenu azotu w jądrach ciała migdałowatego po teście otwartego pola

Wszystkie niżej opisane wyniki uzyskano na podstawie analizy komórek jąder ciała migdałowatego zwierząt grupy eksperymentalnej.

4.3.1 Morfologia komórek wykazujących podwójne wybarwienie c-Fos oraz kalretyniny, kalbindyny D-28k, parwalbuminy i syntazy tlenu azotu

Neurony c-Fos/CR

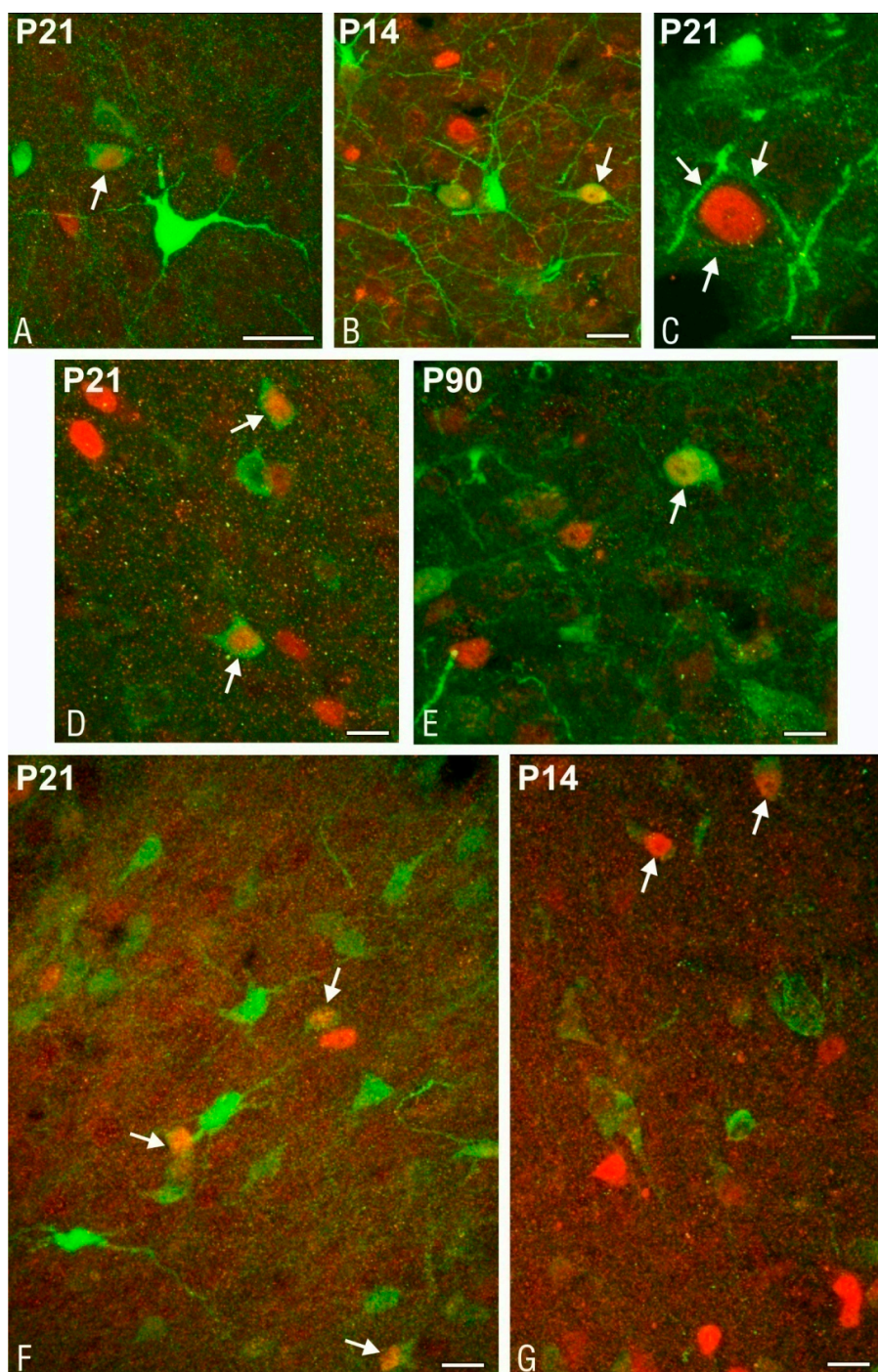
W jądrach: bocznym, podstawno-bocznym, środkowym, korowych tylnych oraz grzbietowej części jądra przyśrodkowego neurony CR-ir wykazujące podwójne wybarwienie z białkiem c-Fos to głównie charakterystyczne dla tych struktur wielobiegunowe komórki typu 1 i 2 (ryc. 21A, B, C), rzadziej 3. W części brzusznej jądra przyśrodkowego komórki c-Fos/CR to głównie małe, owalne neurony typu 1 oraz średnie (rzadziej duże) typu 2; obserwuje się również, ale zdecydowanie mniej licznie, dwubiegunowe, wrzecionowate neurony typu 3 (ryc. 21D, E). Morfologia licznych komórek c-Fos/CR w jądrze łożyskowym dodatkowego pasma węchowego jest zróżnicowana – są to przede wszystkim duże i średnie komórki typu 2 (wieloboczne, trójkątne i owalne), ale również małe neurony typu 1, o owalnych perikarionach oraz, rzadziej, dwubiegunowe, neurony typu 3 (ryc. 21F, G). W jądrze korowym przednim, podwójne wybarwienie c-Fos/CR wykazują głównie komórki typu 2, rzadziej typu 3 i incydentalnie typu 4.



Ryc. 21 / Fig. 21

Ryc. 21. Podwójne barwienie białka c-Fos (*kolor czerwony*) i kalretyniny (*kolor zielony*) w neuronach wybranych jąder ciała migdałowatego szczura. Wielobiegunowe komórki c-Fos/CR o zróżnicowanych kształtach perikarionów (strzałki) w: **(A) jądrze podstawno-bocznym, (B) jądrze środkowym oraz (C) grzbietowej części jądra przyśrodkowego**. Wielobiegunowe neurony c-Fos/CR o zróżnicowanej morfologii i wielkości perikarionów oraz dwubiegunowe komórki o wrzecionowatym bądź owalnym ciele komórkowym (strzałki) w: **(D, E) części brzusznej jądra przyśrodkowego oraz (F, G) jądrze łóżyskowym dodatkowego pasma węchowego**. Długość skali=20 μm

Fig. 21. Double staining of c-Fos protein (red) and calretinin (green) in neurons of selected nuclei of the amygdaloid body of the rat. Multipolar c-Fos/CR neurons of variable shapes of cell bodies (arrows) in: (A) basolateral nucleus, (B) central nucleus and (C) dorsal part of the medial nucleus. Multipolar c-Fos/CR cells of variable shapes and sizes of bodies and bipolar cells of fusiform or oval shapes of bodies (arrows) in: (D, E) dorsal part of the medial nucleus and (F, G) bed nucleus of the accessory olfactory tract. Scale bar=20 μm



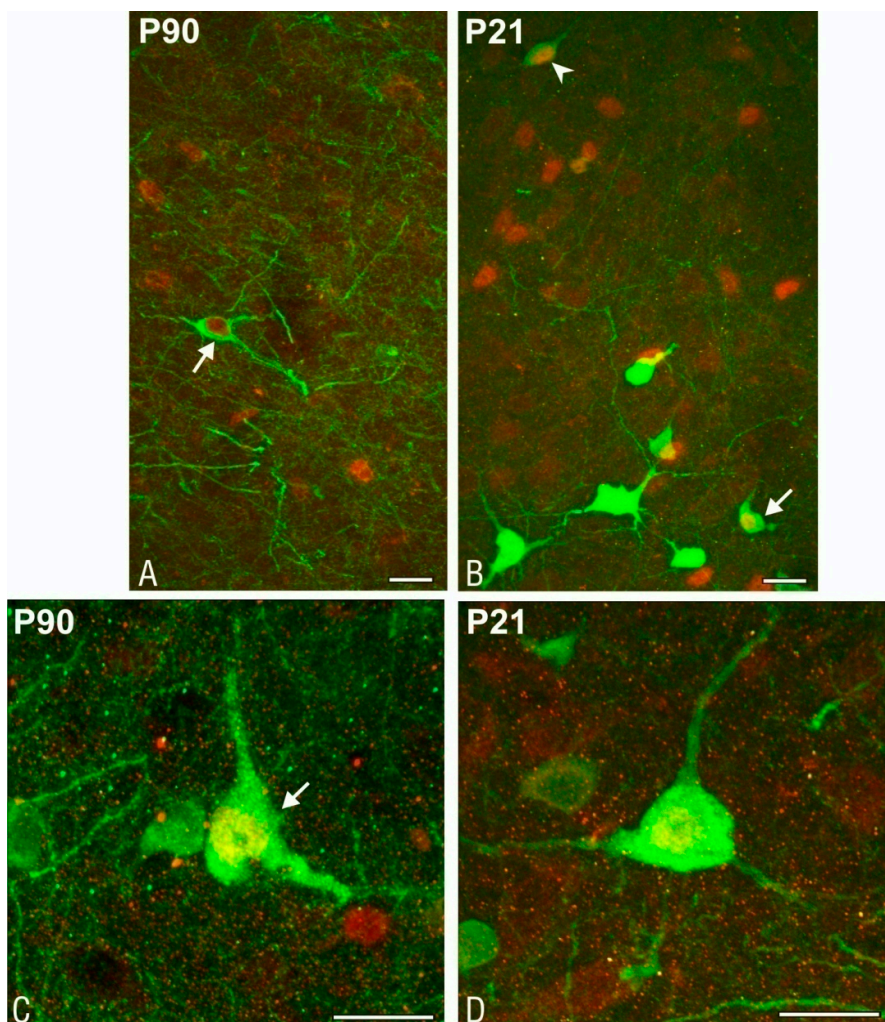
Ryc. 22 / Fig. 22

Neurony *c-Fos*/CB

W jądrach: bocznym i podstawno-bocznym, neurony CB-ir wykazujące immunoreaktywność białka *c-Fos* to małe i średnie komórki typu 1 i 2 (ryc. 22A); w BL występują również podwójnie wybarwione neurony typu 3 (ryc. 22B). Ponadto, w BL dość często obserwowano włókna CB-ir, które w postaci „koszyczków” oplatały perikariony niewybarwionych neuronów *c-Fos*+/CB- (ryc. 22C). Komórki *c-Fos*/CB w jądrze środkowym i łożyskowym dodatkowego pasma węchowego to głównie średnie, trójkątne lub wieloboczne neurony typu 2 (ryc. 22D), a w jądrach korowych – typu 1 i 2 o zróżnicowanej CB-immunobarwliwości. W jądrze przyśrodkowym, kolokalizację *c-Fos*/CB wykazywały głównie słabo wybarwione, małe neurony typu 1 (rzadziej średnie typu 2; ryc. 22E, F, G).

←
Ryc. 22. Podwójne barwienie białka *c-Fos* (kolor czerwony) i kalbindyny D-28k (kolor zielony) w neuronach wybranych jąder ciała migdałowatego szczura. Neurony *c-Fos*/CB w: (A) **jądrze bocznym** (komórka wielobiegunowa – strzałka) i (B) **jądrze podstawno-bocznym** (komórka dwubiegunowa – strzałka). (C) **Jądro podstawno-boczne** – włókna CB-ir tworzące „koszyczek” wokół perikarionu komórki *c-Fos*+/CB- (strzałki). (D) **Jądro środkowe** – wielobiegunowe komórki *c-Fos*/CB o różnej morfologii perikarionów (strzałki). Małe neurony *c-Fos*/CB o słabej CB-immunobarwliwości (strzałki) w: (E, F) **brzuszej i (G) grzbietowej części jądra przyśrodkowego**. Długość skali = 20 μ m

Fig. 22. Double staining of *c-Fos* protein (red) and calbindin D-28k (green) in neurons of selected nuclei of the amygdaloid body of the rat. *c-Fos*/CB neurons in: (A) **lateral nucleus** (multipolar cell – arrow) and (B) **basolateral nucleus** (bipolar cell – arrow). (C) **Basolateral nucleus** – CB-ir fibers form “basket” around somata of *c-Fos*+/CB- cell (arrow). (D) **Central nucleus** – multipolar *c-Fos*/CB cells of variable shapes of somata (arrows). Small *c-Fos*/CB neurons weakly CB-immunostained (arrows) in: (E, F) **ventral and (G) dorsal part of the lateral nucleus**. Scale bar = 20 μ m



Ryc. 23. Podwójne barwienie białka c-Fos (kolor czerwony) i parwalbuminy (kolor zielony) w neuronach wybranych jąder ciała migdałowatego szczura. **(A) Jądro boczne** – wielobiegunowa komórka c-Fos/PV. **(B, C) Neurony c-Fos/PV w jądrze podstawno-bocznym** – komórka dwubiegunowa o owalnym perikarionie (grot) oraz komórki wielobiegunowe o słabej c-Fos-immunoreaktywności (strzałki). **(D) Jądro korowe tylne boczne** – wielobiegunowy neuron c-Fos/PV o słabej c-Fos-immunoreaktywności. Długość skali = 20 μm

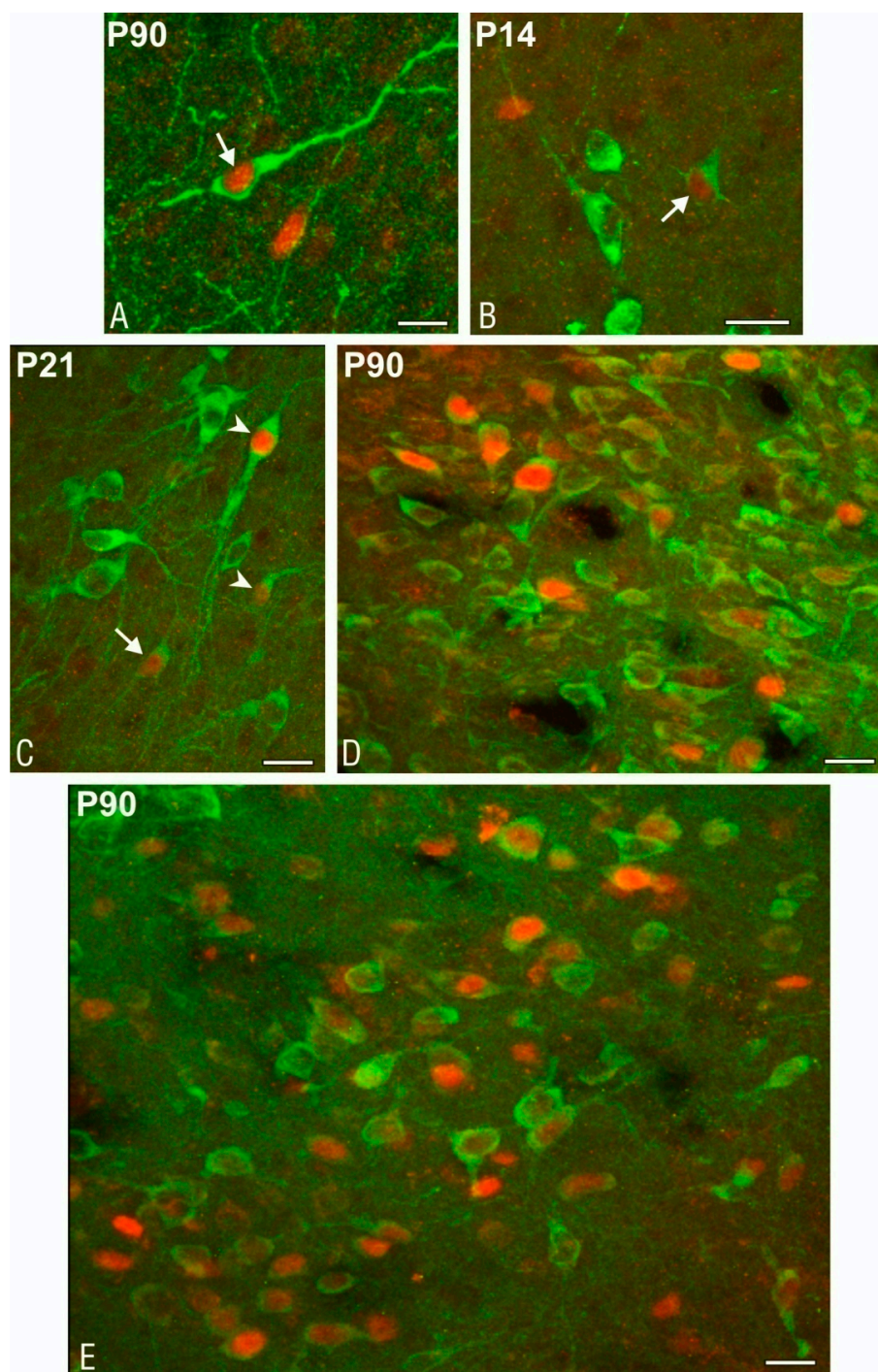
Fig. 23. Double staining of c-Fos protein (red) and parvalbumin (green) in neurons of selected nuclei of the amygdaloid body of the rat. **(A) Lateral nucleus** – multipolar c-Fos/PV cell. **(B, C) c-Fos/PV neurons in the basolateral nucleus** – bipolar cell of oval somata (arrow-head) and multipolar cells of low c-Fos-immunoreactivity (arrows). **(D) Posterolateral cortical nucleus** – multipolar c-Fos/PV of low c-Fos-immunoreactivity. Scale bar = 20 μm

Neurony c-Fos/PV

Nieliczne neurony c-Fos/PV jądra bocznego to komórki typu 1 i 2 (ryc. 23A). W jądrze podstawno-bocznym oprócz komórek c-Fos/PV typu 1 i 2 (niektóre z nich charakteryzują się niską c-Fos-immunoreaktywnością; ryc. 23B, C), obserwowano również dwubiegunowe, wrzecionowate neurony typu 3 (ryc. 23B). W jądrze korowym tylnym bocznym neurony c-Fos/PV to głównie komórki typu 2 (ryc. 23D).

Neurony c-Fos/NOS

Nieliczne neurony c-Fos/NOS w jądrach: bocznym, podstawno-bocznym i środkowym to dwu- lub wielobiegunowe neurony o owalnych bądź trójkątnych perikarionach (ryc. 24A, B). Wrzecionowate, dwubiegunowe komórki NOS-ir usytuowane wzdłuż granic L i BL nie wykazują podwójnego wybarwienia z białkiem c-Fos. W części grzbietowej jądra przyśrodkowego, c-Fos-immunoreaktywne jądra komórkowe obserwowano zarówno w dużych, dwubiegunowych neuronach o owalnych ciałach komórkowych, jak i w neuronach wielobiegunowych (ryc. 24C). Liczne komórki c-Fos/NOS w części brzusznej jądra przyśrodkowego mają różną wielkość i kształt perikarionów – okrągły, owalny i wrzecionowaty oraz trójkątny bądź wieloboczny (ryc. 24D). Podobna morfologia charakteryzowała komórki c-Fos/NOS obserwowane w jądrze łożyskowym dodatkowego pasma węchowego (ryc. 24E). W jądrach korowych podwójne wybarwienie c-Fos/NOS obserwowano głównie w komórkach o owalnych perikarionach i zróżnicowanej NOS-immunobarwliwości.



Ryc. 24 / Fig. 24

Podsumowanie:

- W badanych jądrach ciała migdałowego neurony c-Fos-ir wykazujące podwójne wybarwienie z białkami wiążącymi wapń to głównie komórki typu 1 i 2 (rzadziej 3).
- W żadnym z badanych jąder nie występują komórki c-Fos/CB typu 4; pojedyncze komórki c-Fos/CR typu 4 obserwowano w jądrze korowym przednim.
- Morfologia neuronów c-Fos/NOS w jądrach ciała migdałowego jest zróżnicowana.

Ryc. 24. Podwójne barwienie białka c-Fos (kolor czerwony) i syntazy tlenku azotu (kolor zielony) w neuronach wybranych jąder ciała migdałowego szczura. Neurony c-Fos/NOS w: **(A) jądrze bocznym** (komórka dwubiegunowa – strzałka) oraz **(B) jądrze środkowym** (komórka wielobiegunowa – strzałka). Dwubiegunowe neurony c-Fos/NOS o owalnych perikarionach (groty) oraz komórka wielobiegunowa (strzałka) w **(C) części grzbietowej jądra przyśrodkowego**. Liczne neurony c-Fos/NOS o różnej wielkości i morfologii perikarionów w: **(D) części brzusznej jądra przyśrodkowego** oraz **(E) jądrze łożyskowym dodatkowego pasma węchowego**. Długość skali = 20 μm

Fig. 24. Double staining of c-Fos protein (red) and nitric oxide synthase (green) in neurons of selected nuclei of the amygdaloid body of the rat. c-Fos/NOS neurons in: **(A) lateral nucleus** (bipolar cell – arrow) and **(B) central nucleus** (multipolar cell – arrow). Bipolar c-Fos/NOS neurons of oval somata (arrow-heads) and multipolar cell (arrow) in **(C) dorsal part of the medial nucleus**. Numerous c-Fos/NOS neurons of variable shapes and size of cell bodies in: **(D) ventral part of the medial nucleus** and **(E) bed nucleus of the of the accessory olfactory tract**. Scale bar = 20 μm

4.3.2 Porównanie jąder ciała migdałowatego pod względem gęstości i procentu komórek wykazujących podwójne wybarwienie c-Fos oraz kalretyniny, kalbindyny D-28k, parwalbuminy i stntazy tlenu azotu w grupach wiekowych

Wszystkie niżej opisane wyniki uzyskano na podstawie analizy komórek ciała migdałowatego zwierząt grupy eksperymentalnej.

Oceniano:

Gęstość komórek podwójnie wybarwionych – liczba komórek wykazujących występowanie białka c-Fos oraz odpowiednio CR, CB, PV lub NOS na mm² [1/mm²].

Procent komórek podwójnie wybarwionych – procent komórek c-Fos-ir zawierających jednocześnie określone białko w stosunku do wszystkich komórek c-Fos-ir.

Dane ilościowe (średnia wartość numeryczna i wartość odchylenia standardowego), dotyczące gęstości komórek c-Fos/CR, c-Fos/CB, c-Fos/PV, c-Fos/NOS w jądrach ciała migdałowatego w określonych grupach wiekowych zawierają odpowiednio tabele: 3, 4, 5, 6.

Dane ilościowe (średnia wartość numeryczna i wartość odchylenia standardowego), dotyczące procentu komórek podwójnie wybarwionych c-Fos/CR, c-Fos/CB, c-Fos/PV, c-Fos/NOS w jądrach ciała migdałowatego w określonych grupach wiekowych zawierają odpowiednio tabele: 7, 8, 9, 10.

P0 – P7

W pierwszym tygodniu życia po urodzeniu badane jądra ciała migdałowatego nie różniły się statystycznie istotnie zarówno pod względem procentu komórek podwójnie wybarwionych jak i gęstości komórek c-Fos/CR, c-Fos/CB, c-Fos/PV. Wartości obu parametrów były bardzo niskie.

Statystycznie istotna różnica procentu komórek podwójnie wybarwionych i gęstości komórek c-Fos/NOS ($p=$ odpowiednio: 0,012 i 0,012) występowała w P7. W tym okresie część brzuszna jądra przyśrodkowego wyraźnie dystansuje pozostałe jądra dużą gęstością i wysokim procentem komórek podwójnie wybarwionych c-Fos/NOS.

P14

W P14, jądra ciała migdałowatego nie różniły się istotnie pod względem gęstości i procentu komórek podwójnie wybarwionych c-Fos/CB i c-Fos/PV. Statystycznie istotne zróżnicowanie dotyczyło gęstości i procentu komórek po-

dwójnie wybarwionych c-Fos/CR ($p =$ odpowiednio: 0,002 i 0,0039) i c-Fos/NOS ($p =$ odpowiednio: 0,0007 i 0,0003).

c-Fos/CR – Bardzo duża gęstość i bardzo wysoki procent komórek podwójnie wybarwionych c-Fos/CR wyraźnie odróżnia jądro łożyskowe dodatkowego pasma węchowego od pozostałych części ciała migdałowatego. Stosunkowo wysokie wartości obu parametrów charakteryzują również część brzuszną jądra przyśrodkowego. Względnie wysoki procent komórek podwójnie wybarwionych obserwowano również w jądrze podstawo-bocznym i części grzbietowej jądra przyśrodkowego, ale gęstość komórek c-Fos/CR była w nich mała.

c-Fos/NOS – Bardzo dużą gęstością komórek c-Fos/NOS i bardzo wysokim procentem komórek podwójnie wybarwionych (oba parametry zdecydowanie wyższe niż w innych jądrach), charakteryzuje się w tym okresie jądro łożyskowe dodatkowego pasma węchowego. Duża gęstość i wysoki procent komórek podwójnie wybarwionych c-Fos/NOS cechowały również brzuszną część jądra przyśrodkowego oraz jądro korowe tylne przyśrodkowe.

P21

W P21 jądra ciała migdałowatego nie różniły się statystycznie istotnie pod względem gęstości i procentu komórek podwójnie wybarwionych c-Fos/CB i c-Fos/PV. Statystycznie istotne zróżnicowanie dotyczyło gęstości i procentu komórek podwójnie wybarwionych c-Fos/CR ($p =$ odpowiednio: 0,0014 i 0,0023) i c-Fos/NOS ($p =$ 0,0001 i 0,0001).

c-Fos/CR – Duża gęstość i bardzo wysoki procent komórek podwójnie wybarwionych c-Fos/CR nadal odróżnia jądro łożyskowe dodatkowego pasma węchowego od pozostałych części ciała migdałowatego. Dość wysoki procent komórek podwójnie wybarwionych (choć niższy niż w BAOT), obserwowano również w BL, CoA i MeD, ale gęstość komórek c-Fos/CR była w nich mała.

c-Fos/NOS – Bardzo dużą gęstością i bardzo wysokim procentem komórek podwójnie wybarwionych c-Fos/NOS charakteryzowały się w tym okresie: jądro łożyskowe dodatkowego pasma węchowego oraz część brzuszną jądra przyśrodkowego.

P90

W P90, jądra ciała migdałowatego nie różniły się statystycznie istotnie pod względem gęstości i procentu komórek podwójnie wybarwionych c-Fos/CB i c-Fos/PV. Statystycznie istotne zróżnicowanie dotyczyło gęstości i procentu komórek podwójnie wybarwionych c-Fos/CR ($p =$ odpowiednio: 0,0019 i 0,0047) i c-Fos/NOS ($p =$ odpowiednio: 0,0049 i 0,0057).

c-Fos/CR – Duża gęstość i bardzo wysoki procent komórek podwójnie wybarwionych c-Fos/CR nadal wyróżnia jądro łożyskowe dodatkowego pasma węchowego. Nieco wyższymi niż w pozostałych jądrach, ale zdecydowanie niższymi niż w BAOT, wartościami tych parametrów cechuje się MeV.

c-Fos/NOS – Jądro łożyskowe dodatkowego pasma węchowego oraz część brzuszna jądra przyśrodkowego, dużą gęstością komórek c-Fos/NOS i bardzo wysokim procentem komórek podwójnie wybarwionych nadal wyróżniają się spośród badanych jąder ciała migdałowego.

P270

W P270 jądra ciała migdałowego nie różniły się statystycznie istotnie gęstością i procentem komórek podwójnie wybarwionych c-Fos/PV. Statystycznie istotne zróżnicowanie dotyczyło gęstości i procentu komórek podwójnie wybarwionych c-Fos/CR ($p =$ odpowiednio: 0,0005 i 0,0025), c-Fos/NOS ($p =$ 0,0008), c-Fos/CB ($p =$ odpowiednio: 0,0087 i 0,0405).

c-Fos/CR, c-Fos/NOS – Schemat zróżnicowania jąder ciała migdałowego pod względem gęstości i procentu komórek podwójnie wybarwionych c-Fos/CR i c-Fos/NOS nie różnił się zasadniczo od opisanego w P90.

c-Fos/CB – Wyższa niż w pozostałych jądrach (aczkolwiek względnie niska), gęstość komórek c-Fos/CB cechowała obie części jądra przyśrodkowego. Relatywnie wysoki procent komórek podwójnie wybarwionych c-Fos/CB wykazywały w tym okresie jądra: podstawno-boczne, środkowe i korowe tylne.

P360

W P360, jądra ciała migdałowego nie różniły się statystycznie istotnie pod względem gęstości i procentu komórek podwójnie wybarwionych c-Fos/CR, c-Fos/CB, c-Fos/PV i c-Fos/NOS.

Tab. 3. Średnia liczba komórek wykazujących podwójne wybarwienie c-Fos/CR na 1 mm² ($\pm$ odchylenie standardowe) w jądrach ciała migdałowatego w poszczególnych grupach wiekowych

Tab. 3. *Mean number of c-Fos/CR double stained cells per 1 mm² ($\pm$ standard deviation) in the amygdaloid nuclei in studied age groups*

	L	BL	Ce	BAOT	MeV	MeD	CoA	CoPL	CoPM
P0		0	0		0	0	0,9 $\pm$ 1,1	1,3 $\pm$ 2,2	0
P4					0	0	0	0	
P7	0	0,2 $\pm$ 0,4	0,3 $\pm$ 0,5	8,3 $\pm$ 11,8	1,3 $\pm$ 1,7	0	0	0	0
P14	0,4 $\pm$ 0,4	3,3 $\pm$ 3,8	0,9 $\pm$ 1,2	121,5 $\pm$ 64,6	39,2 $\pm$ 24	5,8 $\pm$ 8,5	14,3 $\pm$ 13,3	0,2 $\pm$ 0,4	2,3 $\pm$ 3,0
P21	1 $\pm$ 1,4	7,6 $\pm$ 2,2	2,1 $\pm$ 4,2	108,8 $\pm$ 33,4	9,2 $\pm$ 4,5	6,5 $\pm$ 3,7	7,7 $\pm$ 5,5	1,2 $\pm$ 0,8	0
P90	0,3 $\pm$ 0,2	1,2 $\pm$ 1,0	0,3 $\pm$ 0,5	97,1 $\pm$ 19,1	16,7 $\pm$ 9,8	5,9 $\pm$ 3,6	1 $\pm$ 1,4	2,2 $\pm$ 1,6	1,3 $\pm$ 1,9
P270	0	0,2 $\pm$ 0,2	0,1 $\pm$ 0,8	82,7 $\pm$ 21,8	7,7 $\pm$ 5,5	1,1 $\pm$ 0,9	4,7 $\pm$ 3,3	0,4 $\pm$ 0,5	0,3 $\pm$ 0,7
P360				30 $\pm$ 9,5	17,3 $\pm$ 4,7	0	3,6 $\pm$ 1,2	0	1 $\pm$ 1,4

- Puste miejsce w tabeli wskazuje na brak komórek c-Fos-ir / Empty place in table indicates lack of c-Fos-ir cells

- Statystycznie istotne różnice w gęstości komórek c-Fos/CR pomiędzy jądrami ciała migdałowatego występują w grupach wiekowych P14, P21, P90 oraz P270 (wartości *p* zamieszczono w tekście) / Statistically significant differences in the number of c-Fos/CR double stained cells between amygdaloid nuclei are present in following age groups: P14, P21, P90 and P270 (*p* values are place in the text).

Tab. 4. Średnia liczba komórek wykazujących podwójne wybarwienie c-Fos/CB na 1 mm² ($\pm$ odchylenie standardowe) w jądrach ciała migdałowatego w poszczególnych grupach wiekowych

Tab. 4. Mean number of c-Fos/CB double stained cells per 1mm² ($\pm$ standard deviation) in the amygdaloid nuclei in studied age groups

	L	BL	Ce	BAOT	MeV	MeD	CoA	CoPL	CoPM
P0	0	0	0		3,1 $\pm$ 4,4	0	0	3,4 $\pm$ 0,2	0
P4	0		0		0	0		5,8 $\pm$ 0,1	0
P7	0,8 $\pm$ 1,2	0,3 $\pm$ 0,4	3,3 $\pm$ 4,1	0	5,8 $\pm$ 4,5	1,4 $\pm$ 1,6	1,2 $\pm$ 1,4	1,5 $\pm$ 2,6	0,7 $\pm$ 1,3
P14	0,2 $\pm$ 0,4	1,4 $\pm$ 1,3	9,0 $\pm$ 6,2	7,5 $\pm$ 10,6	4,5 $\pm$ 2,3	1,8 $\pm$ 2,1	18,9 $\pm$ 29	11,9 $\pm$ 16,9	8,4 $\pm$ 8,2
P21	6,4 $\pm$ 4,1	8,6 $\pm$ 4,8	7,4 $\pm$ 2,3	21,4 $\pm$ 21,5	35,3 $\pm$ 6,0	21,3 $\pm$ 7,3	7,7 $\pm$ 3,8	5,9 $\pm$ 9,8	8,1 $\pm$ 7,3
P90	3,3 $\pm$ 1,6	6,2 $\pm$ 2,7	5,4 $\pm$ 2,7	24,6 $\pm$ 6,3	10,4 $\pm$ 5,0	7,4 $\pm$ 5,0	4,7 $\pm$ 7,6	5 $\pm$ 3,8	8 $\pm$ 8,1
P270	0,8 $\pm$ 0,5	3,5 $\pm$ 2,0	1,8 $\pm$ 2,2	1,3 $\pm$ 2,5	8,8 $\pm$ 4,4	7,8 $\pm$ 1,6	1,2 $\pm$ 1,5	4,8 $\pm$ 1,7	4,4 $\pm$ 4,5
P360			0,9 $\pm$ 1,2	0	0		0		0

- Puste miejsce w tabeli wskazuje na brak komórek c-Fos-ir / Empty place in table indicates lack of c-Fos-ir cells.

- Statystycznie istotne różnice w gęstości komórek c-Fos/CB pomiędzy jądrami ciała migdałowatego występują w grupie wiekowej P270 (wartości *p* zamieszczono w tekście) / Statistically significant differences in the number of c-Fos/CB double stained cells between amygdaloid nuclei are present in age groups P270 (*p* values are place in the text).

Tab. 5. Średnia liczba komórek wykazujących podwójne wybarwienie c-Fos/PV na 1 mm² ($\pm$ odchylenie standardowe) w jądrach ciała migdałowatego w poszczególnych grupach wiekowych

Tab. 5. Mean number of c-Fos/PV double stained cells per 1mm² ($\pm$ standard deviation) in the amygdaloid nuclei in studied age groups

	L	BL	CoA	CoPL	CoPM
P14	0,4 $\pm$ 0,5	0,3 $\pm$ 0,4		8,5 $\pm$ 12,3	
P21	4,5 $\pm$ 5,1	4,6 $\pm$ 2,6	0,7 $\pm$ 0,8	0,9 $\pm$ 1,0	0,4 $\pm$ 0,7
P90	1,03 $\pm$ 0,7	2,3 $\pm$ 1,8		1,3 $\pm$ 1,6	
P270	2,5 $\pm$ 0,8	2,2 $\pm$ 1,2	2,1 $\pm$ 2,9	0	0
P360	0	0,2 $\pm$ 0,2		0	

- Puste miejsce w tabeli wskazuje na brak komórek c-Fos-ir / Empty place in table indicates lack of c-Fos-ir cells.

- Różnice w gęstości neuronów wykazujących podwójnie wybarwienie c-Fos/PV pomiędzy jądrami ciała migdałowatego w poszczególnych grupach wiekowych nie są znamienne statystycznie / Differences in the number of double stained c-Fos/PV cells between amygdaloid nuclei in each age groups are not statistically significant.

Tab. 6. Średnia liczba komórek wykazujących podwójne wybarwienie c-Fos/NOS na 1 mm² ($\pm$ odchylenie standardowe) w jądrach ciała migdałowatego w poszczególnych grupach wiekowych

Tab. 6. *Mean number of c-Fos/NOS double stained cells per 1mm² ($\pm$ standard deviation) in the amygdaloid nuclei in studied age groups*

	L	BL	Ce	BAOT	MeV	MeD	CoA	CoPL	CoPM
P0			0		0	0	0	0	0
P4	0	0,2 $\pm$ 0,5	0						0
P7	0	0	0	0	22,9 $\pm$ 18,2	0	0,2 $\pm$ 0,4	1,0 $\pm$ 1,1	0,3 $\pm$ 0,6
P14	0	0	0,1 $\pm$ 0,2	133,4 $\pm$ 121,0	48,7 $\pm$ 40,8	11,3 $\pm$ 15,0	18,3 $\pm$ 20,8	4,9 $\pm$ 4,7	39,6 $\pm$ 34,9
P21	0,2 $\pm$ 0,3	0,3 $\pm$ 0,7	0	227,8 $\pm$ 65,2	151,6 $\pm$ 46,2	16,0 $\pm$ 12,4	12,47 $\pm$ 4,7	0	0,4 $\pm$ 0,8
P90	1,5 $\pm$ 1,3	0	0	176,8 $\pm$ 50,2	70,5 $\pm$ 28,2	12,2 $\pm$ 6,6	4,6 $\pm$ 4,8	0	0,5 $\pm$ 0,7
P270	0,3 $\pm$ 0,2	0,6 $\pm$ 0,4	0,4 $\pm$ 0,3	98,6 $\pm$ 28,1	53,8 $\pm$ 6,7	5,5 $\pm$ 0,9	11,1 $\pm$ 11,0	0	1,9 $\pm$ 2,9
P360				32,3 $\pm$ 24,9	16,6 $\pm$ 7,4	1,1 $\pm$ 0,1	7,7 $\pm$ 3,9	1,0 $\pm$ 1,4	1,4 $\pm$ 2,0

- Puste miejsce w tabeli wskazuje na brak komórek c-Fos-ir / Empty place in table indicates lack of c-Fos-ir cells.

- Statystycznie istotne różnice w gęstości komórek c-Fos/NOS pomiędzy jądrami ciała migdałowatego występują w grupach wiekowych P14, P21, P90 oraz P270 (wartości p zamieszczono w tekście) / Statistically significant differences in the number of c-Fos/NOS double stained cells between amygdaloid nuclei are present in following age groups: P14, P21, P90 and P270 (p values are place in the text).

Tab. 7. Średni procent ($\pm$ odchylenie standardowe) podwójnie wybarwionych komórek c-Fos/CR w jądrach ciała migdałowatego w badanych grupach wiekowych

Tab. 7. Mean percentage ($\pm$ standard deviation) of c-Fos/CR double stained cells in the amygdaloid nuclei in studied age groups

	L	BL	Ce	BAOT	MeV	MeD	CoA	CoPL	CoPM
P0		0	0		0	0	2,1 $\pm$ 2,5	1,8 $\pm$ 3,0	0
P4			0		0	0	0	0	
P7	0	8,3 $\pm$ 14,4	0,7 $\pm$ 1,5	33,3 $\pm$ 47,1	4,7 $\pm$ 5,5	0	0	0	0
P14	3,2 $\pm$ 4,0	21,0 $\pm$ 21,4	2,6 $\pm$ 3,5	81,7 $\pm$ 9,0	40,6 $\pm$ 17,9	15,2 $\pm$ 14,9	12,4 $\pm$ 5,9	0,5 $\pm$ 1,0	6,1 $\pm$ 9,5
P21	4,0 $\pm$ 5,4	19,5 $\pm$ 4,7	3,8 $\pm$ 7,7	73,1 $\pm$ 14,6	6,3 $\pm$ 2,9	10,8 $\pm$ 8,9	10,8 $\pm$ 8,6	2,4 $\pm$ 1,8	0
P90	1,0 $\pm$ 0,6	5,4 $\pm$ 4,6	0,8 $\pm$ 1,6	68,5 $\pm$ 16,5	10,9 $\pm$ 5,9	9,4 $\pm$ 5,7	0,9 $\pm$ 1,2	2,6 $\pm$ 1,5	1,3 $\pm$ 1,9
P270	0	1,8 $\pm$ 2,0	1,0 $\pm$ 1,9	63,6 $\pm$ 10,7	9,1 $\pm$ 4,6	2,2 $\pm$ 1,7	4,8 $\pm$ 2,9	1,6 $\pm$ 1,9	1,9 $\pm$ 3,8
P360				79,4 $\pm$ 29,1	27,6 $\pm$ 9,1	0	11,5 $\pm$ 8,8	0	4,2 $\pm$ 5,9

- Puste miejsce w tabeli wskazuje na brak komórek c-Fos-ir / Empty place in table indicates lack of c-Fos-ir cells.

- Statystycznie istotne różnice procentu komórek podwójnie wybarwionych c-Fos/CR pomiędzy jądrami ciała migdałowatego występują w grupach wiekowych P14, P21, P90, P270 (wartości p zamieszczono w tekście) / Statistically significant differences in the percentage of double stained c-Fos/CR cells between amygdaloid nuclei are present in the following age groups: P14, P21, P90, P270 (p values are placed in the text).

Tab. 8. Średni procent ($\pm$ odchylenie standardowe) podwójnie wybarwionych komórek c-Fos/CB w jądrach ciała migdałowatego w badanych grupach wiekowych

Tab. 8. Mean percentage ($\pm$ standard deviation) of c-Fos/CB double stained cells in the amygdaloid nuclei in studied age groups

	L	BL	Ce	BAOT	MeV	MeD	CoA	CoPL	CoPM
P0	0	0	0		10,0 $\pm$ 14,1	0	0	14,2 $\pm$ 8,2	0
P4	0		0		0	0		12,5 $\pm$ 0,9	0
P7	16,7 $\pm$ 19,2	5,5 $\pm$ 6,9	9,5 $\pm$ 7,9	0	11,5 $\pm$ 8,9	26,7 $\pm$ 32,7	2,3 $\pm$ 2,8	2,0 $\pm$ 3,0	5,6 $\pm$ 9,6
P14	1,0 $\pm$ 1,5	6,4 $\pm$ 5,6	27,1 $\pm$ 15,2	2,0 $\pm$ 2,8	5,9 $\pm$ 2,1	9,7 $\pm$ 9,8	14,4 $\pm$ 19,6	17,1 $\pm$ 25,9	31,7 $\pm$ 30,8
P21	14,0 $\pm$ 5,8	17,8 $\pm$ 7,2	19,4 $\pm$ 9,2	7,9 $\pm$ 7,6	14,2 $\pm$ 1,5	21,7 $\pm$ 7,2	6,2 $\pm$ 2,5	5,5 $\pm$ 8,5	10,1 $\pm$ 7,5
P90	10,1 $\pm$ 3,4	18,7 $\pm$ 6,3	17,7 $\pm$ 5,1	9,4 $\pm$ 4,6	6,4 $\pm$ 2,4	6,2 $\pm$ 1,6	6,6 $\pm$ 9,2	17,3 $\pm$ 11,3	10,5 $\pm$ 7,2
P270	5,7 $\pm$ 4,0	19,1 $\pm$ 11,1	13,8 $\pm$ 17,7	0,9 $\pm$ 1,6	7,8 $\pm$ 2,2	12,9 $\pm$ 2,9	1,0 $\pm$ 1,2	12,0 $\pm$ 6,3	11,1 $\pm$ 10,5
P360			15,0 $\pm$ 21,2	0	0		0		0

- Puste miejsce w tabeli wskazuje na brak komórek c-Fos-ir / Empty place in table indicates lack of c-Fos-ir cells.

- Statystycznie istotne różnice procentu komórek podwójnie wybarwionych c-Fos/CB pomiędzy jądrami ciała migdałowatego występują jedynie w grupie wiekowej P270 (wartości p zamieszczono w tekście) / Statistically significant differences in the percentage of double stained c-Fos/CB cells between amygdaloid nuclei are present only in P270 group (p values are placed in the text).

Tab. 9. Średni procent ($\pm$ odchylenie standardowe) podwójnie wybarwionych komórek c-Fos/PV w jądrach ciała migdałowatego w badanych grupach wiekowych

Tab. 9. *Mean percentage ($\pm$ standard deviation) of c-Fos/PV double stained cells in the amygdaloid nuclei in studied age groups*

	L	BL	CoA	CoPL	CoPM
P14	2,7 $\pm$ 3,9	1,0 $\pm$ 1,4		14,2 $\pm$ 22,6	
P21	17,7 $\pm$ 23,5	10,3 $\pm$ 7,0	0,4 $\pm$ 0,3	1,5 $\pm$ 1,9	0,5 $\pm$ 0,8
P90	3,1 $\pm$ 1,7	5,8 $\pm$ 3,9		2,2 $\pm$ 2,5	
P270	13,9 $\pm$ 2,7	10,4 $\pm$ 4,1	2,4 $\pm$ 3,4	0	0
P360	0	3,8 $\pm$ 5,4		0	

- Puste miejsce w tabeli wskazuje na brak komórek c-Fos-ir / Empty place in table indicates lack of c-Fos-ir cells

- Jądra ciała migdałowatego w poszczególnych grupach wiekowych nie różnią się istotnie pod względem procentu komórek podwójnie wybarwionych c-Fos/PV / Percentage of double stained c-Fos/PV cells does not differ significantly between amygdaloid nuclei in studied age groups

Tab. 10. Średni procent ($\pm$ odchylenie standardowe) podwójnie wybarwionych komórek c-Fos/NOS w jądrach ciała migdałowatego w badanych grupach wiekowych

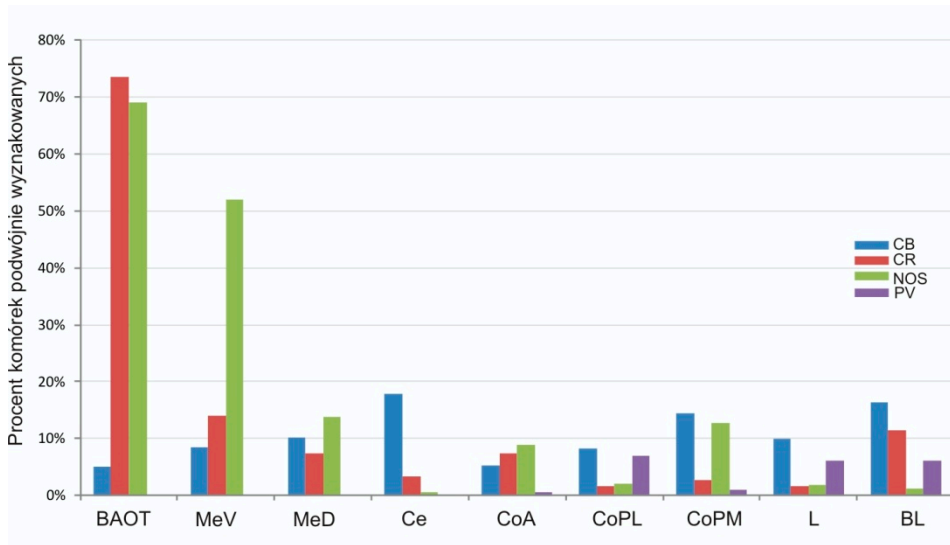
Tab. 10. Mean percentage ($\pm$ standard deviation) of double stained c-Fos/NOS cells in the amygdaloid nuclei in studied age groups

	L	BL	Ce	BAOT	MeV	MeD	CoA	CoPL	CoPM
P0			0		0	0	0	0	0
P4	0	12,5 $\pm$ 25,0	0						
P7	0	0	0	0	58,6 $\pm$ 30,0	0	0,6 $\pm$ 1,2	1,5 $\pm$ 1,9	2,8 $\pm$ 5,6
P14	0	0	0,9 $\pm$ 0,6	82,2 $\pm$ 13,8	63,7 $\pm$ 22,1	19,6 $\pm$ 11,2	13,9 $\pm$ 14,9	3,3 $\pm$ 2,9	40,9 $\pm$ 43,8
P21	0,3 $\pm$ 0,6	1,3 $\pm$ 2,5	0	81,9 $\pm$ 13,3	72,4 $\pm$ 7,1	15,2 $\pm$ 8,3	10,0 $\pm$ 3,6	0	1,0 $\pm$ 1,8
P90	3,8 $\pm$ 3,6	0	0	71,3 $\pm$ 14,2	52,9 $\pm$ 17,7	14,8 $\pm$ 5,6	6,4 $\pm$ 6,7	0	2,8 $\pm$ 3,9
P270	2,4 $\pm$ 1,6	2,8 $\pm$ 2,0	3,3 $\pm$ 2,2	66,0 $\pm$ 15,8	50,7 $\pm$ 3,6	11,5 $\pm$ 3,4	6,7 $\pm$ 5,6	0	3,8 $\pm$ 7,6
P360				30,8 $\pm$ 5,8	24,9 $\pm$ 11,9	4,2 $\pm$ 0,6	10,5 $\pm$ 2,8	3,8 $\pm$ 5,4	3,1 $\pm$ 4,3

- Puste miejsce w tabeli wskazuje na brak komórek c-Fos-ir / Empty place in table indicates lack of c-Fos-ir cells.

- Statystycznie istotne różnice procentu komórek podwójnie wybarwionych c-Fos/NOS pomiędzy jądrami ciała migdałowatego występują w grupach wiekowych P14, P21, P90, P270 (wartości p zamieszczono w tekście) / Statistically significant differences in the percentage of double stained c-Fos/NOS cells between amygdaloid nuclei are in P14, P21, P90, P270 group (p values are placed in the text).

Zestawiając wszystkie dane dotyczące procentu komórek podwójnie wybarwionych CR-, CB-, PV-, NOS/c-Fos w okresie P0 – P360, można stwierdzić, że jądra ciała migdałowatego szczura wykazują określone „preferencje” w aktywowaniu badanych populacji komórkowych pod wpływem zastosowanego bodźca (ryc. 25). W BAOT są to neurony zawierające NOS i CR, w MeV – NOS, w MeD i CoPM – NOS i CB, w CoA – NOS (ale również CR i CB), w L – CB, w BL – CB i CR, w Ce – CB, CoPL – CB i PV.



Ryc. 25. Komórki wykazujące podwójne wybarwienie c-Fos/-CR, -CB, -PV i NOS w jądrach ciała migdałowatego po OF – ogólne zestawienie procentowe w okresie P0 – P360. Skróty: BAOT – jądro łożyskowe dodatkowego pasma węchowego, BL – jądro podstawno-boczne, Ce – jądro środkowe, CoA – jądro korowe przednie, CoPL – jądro korowe tylne boczne, CoPM – jądro korowe tylne przyśrodkowe, L – jądro boczne, MeD – jądro przyśrodkowe - część grzbietowa, MeV – jądro przyśrodkowe - część brzuszna

Fig. 25. Cells revealing double staining c-Fos/-CR, -CB, -PV, -NOS in nuclei of the amygdaloid body after OF test – general percentage breakdown for period P0 – P360. Abbreviations: BAOT – bed nucleus of the accessory olfactory tract, BL – basolateral nucleus, Ce – central nucleus, CoA – anterior cortical nucleus, CoPL – posterolateral cortical nucleus, CoPM – posteromedial cortical nucleus, L – lateral nucleus, MeD – medial nucleus - dorsal part, MeV – medial nucleus - ventral part

Podsumowanie:

- W grupach wiekowych, od P0 do P360 (z wyjątkiem P270), analizowane jądra ciała migdałowatego nie różnią się pod względem gęstości i procentu komórek podwójnie wybarwionych c-Fos/CB, a wartości tych parametrów utrzymują się na względnie niskim poziomie. W większości grup wiekowych neurony c-Fos/CB badanych jąder stanowią najczęściej 10-20% wszystkich neuronów c-Fos-ir.
- W grupach wiekowych P14 – P360 jądra ciała migdałowatego, w których występuje PV nie różnią się pod względem gęstości i procentu komórek podwójnie wybarwionych c-Fos/PV, a wartości tych parametrów utrzymują się na względnie niskim poziomie. W L i BL komórki podwójnie wybarwione c-Fos/PV stanowiły do 10% obserwowanych tam komórek c-Fos-ir.
- Istotną rolę w zróżnicowaniu aktywacji jąder ciała migdałowatego pod wpływem OF odgrywają neurony zawierające kalretyninę oraz syntazę tlenu azotu. Pobudzenie komórek zawierających NOS w jądrze przyśrodkowym oraz NOS i CR w jądrze łożyskowym dodatkowego pasma węchowego może decydować o wyraźnie większej aktywacji tych jąder pod wpływem zastosowanego bodźca. Należy jednak podkreślić, że aktywne zaangażowanie powyższych populacji występuje zasadniczo od P7-P14. Aktywacja komórek NOS-ir i CR-ir w pozostałych jądrach ciała migdałowatego jest znacznie mniejsza.

5 DYSKUSJA

5.1 Ogólna charakterystyka komórek zawierających białka wiążące wapń oraz syntazę tlenku azotu w jądrach ciała migdałowatego

5.1.1 Neurony zawierające białka wiążące wapń

Na podstawie uzyskanych wyników mogę stwierdzić, że białka wiążące wapń w ciele migdałowatym szczura charakteryzują się zróżnicowanym czasowo-przestrzennym schematem występowania. Kalretynina i kalbindyna D-28k występują we wszystkich badanych jądrach ciała migdałowatego już w dniu urodzenia, jednak tylko populacja neuronów CR-ir jest w tym czasie ustabilizowana pod względem liczebności i rozmieszczenia. Neurony CR-ir występują najliczniej w bocznej części jądra podstawno-bocznego, brzusznej części jądra przyśrodkowego oraz jądrach: korowym przednim i łżyskowym dodatkowego pasma węchowego.

W okresie postnatalnym (pierwsze trzy tygodnie), wzrost gęstości neuronów CB-ir obserwowałam w jądrach: środkowym, korowym przednim oraz korowym tylnym przyśrodkowym. Natomiast w zespole podstawno-bocznym, w drugim tygodniu życia gęstość neuronów CB-ir zmniejsza się (choć nadal pozostaje duża, szczególnie w BL). Od P21, ilość i rozkład neuronów CB-ir w badanych jądrach ciała migdałowatego stabilizują się – najliczniej występują w jądrze podstawno-bocznym i środkowej części jądra środkowego.

Znacząco odmiennie przebiega rozwój neuronów PV-ir. Immunoreaktywność parwalbuminy pojawia się w komórkach ciała migdałowatego w drugim tygodniu życia po urodzeniu. Ich gęstość i rozmieszczenie ustalają się w trzecim tygodniu życia po urodzeniu (jądra korowe tylne), bądź nieco później – pomiędzy P21 a P90 (pozostałe jądra). Neurony PV-ir występują najliczniej w zespole podstawno-bocznym (zwłaszcza w jądrze podstawno-bocznym) oraz w jądrze korowym tylnym bocznym; w pozostałych jądrach ich liczebność jest mała bądź znikoma.

Neurony zawierające białka wiążące wapń w ciele migdałowatym dorosłych osobników badano u wielu gatunków zwierząt (m.in. gryzonie, drapieżne, naczelnice, w tym człowiek) [198, 265, 348, 350, 359, 390, 395, 420, 437, 438, 545, 546, 553-557]. Jednak dane dotyczące rozwoju, dojrzewania i starzenia są nadal fragmentaryczne i zazwyczaj ograniczone do zespole podstawno-bocznego [113, 306, 528, 582].

W zespole podstawno-bocznym ciała migdałowatego myszy, neurony CB-ir i CR-ir pojawiają się pod koniec drugiego tygodnia życia embrionalnego (E13-14); gęstość neuronów CB-ir zwiększa się do końca pierwszego tygodnia życia

po urodzeniu, a komórek CR-ir stabilizuje się ok. P0 [306]. W BLC szczura, w drugim tygodniu życia obserwowano zmniejszenie gęstości neuronów CB-ir [34], po czym (od P21) ich liczebność ustalała się na poziomie charakterystycznym dla osobnika dorosłego [34]. Pierwsze, pojedyncze neurony PV-ir pojawiają się w BLC myszy około P7 [113, 306], a w BLC szczura w P14 [34] – ich gęstość zwiększa się i następnie, w P90 stabilizuje.

Powyższy schemat zmian gęstości komórek zawierających białka wiążące wapń jest zbliżony do obserwowanego przeze mnie w rozwoju jąder bocznego i podstawno-bocznego; niewielkie różnice ilościowe wynikają prawdopodobnie z różnych technik barwienia oraz szacowania liczebności badanych populacji. Różnica dotycząca wieku, w którym pojawia się PV (mysz versus szczur) może być związana z istnieniem specyficznych gatunkowo mechanizmów regulujących pojawienie się tego białka.

Dane na temat rozwoju komórek zawierających CR, CB i PV w pozostałych jądrach ciała migdałowatego są fragmentaryczne. Guirado i wsp. [199] opisali komórki CR-ir w tylnej części jądra przyśrodkowego w 15 dniu życia embrionalnego szczura – już w tym okresie, w części brzusznej jądra neurony CR-ir były stosunkowo gęsto upakowane, natomiast w części grzbietowej rozproszone. Sidorowicz i wsp. [537] odnotowali obecność komórek CB-ir w jądrze środkowym w P4 – ich liczba stabilizowała się w P21.

Obecność CR i CB już w początkowym etapie ontogenezy sugeruje ich rolę w procesach rozwojowych takich jak migracja neuronów, różnicowanie, wydłużanie wypustek, kształtowanie drzewa dendrytycznego oraz tworzenie połączeń [154, 216, 387, 457, 467, 510]. W pierwszym tygodniu życia po urodzeniu w L, BL, Ce, Me i CoA obserwowałam immunoreaktywność CR i CB w neuronach o morfologii charakterystycznej dla komórek niedojrzałych. Były to neurony jednobiegunowe (nie występują po P7) i dwubiegunowe (wyraźnie liczniejsze niż w okresie późniejszym), o poszerzonych początkowych odcinkach wypustek. Ich obecność świadczy o trwającym procesie różnicowania i dojrzewania morfologicznego tych populacji. Kalretynina jest uznawana za jeden ze znaczników niedojrzałych neuronów migrujących w trakcie rozwoju mózgowia [172, 582]. Kalbindyna pojawia się zwykle 1-2 dni po zakończeniu podziałów komórkowych, w fazie migracji neuronów i wydłużania wypustek [154]. Buforując poziom jonów Ca^{2+} we wczesnym etapie rozwoju OUN [410] zabezpiecza dojrzewające neurony przed uszkodzeniem, które może wywołać glutaminian [427].

Obserwowane przeze mnie, ponadto Berdel i Morysia u szczura [34] oraz przez Brummelte i wsp. u myszokoczek [67], zjawisko przejściowej ekspresji CB w zespole podstawno-bocznym występuje również w rozwoju kory mózgu [176, 389], przedmurza [285] i hipokampa [626]. Zaprzestanie produkcji kalbindyny jest prawdopodobnie związane ze zmianą fenotypową neuronów [113]. W rozwoju kory mózgu, grupa niepiramidowych komórek CB-ir zmienia fenotyp i zaczyna produkować PV [5]. Zdaniem Davila i wsp. [114] neurony CB-ir obserwowane w rozwoju BLC prawdopodobnie tworzą różne subpopulacje, w tym

taką, która później produkuje parwalbuminę. W korze mózgu i zespole podstawno-bocznym najwyższy poziom CB oraz „przeorganizowanie” CB i PV zdają się być skorelowane z nasileniem synaptogenezy [114, 176, 626]. Oba białka regulują stężenie wapnia, co ma ogromne znaczenie dla stabilizacji synaps [213, 214, 258].

Badania rozwojowe struktur ośrodkowego układu nerwowego [7, 34, 35, 132, 512] wykazały, że ekspresja parwalbuminy w neuronach wiąże się z ich funkcjonalną dojrzałością, rozpoczęciem czynności bioelektrycznej oraz z nasiloną synaptogenezą [6, 7, 113, 132, 387, 548]. W badanych jądrach ciała migdałowatego nie obserwowaliśmy neuronów PV-ir o morfologii komórek niedojrzałych. Osiągnięcie dojrzałości czynnościowej neuronów może zależeć od wcześniejszego wytworzenia w nich podjednostek receptora NMDA [16, 86, 488]; oddziaływanie na nie glutaminianu może prowadzić, poprzez wpływ na ekspresję PV, do podjęcia przez nie funkcji [26, 447]. Można założyć, że glutaminergiczne neurony projekcyjne wielu obszarów kory, posiadające liczne połączenia z ciałem migdałowatym, mogą wywierać istotny wpływ na przebieg dojrzewania interneuronów PV-ir zwłaszcza zespole podstawno-bocznym.

Rozkład i morfologia neuronów zawierających CR i CB (od P21) oraz PV (od P21-P90) w badanych jądrach ciała migdałowatego nie odbiegały zasadniczo od opisanych przez innych autorów u zwierzęcia dojrzałego [265, 350, 358, 359, 394, 441, 463]. Rozkład komórek zawierających CR i CB w obrębie ciała migdałowatego jest relatywnie homogenny w porównaniu z neuronami PV-ir, których występowanie jest w zasadzie ograniczone do zespołu podstawno-bocznego i jądra korowego tylnego bocznego.

Wśród neuronów zawierających białka wiążące wapń, w jądrach ciała migdałowatego przez cały badany okres dominują komórki typu 1 i 2. W oparciu o cechy morfologiczne można przypuszczać, że większość z nich (przynajmniej w BLC i jądrach korowych) to komórki wstawkowe [265, 353, 356, 383]. Przemawiają za tym również dane na temat kolokalizacji badanych białek i kwasu γ -aminomasłowego, aczkolwiek znowu dotyczą one przede wszystkim zespołu podstawno-bocznego, gdzie GABA występuje w interneuronach (w jądrach środkowym i przyśrodkowym GABA jest obecny również w komórkach projekcyjnych [112, 116, 434, 565]). Według Kemppainen i Pitkanen [265] 94% neuronów PV-ir ciała migdałowatego to komórki GABAergiczne. Potwierdzają to również inni autorzy [358]. 75% neuronów CB-ir i 24% neuronów CR-ir zespołu podstawno-bocznego szczura jest jednocześnie GABA-ir [265]; stanowią one oddzielne populacje interneuronów [362, 395]. Oprócz komórek GABAergicznych, Kemppainen i Pitkanen [265] opisały w BLC nieGABAergiczne, prawdopodobnie projekcyjne, neurony CB-ir i CR-ir o obserwowanej przeze mnie i innych autorów [16, 306, 348] morfologii typu 4. Obecność projekcyjnych neuronów CB-ir w BLC i CR-ir w Me potwierdzili również odpowiednio Moryś i wsp. [390] oraz Krzywkowski i wsp. [293].

Dane na temat wzajemnej kolokalizacji CR, CB i PV w ciele migdałowatym szczura dotyczą głównie zespołu podstawno-bocznego: neurony CR-ir stanowią oddzielną populację, a większość neuronów PV-ir zawiera CB [113, 265, 358, 359]; dane procentowe dotyczące neuronów CB-ir zawierających PV są rozbieżne: od 26% [265] do 60-66% [359, 362].

Procesowi starzenia ośrodkowego układu nerwowego towarzyszą zmiany poziomu wapnia w komórkach (wzrost stężenia jonów Ca^{2+}) [271, 337]. Jednak danych na temat neuronów zawierających białka wiążące wapń w fazie starzenia jest niewiele.

W dostępnym piśmiennictwie nie znalazłam informacji na temat neuronów CR-, CB- i PV-ir ciała migdałowatego w procesie starzenia. Obserwowany przeze mnie brak wyraźnych zmian ilościowych, koresponduje z doniesieniem von Bohlena i wsp. [600], którzy badając gęstość i całkowitą liczbę komórek ciała migdałowatego w starzeniu również nie odnotowali zmian. Zmianom w procesie starzenia nie ulega poziom mRNA oraz białka CB w ludzkim ciele migdałowatym [239]. W korze mózgu ludzi starych, istotny spadek liczby neuronów CB-ir i CR-ir odnotowano odpowiednio w czterech i trzech rejonach na 17 przebadanych; neurony PV-ir nie wykazały zmian ilościowych [70]. Spadek gęstości komórek CB-ir i brak związanych ze starością zmian ilościowych w populacji neuronów PV-ir odnotowano również w hipokampie królika [125].

5.1.2 Neurony zawierające syntazę tlenu azotu

Na podstawie uzyskanych wyników mogę stwierdzić, że neurony NOS-ir występują we wszystkich badanych jądrach ciała migdałowatego szczura; ich liczebność i rozmieszczenie ustalają się w pierwszym tygodniu życia po urodzeniu – w BL, MeD i Ce już w P0, natomiast w MeV, BAOT i jądrach korowych w P7; wyjątek stanowi jądro boczne, w którym w/w parametry stabilizują się w P21.

Występowanie neuronów produkujących tlenek azotu w ośrodkowym układzie nerwowym badano na podstawie aktywności histochemicznej diaforazy fosforanu dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (NADPH-d) bądź immunoreaktywności syntazy tlenu azotu. W preparatach mózgowych utrwalanych formaliną NADPH-d i NOS uwidaczniają tą samą populację komórek [232, 343, 403].

Dane dotyczące neuronów produkujących tlenek azotu w rozwoju ciała migdałowatego są ogólnikowe i fragmentaryczne. Według Samama i wsp. [493] neurony NADPH-d występują w ciele migdałowatym szczura od P0. Terada i wsp. [573] badając ontogenezę neuronów NOS-ir w kresomózgowiu i śródmózgowiu szczura wykazali, że pierwsze immunoreaktywne komórki w ciele migdałowatym pojawiają się w E17 – ich poziom sukcesywnie rośnie do P14 (starsze zwierzęta nie były badane). W rozwoju zespołu podstawno-bocznego myszy,

pojedyncze neurony NOS-ir występują w E16,5; w L ich liczba po urodzeniu nieco rośnie, a w BL, od E18,5 lokalizują się głównie na granicy jądra – ich immunoreaktywność jest wyższa niż u osobnika dorosłego [411]. W E18 w jądrze przyśrodkowym szczura komórki NOS-ir występują zarówno w części brzusznej (gęściej upakowane) jak i w części grzbietowej – podobny rozkład obserwowano w P7 [199].

Obecność neuronów produkujących tlenek azotu już w okresie embrionalnym, sugeruje istotne znaczenie NO w procesach rozwojowych takich jak: neurogeneza [105, 188, 430], migracja [105, 203, 495], apoptoza [105, 518], różnicowanie [96, 188, 225, 430, 432], wzrost i rozgałęzienie wypustek [107, 156, 226] i synaptogeneza [105, 408].

Występowanie neuronów produkujących NO w ciele migdałowatym osobników dojrzałych opisano u różnych gatunków zwierząt w tym naczelnych i człowieka [23, 47, 55, 204, 307, 365, 374, 439, 500, 542, 585]. Obserwowane przez mnie rozmieszczenie i gęstość komórek NOS-ir w jądrach ciała migdałowatego zwierzęcia dojrzałego nie odbiegają zasadniczo od opisanych wcześniej u szczura i myszy [198, 365, 585], aczkolwiek Usunoff i wsp. [585] oraz McDonald i wsp. [365] wykryli neurony NADPH-d pozytywne w bocznej części Ce (nie obserwowane przeze mnie). Nie można wykluczyć, że opisane przez w/w autorów komórki zawierają inne niż nNOS izoformy tego enzymu, gdyż, mimo odmiennych cech antygenowych wszystkie cechuje aktywność histochemiczna NADPH-d [579]. eNOS obserwowano w neuronach hipokampa, prążkowie czy w opuszce węchowej a iNOS w neuronach kory i struktur podkorowych [194].

Neurony NOS-ir w badanych przeze mnie jądrach ciała migdałowatego to w większości dwu- i wielobiegunowe komórki o zróżnicowanej morfologii perikarionu i immunobarwności. Intensywnie wybarwione, niepiramidowe neurony zawierające NOS zespołu podstawno-bocznego to prawdopodobnie interneurony GABAergiczne [365, 585]. Z kolei neurony produkujące NO przyśrodkowej części Ce, według McDonald i wsp. [365] mogą być cholinergiczne, aczkolwiek hipoteza ta jest przez innych autorów przyjmowana ostrożnie [585], gdyż tylko Nitecka i Frother [406] oraz Asan [22] wykryli neurony cholinergiczne w tym obszarze. Gęsto upakowane komórki z wąskim rąbkiem cytoplazmy występujące w MeV to prawdopodobnie glutaminergiczne neurony projekcyjne [97, 372]. Natomiast intensywnie wybarwione komórki NOS-ir z widocznym drzewem dendrytycznym to zdaniem Guirado i wsp. [198] neurony GABA-ergiczne. Neurony NADPH-d jąder korowych to prawdopodobnie interneurony [365, 585].

W dostępnym piśmiennictwie nie znalazłam danych na temat współwystępowania NOS i białek wiążących wapń w komórkach ciała migdałowatego. W korze mózgu, neurony NOS-ir nie kolokalizują z PV, natomiast niewielka ich część kolokalizuje z CB (głównie w korze przedczołowej przyśrodkowej i czo-

łowej oraz w korze obręczy) [39]. W przedmurzu szczura obserwowano neurony NOS/CB oraz NOS/PV o morfologii interneuronów [287].

Zakres funkcji pełnionych przez NO w dojrzałym OUN jest obszerny – od natychmiastowej, bezpośredniej regulacji pobudzenia komórek nerwowych po plastyczność synaptyczną w jej różnych formach, takich jak długotrwałe wzmocnienie bądź osłabienie synaptyczne (LTP i LTD) [105, 449, 519]. Watanabe i wsp. wykazali, że NO odgrywa istotną rolę w indukcji LTP w jądrze przyśrodkowym ciała migdałowego [603]. Tlenek azotu moduluje uwalnianie neurotransmiterów [449, 450] i bierze udział w odpowiedzi stresowej ciała migdałowego (i innych struktur), stymuluje uwalnianie CRH i aktywację osi PPN [32, 128, 291, 292, 459]. Neurony NOS-ir jądra przyśrodkowego są włączone w modulację zachowań obronnych i związanych z tym procesów pamięciowych [196] oraz układ regulujący zachowania seksualne samców [204, 373].

Szacując gęstość neuronów NOS-ir ciała migdałowego, od P21 nie odnotowałam zmian ilościowych, co koresponduje z doniesieniem von Bohlena i wsp. [600], którzy badając gęstość i całkowitą liczbę komórek ciała migdałowego w procesie starzenia również nie odnotowali zmian. Natomiast w niektórych jądrach obserwowałam związane z wiekiem, wyraźne zmniejszenie immunoreaktywności ciał komórkowych (w Ce od P90, w MeV i jądrach korowych znacznie później – od P360). Podobne zmiany w ciele migdałowatym starych szczurów ($\geq$ P720) odnotowali Joo i wsp. [251]. Jest to prawdopodobnie spowodowane obniżeniem poziomu nNOS, a co za tym idzie zmniejszeniem produkcji tlenu azotu w tych jądrach, co w konsekwencji prowadzi do upośledzenia NO-zależnych funkcji ciała migdałowego [251].

5.2 Aktywacja ciała migdałowego po teście otwartego pola

Uzyskane przeze mnie wyniki świadczą o zaangażowaniu ciała migdałowego w niewarunkowaną odpowiedź na działanie awersyjnego bodźca stresowego. Podobne wyniki uzyskali inni autorzy [28, 29, 163, 229, 481, 590]. Jednakże, według Cartera i wsp. [82] udział ciała migdałowego w niewarunkowanym stresie psychologicznym sprowadza się do roli modulacyjnej – ich zdaniem nie ma ono bezpośredniego wpływu na włączenie osi PPN i związane ze stresem zmiany w układzie krążenia. Z kolei Antoniadis i McDonald [19], w oparciu o badania behawioralne, podważają rolę ciała migdałowego w odpowiedzi stresowej po jednokrotnym drażnieniu prądem elektrycznym.

5.2.1 Zmiany aktywacji jąder ciała migdałowego w zależności od wieku

Niezależnie od poziomu aktywacji w odpowiedzi na OF, większość badanych jąder ciała migdałowego charakteryzuje się stosunkowo stałym schema-

tem zmian zależnych od wieku. Można je podzielić na trzy okresy: P0–P7, w którym większość jąder wykazuje niski poziom neuronów c-Fos-ir; P14–P90, w którym, we wszystkich badanych jądrach, wyraźnie zwiększa się gęstość komórek c-Fos-ir, osiągając wartość maksymalną ok. trzeciego tygodnia życia oraz >P90, w którym, w badanych rejonach, następuje stopniowe zmniejszanie się gęstości neuronów c-Fos-ir.

Wczesny etap rozwoju postnatalnego

W pierwszym tygodniu życia po urodzeniu gęstość komórek c-Fos-ir w jądrach ciała migdałowatego jest mała.

Względnie niski poziom immunoreaktywności c-Fos w badanych jądrach ciała migdałowatego w rozwoju postnatalnym przypada w okresie obniżonej reaktywności stresowej (*stress hypo-responsive period*; SHRP), który u myszy i szczura trwa ok. dwa tygodnie po urodzeniu [308, 498, 514]. W okresie tym, aktywacja osi PPN i pełne rozwinięcie reakcji stresowej następuje tylko pod wpływem bardzo silnego bodźca awersyjnego, psychologicznego bądź fizycznego [126, 517]. W czasie trwania SHRP ma miejsce wzrost aksonów, synaptogeneza i mielinizacja kluczowych układów neuronalnych, więc ograniczanie zakresu odpowiedzi stresowej ma prawdopodobnie na celu ochronę rozwijającego się mózgowia przed negatywnym wpływem glikokortykoidów [151, 497, 498]. Mechanizmy kontrolujące SHRP są mało poznane. Wysoki próg aktywacji osi jest prawdopodobnie związany z niedojrzałością wzajemnych połączeń jądra przykomorowego podwzgórza [51, 470, 486] oraz „wyciszeniem” (atenuacją) ośrodkowego układu kontrolującego włączenie osi PPN [135]. W jądrze przykomorowym podwzgórza występują liczne włókna i zakończenia GABAergiczne, których źródłem są głównie inne rejony podwzgórza i jądro prążka kręgowego; te z kolei są pod wpływem ciała migdałowatego, hipokampa i kory przedczołowej. Jako, że GABA hamuje uwalniania CRH [49, 102, 323], zdaniem Denta i wsp. [135], SHRP jest związany z „wyciszeniem” komórek GABAergicznych struktur limbicznych kresomózgowia, które regulują oś zwykle na drodze rozhamowania (połączenia GABA-GABA) [135, 220]. W ciele migdałowatym projekcyjne komórki GABAergiczne, które bezpośrednio lub przez BST i podwzgórze unerwiają PVN występują w jądrach środkowym i przyśrodkowym [14, 77, 143, 144, 219]. Stopień pobudzenia neuronów GABAergicznych (a co za tym idzie poziom GABA) po działaniu umiarkowanego stresora zależy od fazy SHRP [135].

Wysoki (jak na pierwszy tydzień rozwoju postnatalnego), poziom neuronów c-Fos-ir cechował jądra korowe: przednie i tylne boczne. Ponieważ oba jądra otrzymują informacje z głównej opuszki węchowej, aktywacja ich neuronów może się wiązać z kształtowaniem i plastycznością tak ważnych dla szczura połączeń węchowych.

Rozpatrując wpływ testu otwartego pola we wczesnym etapie rozwoju postnatalnego należy pamiętać, że samo odłączenie zwierzęcia od matki może wy-

wołać reakcję stresową. W badanych jądrach ciała migdałowatego szczurów w wieku P0–P14, odseparowanych od matki na 10 min i nie poddanych OF, komórki c-Fos-ir występowały sporadycznie. Przebieg SHRP jest w dużej mierze pozytywnie kontrolowany przez zachowania macierzyńskie [135]. Odłączenie od matki na 15 min powoduje u niej nasilenie zachowań opiekuńczych [318, 454], co może u dziecka łagodzić bezpośrednie następstwa separacji. Co więcej, brak krótkotrwałego oddzielenia dziecka i matki, wydaje się formą deprywacji – jest to stan przewlekłej stymulacji [455], który prowadzi do neurochemicznych zmian w mózgu, podobnych do tych, które wywołuje stres w okresie prenatalnym [187, 586]. Natomiast odłączenie od matki na 24h, związane z długotrwałym brakiem jej wpływu, stanowi dla noworodka, szczególnie w pierwszym tygodniu życia, na tyle niebezpieczną i groźną sytuację, że powoduje uaktywnienie układu stresowego, mimo jego niekorzystnych konsekwencji dla dalszego rozwoju [135, 155].

Późny etap rozwoju postnatalnego i dojrzewanie

Okres P14–P90 charakteryzuje najwyższa aktywacja – wydaje się, że w tym okresie ciało migdałowate jest najbardziej „wrażliwe” na działanie zastosowanego przeze mnie bodźca – gęstość komórek c-Fos-ir zwiększa się we wszystkich badanych rejonach, a szczególnie gwałtownie wzrasta w BAOT, CoA i MeV. Po P90 gęstość neuronów c-Fos-ir zmniejsza się.

Podobny schemat zmian obserwowali Lyss i wsp. w korze przedczołowej szczura, gdzie aktywacja c-fos po działaniu stresora w P45 była prawie 12-krotnie wyższa niż w P10; w P100 poziom c-fos zmniejszył się o ok. 22% w stosunku do P45 [322]. Adolescencja jest etapem życia, w którym następują intensywne zmiany fizyczne, behawioralne, socjalne i neurologiczne [550]. Jest to okres ostatecznego kształtowania się połączeń i układów mózgowych. Precyzyjna korekta tych procesów odbywa się w czasie, gdy zwierzę zaczyna aktywnie eksplorować otoczenie – staje się samodzielne, uczy się rozpoznawać i klasyfikować bodźce napływające ze środowiska zewnętrznego i jednocześnie dojrzewa płciowo (kształtuje się hormono-zależny behawior seksualny) [83, 145, 386, 480, 550, 558, 559]. W okresie dojrzewania kształtują się również społeczne zachowania afiliatywne/agonistyczne (P35-40 u gryzoni), co jest związane z dramatyczną rearanżacją struktury i funkcji mózgu [15, 319, 550, 558]. Niewątpliwie więc jest to okres intensywnych zmian, a neurony wykazujące wzrost poziomu białka c-Fos są włączone w analizę nowej, specyficznej informacji i ponadto gotowe do zmian plastycznych (c-Fos jest czynnikiem transkrypcyjnym dla genów, które kodują białka zaangażowane w procesy plastyczności) [278].

Pomimo, że adolescencja jest okresem znaczących zmian w mózgowiu, to stosunkowo niewiele wiadomo o wpływie stresu w tej fazie rozwoju gryzoni. Szczury w okresie dojrzewania są bardziej wrażliwe na działanie czynników awersyjnych – w porównaniu z osobnikami dorosłymi, charakteryzują się wydłużeniem czasu aktywacji osi PPN, a co za tym idzie wydłużeniem czasu sekre-

cji i podwyższeniem poziomu glikokortykoidów [110, 345, 479, 592]. Zdaniem Goldmana i wsp. [192] wynika to z niedojrzałości systemu sprzężenia zwrotnego hamującego oś stresową. Okres dojrzewania cechuje podwyższona wrażliwość/wzmożona reakcja na bodźce emocjonalne i motywacyjne, przy jednoczesnym braku efektywnej regulacji procesów emocjonalnych i poznawczych [83, 550, 558, 559]. To z kolei wiąże się z dysproporcją pomiędzy dojrzałością strukturalną i funkcjonalną struktur podkorowych krytycznych dla powstawania emocji i związanego z nimi behawioru (m.in. ciało migdałowate, jądro półleżące), w porównaniu do obszaru pełniącego funkcje kontrolne (kora przedczołowa) [83, 550, 558, 559]. Relatywnie większa dojrzałość struktur podkorowych w porównaniu z wciąż niedojrzałym układem korowym skutkuje silnym pobudzeniem systemu podkorowego przy jednoczesnej słabej jego kontroli [83, 550, 558, 559].

Przejściową „nadaktywność” neuronów pod wpływem bodźca awersyjnego obserwowano również w rozwoju struktur związanych z mózgowym układem stresowym, takich jak wzgórze [276] i jądro półleżące [322].

Dorosłość i starzenie

Ukształtowany w okresie dojrzewania schemat odpowiedzi ciała migdałowatego na zastosowany bodziec awersyjny obowiązuje po P90, aczkolwiek z wiekiem zmniejsza się poziom komórek c-Fos-ir, szczególnie w BAOT, CoA i MeV, tak, że w P360 różnica pomiędzy badanymi jądrami przestaje być znamienna. U szczurów dwuletnich liczba neuronów c-Fos-ir jest porównywalna do obserwowanej u zwierząt kontrolnych.

Zmniejszenie liczebności komórek c-Fos w ciele migdałowatym szczurów starych (dwuletnich) w porównaniu z młodymi (czteromiesięcznymi) po OF i immobilizacji, obserwowali Boguszewski i Zagrodzka [46]. Ich zdaniem może to być spowodowane zmniejszoną reaktywnością neuronów w następstwie starzenia się tkanki nerwowej, bądź zmianą przebiegu krzywej aktywacji c-Fos w zależności od czasu, który upłynął od zadziałania bodźca. Tą ostatnią teorię zbadali Meyza i wsp. [378]. W jądrach ciała migdałowatego: środkowym, podstawno-bocznym, przyśrodkowym i korowym, poziom c-Fos po unieruchomieniu był u zwierząt młodych wyższy niż u starych, zróżnicowany (wyższy w Me i Co niż w Ce i BL) i ulegał zmianom w zależności od czasu, który upłynął od zadziałania bodźca. U zwierząt starych schemat odpowiedzi ujednolicił się – we wszystkich jądrach odnotowano podobny (Me i Co „utraciły przewagę”), stały, poziom komórek c-Fos, porównywalny do obserwowanego u zwierząt kontrolnych [378]. Jednocześnie Meyza i wsp. [378] wykazali, że poziom c-Fos w PVN u szczurów starych był istotnie wyższy niż u młodych.

Proces starzenia jest związany ze spadkiem umiejętności radzenia sobie ze stresem będącym konsekwencją deficytu funkcji fizjologicznych, motorycznych i poznawczych [421, 426]. W podeszłym wieku wzrasta wrażliwość na stres. Starzenie wpływa na działanie osi PPN – podnosi bądź obniża stopień jej akty-

wacji [45, 211, 378, 426, 492, 560]. Jest to przypuszczalnie związane z deficytem kontroli przez ośrodkowy układ stresowy, w tym przez ciało migdałowe [426], którego reaktywność, co wynika również z moich badań, na starość zasadniczo się zmienia. Związane z wiekiem rozregulowanie ośrodkowego systemu kontrolującego reakcję stresową [99, 621], objawia się również obniżeniem zdolności do „zahamowania” osi PPN [189, 426]. Stanowi to przyczynę uszkodzeń mózgu związanych z nadmiernym poziomem glikokortykoidów oraz produkcją wolnych rodników [98, 561].

Z drugiej strony, w procesie starzenia obserwuje się aktywację układów włączonych w odpowiedź stresową nawet pod nieobecność stresora [177, 243]. Równolegle aktywowane są układy przyjemnościowe np. zwiększa się neurotransmisja serotoninericzna [209]. Zdaniem Frolkis [177] jest to mechanizm adaptacyjny związany z wiekiem, polegający na utrzymywaniu „stanu gotowości”, w celu łatwiejszego przystosowania się do zmieniających się warunków środowiskowych; ma to kompensować ograniczoną zdolność starych osobników do radzenia sobie ze stresem. W przeciwieństwie do mnie i innych autorów [137, 400, 516], podwyższony poziom aktywacji neuronów w ciele migdałowym i hipokampie starych szczurów nie poddanych działaniu stresora, obserwowali Meyza i wsp. [378]. Zdaniem Pardon [421] z wiekiem zwiększa się wielkość i nasilenie reakcji stresowej, ale jednocześnie potrzeba nieco silniejszego bodźca aby ją wywołać.

Towarzyszące starzeniu zmniejszenie zdolności adaptacyjnych może się wiązać z mniejszą wydolnością zmian plastycznych. Godzinne unieruchomienie, powoduje u młodych szczurów wzrost gęstości kolców dendrytycznych w grzbietowej części jądra przysłankowego ciała migdałowego, a u zwierząt starych (dwuletnich) nie wywołuje żadnych zmian [327]. Jako że c-Fos jest czynnikiem transkrypcyjnym dla genów, które kodują białka zaangażowane w procesy plastyczności [278], powyższe dane korelują z obserwowanym przeze mnie w jądrach ciała migdałowego, nasilającym się z wiekiem spadkiem gęstości komórek c-Fos-ir, m.in. w MeD.

Zależne od wieku zmniejszenie ekspresji c-fos mRNA odnotowano również w korze przedczołowej przysłankowej, prążkowi i bocznej przegrodzie po teście otwartego pola [400] oraz w ciele migdałowym i korze mózgu po drażnieniu prądem [124]. Może to odzwierciedlać zarówno zmniejszenie aktywności neuronów jak i związane ze starzeniem zmiany w procesach regulujących ekspresję genów [574, 595].

5.2.2 Zaangażowanie i rola jąder ciała migdałowego

Na podstawie gęstości komórek c-Fos-ir mogę stwierdzić, że spośród badanych jąder ciała migdałowego największą aktywność w odpowiedzi na OF wykazują jądra: przysłankowe – część brzuszna (od P4 do P360), korowe

przednie (od P7 do P360) i łożyskowe dodatkowego pasma węchowego (od P14 do P360).

Większość badań na temat organizacji czynnościowej ciała migdałowatego dotyczy zespołu podstawno-bocznego i jądra środkowego. Rola jądra przyśrodkowego, a zwłaszcza jąder korowych i BAOT wciąż pozostaje słabiej poznana.

Jądro przyśrodkowe i jądro środkowe

Ciało migdałowate bierze udział w kształtowaniu fizjologicznej i behawioralnej reakcji organizmu na bodźce istotne emocjonalnie [122], a aktywacja osi PPN jest jedną z najbardziej charakterystycznych cech tej odpowiedzi. Przez długi okres zakładano, że to jądro środkowe, jako główne miejsce wyjścia informacji z ciała migdałowatego, jest zaangażowane w ten proces. Obecnie uważa się, że rola poszczególnych jąder ciała migdałowatego zależy od typu stresora.

Uzyskane przeze mnie wyniki świadczą o istotnym zaangażowaniu jądra przyśrodkowego i niskiej aktywacji jądra środkowego ciała migdałowatego w odpowiedź na bodźce awersyjne zawierające komponentę psychologiczną. Dane te są zgodne z badaniami innych autorów [111, 121, 122, 153, 309, 483, 575, 602]. Jądro środkowe jest selektywnie włączone w odpowiedź na stresor reaktywny [121, 217, 576, 622]. Zdaniem Knapskiej i wsp. [278] Ce wpływa na generację fazowej odpowiedzi behawioralnej, w której układ współczulny dominuje nad przywspółczulnym. Ten typ strategii behawioralnej występuje w sytuacji związanej z obroną życia [278].

Jądro przyśrodkowe stanowi miejsce docelowe projekcji z dodatkowej opuszki węchowej (związanej z układem feromonalnym) i należy do układu węchowego dodatkowego [565]. Poprzez połączenia z jądrami korowymi przednim i tylnym bocznym otrzymuje również informacje z głównej opuszki węchowej – jest więc miejscem, w którym dochodzi do scalenia informacji z dwóch ważnych układów czuciowych szczura: feromonalnego i węchowego [62]. Jądro przyśrodkowe jest przez to niezwykle istotne w opracowaniu bodźców napływających z otoczenia, zwłaszcza nowych i potencjalnie niebezpiecznych; reguluje zachowania socjalne, reprodukcyjne i obronne [40, 97, 138, 165, 252, 431, 593]. Jądro przyśrodkowe jest też miejscem zmian plastycznych związanych z opracowaniem/przechowywaniem informacji o nowych emocjonalnych aspektach środowiska [1, 278, 398, 603]; obserwowano w nim immunoekspresję nerwowej cząsteczki adhezyjnej z dołączonymi resztami kwasu polisialowego (*polysialylated form of neural cell adhesion molecule*; PSA-NCAM), która w mózgowiu dojrzałego szczura jest obecna tylko w rejonach, które ulegają zmianom plastycznym [398].

Elektryczna stymulacja jądra przyśrodkowego ciała migdałowatego skutkuje aktywacją osi PPN [148], natomiast jego uszkodzenie hamuje aktywację neuronów jądra przykomorowego podwzgórza produkujących CRH po ekspozycji na stresor psychologiczny [122]. Niewielka liczba neuronów Me posiada bezpośrednie połączenia z PVN [77, 451]. Dodatkowo, Me może modulować oś pośrednio, głównie przez BST [122, 142, 451] i jądra podwzgórza posiadające połączenia z PVN [122, 221, 451]. Wpływ jądra przyśrodkowego na oś jest pobudzający, a zdaniem Swanson i Petrovich [565] większość neuronów projekcyjnych Me jest GABAergiczna, więc prawdopodobnie aktywują one PVN na drodze rozhamowania (połączenia GABA-GABA). Uszkodzenie jądra przyśrodkowego ciała migdałowatego prowadzi ponadto do osłabienia aktywacji jądra nadwzrokowego podwzgórza i komórek PVN produkujących oksytocynę (u gryzoni, pobudzenie tych obszarów zwykle towarzyszy aktywacji osi PPN) [122].

Neurony c-Fos-ir obserwowane przeze mnie w jądrze przyśrodkowym po OF mogą należeć do opisanej powyżej puli komórek, które bezpośrednio lub pośrednio wpływają na działanie osi PPN.

Na podstawie uzyskanych wyników, mogę stwierdzić, że po OF gęstość neuronów c-Fos w części brzusznej jądra przyśrodkowego była wyższa niż w części grzbietowej.

MeD jest obszarem włączonym w układ kierujący zachowaniami reprodukcyjnymi (gody, kopulacja, zachowania rodzicielskie) [77]. Posiada połączenia hamujące (często poprzez BST) z adekwatnymi obszarami podwzgórza [76, 77, 79, 221, 428]. Z kolei MeV posiada połączenia zarówno z rejonami podwzgórza odpowiadającymi za reprodukcję, jak i obszarami włączonymi w układ obronny [76, 77, 180, 428]; są to połączenia o charakterze pobudzającym [180, 428]. Neurony MeV pod wpływem bodźca awersyjnego aktywują ośrodki podwzgórza związane z zachowaniami obronnymi i równolegle hamują (na zasadzie pobudzenia hamowania) obszary związane z reprodukcją [180, 428]. Prawdopodobnie ma to na celu dostosowanie zachowań rozrodczych do aktualnie panujących warunków. Część neuronów c-Fos-ir części brzusznej jądra przyśrodkowego aktywowanych po OF (nowe, nieznane, niesprzyjające otoczenie) może być włączonych w opisany powyżej mechanizm.

Ważną rolę w regulacji funkcji endokrynnych, autonomicznych i behawioralnych sprawują komórki noradrenergiczne pnia mózgowia [123, 133, 507, 569]. W stresie następuje pobudzenie neuronów noradrenergicznych brzuszno-bocznej części opuszki i jądra pasma samotnego [85, 504]. Stresor fizyczny aktywuje układ noradrenergiczny bez udziału kresomózgowia. W odpowiedzi na stresor psychologiczny, dochodzi do pobudzenia komórek noradrenergicznych przez ciało migdałowate. Odpowiadają za to neurony jądra przyśrodkowego [122, 123]. Bezpośrednie połączenia hamujące z noradrenergicznymi obszarami

opuszki ma jądro środkowe [247, 433, 434]. W związku z tym, według Dayas i Day [123], w reakcji stresowej komórki Ce są raczej wyciszane niż aktywowane, co może tłumaczyć ich niską c-Fos-immunoreaktywność obserwowaną przeze mnie po OF.

Reakcję stresową cechują zmiany w układzie krążenia. Zdaniem Kubo i wsp. [294], komórki c-Fos-ir jądra przyśrodkowego ciała migdałowatego, mogą odgrywać rolę w mechanizmie prowadzącym do wzrostu ciśnienia krwi pod wpływem stresora psychologicznego. Anatomicznie, może się to odbywać poprzez PVN, o którym wiadomo, że ma bezpośrednie połączenia z ośrodkami autonomicznymi pnia mózgowia i rdzenia kręgowego [496, 503, 506, 564, 566, 567]. Wpływ PVN na zmiany w układzie krążenia (w tym wzrost ciśnienia krwi) potwierdzają badania czynnościowe [248, 335, 446]. Część neuronów c-Fos-ir jądra przyśrodkowego aktywowanych po OF może być włączonych w opisany powyżej mechanizm.

Ponieważ jądro przyśrodkowe jest miejscem zmian plastycznych [278, 398, 603], neurony c-Fos-ir aktywowane po OF mogą być też włączone w tworzenie/przechowywanie awersyjnej pamięci chemosensorycznej związanej nowym doświadczeniem, jakim jest ekspozycja w nieznanym i nieprzyjnym otoczeniu.

Jądro łożyskowe dodatkowego pasma węchowego

Jądro łożyskowe dodatkowego pasma węchowego, podobnie jak jądro przyśrodkowe, stanowi główne miejsce docelowe projekcji z dodatkowej opuszki węchowej i należy do układu węchowego dodatkowego [65, 525, 565]. Dane na temat jego roli, szczególnie u samców są skąpe i fragmentaryczne. BAOT jest włączony w kontrolę zachowań rodzicielskich [131, 244]; prawdopodobnie hamuje ich ekspresję [131, 244]. U gryzoni, to bodźce węchowe, jako główne źródło informacji o otoczeniu, odgrywają kluczową rolę w kształtowaniu relacji społecznych, a zwłaszcza rodzicielskich [167-169, 334]. BAOT silniej hamuje zachowania rodzicielskie u samców, co ma cechować męski behawior seksualny [109]. Struktura neurochemiczna jądra łożyskowego dodatkowego pasma węchowego jest prawie nieznaną, aczkolwiek wykazano tam obecność elementów GABA-immunoreaktywnych [476]. Głównym miejscem docelowym projekcji z BAOT jest część przyśrodkowa pola przedwzrokowego [136] – obszar ściśle związany z regulacją zachowań reprodukcyjnych samców. Nie znalazłam danych na temat roli BAOT w reakcji stresowej. Wysoka aktywacja komórek BAOT u samców obserwowana przeze mnie po OF jest prawdopodobnie związana z regulacją zachowań seksualnych/rozrodczych w niekorzystnych warunkach. BAOT może wywierać wpływ (prawdopodobnie hamujący) na aktywność neuronów pola przedwzrokowego przyśrodkowego, a pośrednio poprzez ich połączenia z PVN [231] wpływać również na oś stresową. Należy zaznaczyć, że

wysoką aktywację komórek BAOT obserwowałam od P14 – w tym okresie jądro łożyskowe dodatkowego pasma węchowego samców osiąga dojrzałość morfologiczną [104].

Jądra korowe

Jądra korowe: przednie i tylne boczne ciała migdałowatego otrzymują zasadniczą projekcję (węchową) z głównej opuszki węchowej i należą do układu węchowego głównego [278, 508, 565]. Otrzymują również informację ze struktur układu węchowego dodatkowego [77, 321, 414] oraz z kory mózgu (przedczołowej, wyspowej, śródwęchowej, zespołu hipokampa) [237, 347, 360, 363, 364, 414, 533, 535]. CoA otrzymuje ponadto połączenia z jądra przyramiennego (głównie informacje trzewne) [37]. Informacja wychodząca z CoPL, bezpośrednio lub pośrednio, dociera do przyśrodkowej części podwzgórza - zarówno do rejonów związanych z behawiorem rozrodczym (bezpośrednio), jak i do obszarów kontrolujących zachowania obronne i przyjmowanie pokarmu (pośrednio) [565]. CoA wysyła połączenia do bocznego rejonu podwzgórza, związanego z kontrolą układu autonomicznego [565]. Oba jądra pośrednio wpływają na jądro półleżące i prążkowie [351, 565]. Jądro korowe tylne przyśrodkowe, należy do układu węchowego dodatkowego (feromonalnego) i pośrednio wpływa na wszystkie rejony przyśrodkowej części podwzgórza oraz bezpośrednio na jądro półleżące [565]. Dane na temat roli jąder korowych ciała migdałowatego są bardzo ograniczone. Swanson i Petrovich [565], określili je mianem „chemosensorycznej kory asocjacyjnej”. Ekspresję c-Fos w jądrach korowych odnotowano w kontekście zachowań etologicznie istotnych, takich jak gody czy zachowania rodzicielskie [274, 278] oraz po działaniu bodźców awersyjnych: unieruchomieniu [95, 111], immobilizacji [241], drażnieniu prądem [147] i wymuszonym pływaniu [111, 146]. Jądra korowe owcy są zaangażowane w procesy pamięci węchowej [263, 264]. Według Savonenko i wsp. [501] w warunkowaniu defensywnym, ekspresja c-Fos w jądrach korowych koreluje negatywnie z groomingiem (*grooming*; akty mycia pyszczka i czyszczenia całego ciała [608]). Dane na temat roli jąder korowych w ostrym stresie psychologicznym są znikome. Wydaje się, że jądra korowe tylne, poprzez opisany powyżej wpływ na podwzgórze przyśrodkowe, mogą mieć udział w kontroli pobierania pokarmu i zachowań reprodukcyjnych w nieprzyjawnym i nieprzewidywalnym środowisku jakiego tworzy OF. Duża gęstość neuronów c-Fos po OF cechowała jądro korowe przednie. Przypuszczalnie, poprzez połączenia z podwzgórzem bocznym i jądrem przyramiennym, CoA może być włączone w aktywację/kontrolę układu autonomicznego. W jądrach korowych szczura obserwowano immunoekspresję PSA-NCAM, która w dorosłym mózgowiu jest obecna tylko w rejonach, które ulegają zmianom plastycznym [398]. Nie można więc wykluczyć, że neurony c-Fos-ir aktywowane po OF, uczestniczą w opracowywaniu/przechowywaniu informacji chemosensorycznych o nowych emocjonalnych aspektach środowiska.

Zespół podstawno-boczny

Jądro podstawno-boczne, a zwłaszcza jądro boczne ciała migdałowatego wykazywały względnie niski poziom neuronów c-Fos-ir po teście otwartego pola. Równie niewielkie pobudzenia komórek zespołu podstawno-bocznego obserwowano po unieruchomieniu [122]. Uszkodzenie BLC nie wpływa na uwalnianie adrenokortykotropiny, kortykosteronu lub CRH po stymulacji wzrokowej i węchowej, teście nowości, unieruchomieniu czy podaniu eteru [164, 523].

Ciało migdałowe odgrywa istotną rolę w ocenie sytuacji w stanie niepewności i wzmożonej czujności [117, 485, 609]. Herry i wsp. [223] (cytowane za [207]), sugerują, że ciało migdałowe jest detektorem bodźców czuciowych, które cechuje nieprzewidywalność. Aby zinterpretować określony, nieprzewidywalny bodziec trzeba otrzymać informacje różnej modalności zarówno o nim samym, jak i towarzyszących mu warunkach i co więcej porównać je z informacjami już znanymi. Rejonem ciała migdałowatego, w którym może zachodzić ten proces jest zespół podstawno-boczny, o którym wiadomo, że otrzymuje informacje praktycznie ze wszystkich rejonów kory mózgu i jest włączony w procesy pamięciowe [64, 336, 347, 440, 489, 577].

Hale i wsp. [207] badali aktywację neuronów zespołu podstawno-bocznego ciała migdałowatego szczura po teście otwartego pola. Podobnie jak w moich badaniach, liczba neuronów c-Fos-ir była niska, z wyjątkiem przedniej części jądra podstawno-bocznego gdzie było ich więcej. Rejon ten otrzymuje informacje m.in. z kory czołowej i wysyła połączenia do jądra półleżącego i prążkowie, które wpływają na behavior ruchowy [565]. Jest to obszar włączony w neuronalny układ strachu i generowanie zachowania w sytuacjach związanych z niepewnością i nieprzewidywalnością, w których istnieje konflikt „zbliżyć się czy unikać”, jak to ma miejsce w teście otwartego pola [207]. Reasumując, ekspresja c-Fos w zespole podstawno-bocznym po OF nie ma na celu oceny awersyjności bodźca, a raczej może być związana z oszacowaniem sytuacji w nowych warunkach, które cechuje nieprzewidywalność. Ocena i wybrana w jej następstwie strategia behawioralna jest prawdopodobnie uwarunkowana indywidualnymi cechami zwierzęcia (np. czynnikami genetycznymi czy ogólną aktywnością motoryczną) [219], jego aktualnym stanem i wcześniejszymi doświadczeniami [260, 371].

5.3 Aktywacja neuronów ciała migdałowatego zawierających białka wiążące wapń i syntazę tlenu azotu po teście otwartego pola

Jakkolwiek wiadomo, że ostry stres aktywuje komórki ciała migdałowatego, to charakterystyka neurochemiczna aktywowanych populacji jest mało poznana.

5.3.1 Aktywacja neuronów zawierających białka wiążące wapń

Białka wiążące wapń: parwalbumina, kalbindyna D-28k i kalretynina, buforując poziom jonów wapnia, wpływają na zdolność neuronu do podtrzymania pobudzenia [178, 511] oraz na procesy plastyczności synaptycznej [200, 521, 522].

Wzrost poziomu jonów Ca^{2+} w komórce jest jednym z czynników, które mają wpływ na ekspresję genu c-fos [581].

Aktywacja neuronów zawierających kalbindynę D-28k i parwalbuminę

Na podstawie uzyskanych wyników, mogę stwierdzić, że w grupach wiekowych P0–P360, jądra ciała migdałowatego nie różnią się zasadniczo pomiędzy sobą pod względem gęstości i stopnia podwójnego wybarwienia komórek c-Fos/PV oraz c-Fos/CB. Nieco upraszczając można stwierdzić, że w większości grup wiekowych neurony c-Fos/CB stanowiły najczęściej ok. 10-20% wszystkich komórek c-Fos-ir aktywowanych w poszczególnych jądrach, natomiast neurony c-Fos/PV w L i BL stanowiły najczęściej do 10% obserwowanych tam komórek c-Fos-ir. W oparciu o cechy morfologiczne można przypuszczać, że większość z nich (przynajmniej w BLC i jądrach korowych) to interneurony GABAergiczne [265, 353, 356, 383]. Wydaje się, że w odpowiedzi na test otwartego pola w jądrach ciała migdałowatego pobudzana jest pewna, względnie stała liczba interneuronów, które prawdopodobnie kontrolują aktywność neuronów projekcyjnych.

Dane na temat wewnętrznej sieci hamującej ciała migdałowatego, zwłaszcza w części korowo-przyśrodkowej, wciąż wymagają uzupełnienia.

W korze mózgu i hipokampie interneurony GABAergiczne charakteryzują się zróżnicowaniem morfologicznym, biochemicznym, molekularnym i synaptycznym [174, 332, 344, 543, 551]. Ich rolę determinują właściwości elektrofizjologiczne i topografia zakończeń. Interneurony tworzące synapsy na perikarionach komórek docelowych regulują ich wyładowania poprzez wpływ na generację sodowo-zależnych potencjałów czynnościowych [101, 381], natomiast te, które tworzą synapsy bardziej dystalnie mogą modulować plastyczność synaptyczną [381].

Wewnętrzna sieć hamująca ciała migdałowatego działa ona dwóch poziomach: wewnątrzjądrowym i międzjądrowym [265, 383, 546, 554]. Ostatnio pojawiło się nieco więcej informacji na temat GABAergicznej sieci hamującej w BL, zwłaszcza w kontekście neuronów zawierających PV [463, 618, 619].

Populacja komórek parwalbuminowych w jądrze podstawno-bocznym jest zróżnicowana zarówno pod względem charakterystyki elektrofizjologicznej jak i topografii połączeń synaptycznych [463, 619, 620]. Część z nich tworzy synapsy na perikarionach komórek projekcyjnych, (interneurony hamowania perisoma-

tycznego, kontrolujące „wyjście informacji” [173]) i preferencyjnie na interneuronach tego samego typu. Zapewnia to szybkie, GABA-zależne skrócenie okresu depolaryzacji. Według Woodruff i Sah [620], opisane powyżej neurony harmonizują aktywność sieci neuronalnej w obrębie BL (na zasadzie hamowania zwrotnego; *feedback inhibition*) oraz koordynują wyjście informacji z tego rejonu na zasadzie hamowania wstępującego (*feedforward inhibition*). Pojedynczy neuron PV może synchronizować potencjały czynnościowe o częstotliwości gamma (zależnej od stymulacji) i/lub theta (niezależnej od stymulacji) na 1000-2000 komórkach, na których tworzy synapsy [56, 101, 543]. Inna subpopulacja neuronów zawierających PV jądra podstawno-bocznego tworzy synapsy głównie na dystalnych dendrytach komórek projekcyjnych, co sytuuje je w dogodnej pozycji do modulacji (na zasadzie hamowania wstępującego) przepływu transmisji pobudzającej [620]. W oparciu o cechy elektrofizjologiczne tych neuronów [448], Woodruff i Sah [620] postulują ich rolę w modulacji i bramkowaniu zjawiska długotrwałego wzmocnienia transmisji synaptycznej w BL.

Reznikov i wsp. [468] badając immunoekspresję c-Fos w neuronach zawierających PV, CB i CR w przedniej części jądra podstawno-bocznego ośmiotygodniowych szczurów po dwugodzinnym unieruchomieniu, obserwowali aktywację grupy neuronów PV-ir oraz CB-ir. Włókna komórek zawierające PV w przedniej części BL kończą się na sąsiednich komórkach piramidowych [359, 393] i innych komórkach zawierających PV [394]. Neurony c-Fos/PV, obserwowane przez mnie oraz Reznikov i wsp. [468] w jądrze podstawno-bocznym, mogą więc modulować działanie sieci neuronalnej ciała migdałowatego poprzez wpływ na transmisję hamującą i pobudzającą [468]; wpływają na synchronizację wyładowań okolicznych komórek projekcyjnych [393, 394, 463]. W zespole podstawno-bocznym, 66% neuronów zawierających kalbindynę produkuje również parwalbuminę [362], więc ich aktywacja pod wpływem bodźca awersyjnego przypuszczalnie skutkuje podobnie jak aktywacja komórek parwalbuminowych [468]. W jądrze podstawno-bocznym obserwowałam zakończenia CB-ir na perikarionach komórek CB-/c-Fos+ o morfologii piramidowych neuronów projekcyjnych. W przedniej części BL występują ponadto interneurony zawierające kalbindynę oraz somatostatynę; nie zawierają PV [361]. Neurony somatostatynowe tworząc synapsy na dystalnych dendrytach komórek projekcyjnych [392, 395], wpływają na procesy plastyczności synaptycznej [468]. Komórki c-Fos/CB, obserwowane przeze mnie w BLC, mogą należeć do obu subpopulacji neuronów kalbindynowych.

Gęstość neuronów c-Fos/PV oraz c-Fos/CB w przedniej części BL po unieruchomieniu [468] była nieco większa niż obserwowana przeze mnie w BL szczurów w podobnym wieku po OF. Ponadto Reznikov i wsp. [468], w przeciwieństwie do mnie, nie stwierdzili obecności komórek c-Fos/CR. Powyższe różnice mogą wynikać z zastosowania różnych bodźców awersyjnych oraz innego rejonu badań (Reznikov i wsp. badali tylko przednią część jądra podstawno-bocznego).

W części środkowo-przyśrodkowej ciała migdałowego zarówno interneurony jak i neurony projekcyjne mogą być hamujące (GABAergiczne) [112, 116, 434, 565]. W dostępnym piśmiennictwie, nie znalazłam danych na temat obecności w tym rejonie neuronów projekcyjnych zawierających kalbindynę – prawdopodobnie większość z obserwowanych przeze mnie w Ce, Me i BAOT komórek c-Fos/CB to interneurony; w różnych grupach wiekowych stanowią one najczęściej do ok. 20% wszystkich neuronów c-Fos-ir obserwowanych w tych jądrach. W prążkowi, z którym Me i Ce wykazują wiele podobieństw anatomicznych, elektrofizjologicznych i histochemicznych [563, 565], kalbindyna występuje w interneuronach (nie kolokalizuje z PV i CR) [261].

Aktywacja neuronów zawierających kalretyninę

W oparciu o uzyskane wyniki mogę stwierdzić, że istotną rolę, w zróżnicowaniu jąder ciała migdałowego pod względem stopnia ich zaangażowania w odpowiedź na OF odgrywają neurony zawierające kalretyninę. Pobudzenie populacji komórek CR-ir w jądrze łożyskowym dodatkowego pasma węchowego może decydować o wyraźnie większej aktywacji tego jądra pod wpływem zastosowanego stresora; w okresie P14-P360 neurony c-Fos/CR stanowią ok. 70-80% wszystkich neuronów c-Fos-ir. Aktywacja komórek CR-ir w pozostałych jądrach ciała migdałowego jest niższa.

W dostępnym piśmiennictwie nie znalazłam danych na temat występowania neuronów zawierających kalretyninę w jądrze łożyskowym dodatkowego pasma węchowego. Nie można wykluczyć, że podobnie jak w jądrze przyśrodkowym (BAOT jest czasami uważany za ektopową część Me [565]), wśród neuronów zawierających CR mogą być komórki projekcyjne.

Neurony jądra przyśrodkowego posiadają bezpośrednie połączenia z PVN [77, 451]; ok. 75% neuronów Me wysyłających projekcje do brzuszno-przyśrodkowej części podwzgórza zawiera kalretyninę [293] - morfologia tych neuronów jest nieznana, aczkolwiek nie można wykluczyć, że neurony c-Fos/CR obserwowane przeze mnie w Me po OF należą do tej grupy.

Morfologia neuronów c-Fos/CR obserwowanych przeze mnie w BLA i jądrach korowych wskazuje, że są to interneurony. Ich gęstość w różnych grupach wiekowych była względnie niska.

24% neuronów CR-ir zespołu podstawno-bocznego szczura jest jednocześnie GABA-ir [265]. Interneurony kalretyninowe, stanowiące 25-30% wszystkich komórek GABAergicznych BLC, [362, 395] kolokalizują z cholecystokininą oraz wazoaktywnym peptydem jelitowym; nie wykazano współwystępowania CR z PV i CB [265, 339, 362, 395]. W przedniej części jądra podstawno-bocznego interneurony zawierające VIP (licznie kolokalizujące z CR [339, 361]), tworzą synapsy głównie na kolcach dendrytycznych i dystalnych dendry-

tach komórek projekcyjnych, do których dochodzą również projekcje pobudzające z kory i wzgórza [64, 160, 302]. Impuls hamujący z interneuronów GABAergiczych zawierających VIP może utrudniać generację postsynaptycznych potencjałów pobudzających (EPSPs) i neutralizować impuls pobudzający prowadzony przez włókna aferentne – przypuszczalnie wpływa na atenuację plastyczności synaptycznej [462]. Komórki zawierające VIP (i CR) unerwiają również inne interneurony, w tym szczególnie licznie te, które zawierają CB [395, 553], czego efektem jest rozhamowanie. Inhibicja interneuronów unerwiających perikariony komórek projekcyjnych zasadniczo podnosi poziom wyładować tych ostatnich, podczas gdy inhibicja interneuronów unerwiających dystalne dendryty komórek projekcyjnych, może skutkować zwiększaniem długotrwałego wzmocnienia impulsu pobudzającego z kory i wzgórza [330].

5.3.2 Aktywacja neuronów zawierających syntazę tlenu azotu

Pomijając nieliczne odmiennie wyniki [314, 458], większość badań wykazała, że iniekcja inhibitorów NOS wywołuje efekt przeciwlękowy [149, 157, 161, 599, 613]. W rejonach związanych z reakcjami obronnymi (m.in. PVN, Me, BST, istota szara okołowodociągowa, jądro grzbietowe szwu, jądro przedsuteczkowe grzbietowe podwzgórza), tlenek azotu pełni rolę modulacyjną, głównie na drodze interakcji m.in. z transmisją glutaminergiczną i GABAergiczną [90, 597]. Według Guimaraes i wsp. [197], bodziec awersyjny uaktywnia transmisję glutaminergiczną, która aktywuje neurony NOS-ir w PAG. Powstały NO moduluje sekrecję i „wylapywanie” glutaminy, GABA czy innych neurotransmiterów [524, 571]. Tlenek azotu swobodnie dyfunduje i wpływa na sąsiednie neurony w promieniu 100 μm [520]. Niski poziom NO w tkance hamuje aktywność neuronów pobudzających i hamujących – podwyższenie poziomu NO prowadzi do ich stymulacji [449]. Zdaniem Krukoff i Khalili [292] uniwersalny mechanizm molekularny wpływu NO na różne typy neuronów, polega na jego roli w produkcji wtórnego przekaznika – cyklicznego GMP [21, 60].

W oparciu o uzyskane wyniki mogę stwierdzić, że istotną rolę, w zróżnicowaniu jąder ciała migdałowatego pod względem stopnia ich zaangażowania w odpowiedź na OF odgrywają neurony zawierające syntazę tlenu azotu. Pobudzenie populacji komórek zawierających NOS w jądrze przyśrodkowym oraz w jądrze łóżyskowym dodatkowego pasma węchowego decyduje o wyraźnie większej aktywacji tych jąder pod wpływem zastosowanego stresora. W MeV komórki c-Fos/NOS stanowią od ok. 50-70% (P7-P270) do ok. 30% (P360) wszystkich neuronów c-Fos-ir. W BAOT komórki c-Fos/NOS stanowią od ok. 70-80% (P14-P270) do ok. 30% (P360) wszystkich neuronów c-Fos-ir. Aktywacja komórek NOS-ir w pozostałych jądrach ciała migdałowatego jest niższa.

Pobudzenie neuronów produkujących NO w jądrze przyśrodkowym ciała migdałowatego obserwowano w odpowiedzi na unieruchomienie oraz nowe

otoczenie [292]. Unieruchomienie podnosi w Me poziom NOS mRNA i białka NADPH-d [128, 272]. Iniekcja inhibitorów NOS do jądra przysiódkowego szczura wywołuje efekt przeciwlękowy [170].

16% neuronów produkujących NO jądra przysiódkowego wysyła projekcje do PVN (stanowi to 42% wszystkich neuronów Me, które wysyłają połączenia do PVN) [572]; według Tanaki i wsp. [572] wiele z nich lokalizuje się w MeV. Wpływają więc na działanie jądra przykomorowego podwzgórza. Pomijając nieliczne niejednoznaczne wyniki [190, 342], większość doniesień potwierdza hipotezę, że NO wpływa na aktywację osi PPN pod wpływem stresora [4, 128, 129, 472, 473]. Jądro przysiódkowe ciała migdałowatego wpływa również na aktywację komórek jądra nadwzrostkowego podwzgórza (SO) [122]. W PVN i SO tlenek azotu jest włączony w uwalnianie oksytocyny, wazopresyny oraz neurosekrecję argininy-wazopresyny i CRH (działają synergistycznie zwiększając uwalnianie ACTH) [195, 409, 413, 625].

Tlenek azotu jest włączony w kontrolę odpowiedzi autonomicznej [312, 567]. Unieruchomienie podnosi poziom NOS mRNA i białka NADPH-d w strukturach regulujących aktywność autonomiczną: m.in. w Me, PVN, SO [75, 272, 292], które bezpośrednio lub pośrednio łączą się z jądrem pasma samotnego, brzuszno-boczną opuszką oraz jądrem grzbietowym nerwu błędnego [122, 123, 312, 566]. Ok. 25% neuronów PVN wysyłających projekcję do brzuszno-bocznej opuszki i jądra grzbietowego nerwu błędnego zawiera NOS [312]. Zdaniem Li i wsp. [312] tlenek azotu zwiększa uwalnianie GABA z zakończeń synaptycznych. Interakcja NO–GABA w neuronach PVN, które unerwiają rdzeń przedłużony jest głównym mechanizmem NO-zależnej ośrodkowej regulacji odpowiedzi autonomicznej [312].

Neurony c-Fos/NOS obserwowane przeze mnie w jądrze przysiódkowym (głównie w jego brzusznej części), mogą należeć do puli neuronów, które poprzez wpływ na PVN i SO, biorą udział w kontroli odpowiedzi endokrynej i autonomicznej na test otwartego pola.

Jądro przysiódkowe jest miejscem zmian plastycznych związanych z opracowaniem/przechowywaniem informacji o nowych emocjonalnych aspektach środowiska [278, 398, 603]. Ponieważ, w jądrze przysiódkowym indukcja LTP jest NO-zależna [603], tlenek azotu, a co za tym idzie aktywne komórki c-Fos/NOS mogą być włączone w tworzenie/przechowywanie awersyjnej pamięci węchowej.

Jądro przysiódkowe, jako część układu lemieszowo-nosowego [525] pośredniczy we wrodzonej identyfikacji bodźców awersyjnych [529]. Wzajemne oddziaływania bodźców chemosensorycznych i układu hormonalnego jest niezbędne do ekspresji zachowań seksualnych oraz w szeroko rozumianej motywacji seksualnej, zależnej m.in. od stanu zwierzęcia i sytuacji, w jakiej aktualnie się znajduje. W ośrodkowym układzie chemosensorycznym, NO działa prefe-

rencyjnie m.in. w kontroli zachowań rozrodczych/rodzicielskich [204]. Behawior seksualny (gody, kopulacja) jest nadzorowany przez wiele układów pobudzających i hamujących. NO, który wpływa na sekrecję neurotransmiterów [524, 571] spełnia tu rolę uniwersalnego modulatora [103, 204]. Jądro przyśrodkowe jest kluczowe w przekazywaniu sygnałów chemosensorycznych do pola przedwzrokowego i rejonów podwzgórza, które kontrolują zachowania seksualne i reprodukcję [8]. We wszystkich tych rejonach występują neurony zawierające NOS i receptory androgenowe – potencjalnie więc NO może wpływać na efekt jaki w tych komórkach wywołują androgeny [310, 617]. W strukturach związanych z behawiorem reprodukcyjnym samców występują skupiska gęsto upakowanych neuronów NOS-ir [235, 373, 460] – podobne obserwowałam w brzusznej części Me.

W kontekście rozpowszechnienia i znaczenia NO, a co zatem idzie komórek NOS-ir w układzie kontrolującym zachowania związane z reprodukcją, wydaje się możliwe, że wśród neuronów c-Fos/NOS obserwowanych przeze mnie zwłaszcza w MeV, są te, które w nowym, niesprzyjającym otoczeniu, jakie stwarza OF, aktywują ośrodki podwzgórza związane z zachowaniami obronnymi i równolegle hamują obszary związane z reprodukcją [97, 180].

W dostępnej mi literaturze nie znalazłam danych na temat roli komórek NOS-ir jądra łożyskowego dodatkowego pasma węchowego w reakcji stresowej. Podobnie jak w innych obszarach związanych z kontrolą zachowań rozrodczych/rodzicielskich [235, 373, 460], w BAOT występują liczne, ściśle upakowane komórki NOS-ir. Wysoka aktywacja komórek NOS-ir u samców obserwowana przeze mnie po OF jest prawdopodobnie związana z regulacją zachowań seksualnych/rozrodczych/rodzicielskich w niekorzystnych warunkach. Neurony produkujące NO jądra łożyskowego dodatkowego pasma węchowego mogą wywierać wpływ na aktywność neuronów pola przedwzrokowego przyśrodkowego związanego z regulacją zachowań reprodukcyjnych samców [141].

Pobudzenie komórek NOS-ir zespołu podstawno-bocznego, jądra środkowego i jąder korowych tylnych po teście otwartego pola zasadniczo jest bardzo niskie. Nieco wyższą aktywność neuronów NOS-ir obserwowałam po OF w jądrze korowym przednim. CoA jest włączone w transmisję bodźców węchowych z głównej opuszki węchowej, ale rola jego neuronów NOS-ir, szczególnie w kontekście stresu nie jest znana. Jednakże, wiadomo, że NO pośredniczy w tworzeniu/przechowywaniu pamięci węchowej [266], a w jądrze korowym przednim obserwowano immunoekspresję PSA-NCAM, co świadczy o zachodzących tam zmianach plastycznych [398].

Z wiekiem, aktywność neuronów obserwowana po OF zaczyna się zmniejszać, zwłaszcza w Me i BAOT, tak, że u szczurów dwuletnich komórki c-Fos występują incydentalnie. Jednocześnie w większości jąder następuje opisane

wcześniej wyraźne zmniejszenie NOS-immunoreaktywności ciał komórkowych, co prawdopodobnie wiąże się z obniżeniem poziomu nNOS, a co za tym idzie zmniejszeniem produkcji NO w tych jądrach. Prowadzi to do upośledzenia funkcji ciała migdałowatego zależnych od tlenu azotu [251]. Supresja NO prowadzi do anksjogenezy podczas stresu [524, 571]. Boguszewski i Zagrodzka [45] wykazali, że stare szczury wykazują znacznie wyższy poziom lęku w teście otwartego pola i teście „hole board” niż zwierzęta młode. Proces starzenia zmienia reaktywność osi PPN [45, 211, 378, 426]. Jest to przypuszczalnie związane z deficytem kontroli przez ośrodkowy układ stresowy, w tym przez ciało migdałowate. Biorąc pod uwagę, że NO aktywuje oś poprzez między innymi ciało migdałowate [526], zmniejszenie w nim poziomu NOS i aktywacji komórek NOS-ir może partycypować w powyższym efekcie [251].

Zmniejszenie gęstości neuronów c-Fos i wyraźne obniżenie NOS-immunoreaktywności w ciele migdałowatym może mieć również istotny wpływ na obserwowane w starzeniu osłabienie funkcji węchowych (NO pośredniczy w pamięci węchowej [266]). Pociąga to za sobą deficyt funkcji poznawczych [212] niezbędnych w rozpoznaniu i ocenie bodźca awersyjnego.

Zestawiając wszystkie dane dotyczące procentu komórek podwójnie wybarwionych CR-, CB-, PV-, NOS-/c-Fos mogą stwierdzić, że okresie P0–P360, jądra ciała migdałowatego szczura wykazują określone „preferencje” w aktywowaniu badanych populacji komórkowych pod wpływem zastosowanego bodźca. W BAOT są to neurony zawierające NOS i CR, w MeV – NOS, w MeD i CoPM – NOS i CB, w CoA – NOS (ale również CR i CB), w L – CB, w BL – CB i CR, w Ce – CB, CoPL – CB i PV. W oparciu o przedstawione wcześniej informacje (w tym dane kolokalizacyjne), można założyć, że pod wpływem OF w większości jąder pobudzana jest pula interneuronów (głównie CB-ir, które najczęściej stanowią ok. 10-20% wszystkich komórek c-Fos). W jądrach najbardziej aktywnych po OF – w BAOT i MeV pobudzane są głównie komórki NOS- i CR-ir; wiele z nich może być neuronami projekcyjnymi. O wysokiej aktywacji CoA decyduje inna niż badane populacja komórek (prawdopodobnie projekcyjne neurony glutaminergiczne).

Podsumowując, w jądrach ciała migdałowatego po teście otwartego pola pobudzana jest względnie stała, porównywalna pula interneuronów, które prawdopodobnie kontrolują aktywność neuronów projekcyjnych. O zróżnicowaniu jąder ciała migdałowatego po OF decyduje aktywacja komórek projekcyjnych, co prawdopodobnie skutkuje (poprzez uaktywnienie określonych szlaków neuronalnych), charakterystycznymi dla tego rodzaju stresu implikacjami czynnościowymi.

6 PODSUMOWANIE WYNIKÓW I WNIOSKI

1. Rozwój postnatalny szczura charakteryzuje się zróżnicowaniem dynamiki i charakteru zmian ilościowych i jakościowych populacji neuronów ciała migdałowatego zawierających białka wiążące wapń i syntazę tlenu azotu. Przemawia to za zróżnicowaniem ontogenetyczno-czynnościowym jąder tej struktury.
2. Ciało migdałowe dorosłego szczura jest względnie homogenne pod względem rozmieszczenia komórek CR-ir i CB-ir i heterogenne pod względem występowania komórek PV-ir. Parwalbumina występuje głównie w filogenetycznie młodszym zespole podstawno-bocznym, który jednocześnie jest prawie pozbawiony komórek NOS-ir.
3. Proces starzenia nie wiąże się z wyraźnymi zmianami ilościowymi w badanych populacjach komórkowych. Zmiany jakościowe (zmniejszenie immunobarwności) obserwuje się w populacjach neuronów NOS-ir. Jest to prawdopodobnie związane z obniżeniem poziomu nNOS, co może prowadzić do upośledzenia NO-zależnych funkcji ciała migdałowatego.
4. Jądra ciała migdałowatego cechuje podobny schemat zmian pobudzenia pod wpływem awersyjnego bodźca psychologicznego (test otwartego pola) w zależności od wieku. Okres P0-P7 charakteryzuje niski poziom aktywności; w okresie P14-P90 następuje wyraźne zwiększenie pobudzenia, po czym, po P90 aktywacja jąder ciała migdałowatego stopniowo, ale systematycznie się zmniejsza. Zmiany te wydają się być skorelowane z innymi procesami swoistymi dla rozwoju, dojrzewania, dorosłości i starzenia mózgowia szczura.
5. Najwyższy poziom aktywacji w odpowiedzi na OF wykazują jądra: przyśrodkowe, łożyskowe dodatkowego pasma węchowego i korowe przednie. Wśród badanych populacji komórkowych, największe zaangażowanie w odpowiedzi na OF wykazują neurony NOS-ir jądra przyśrodkowego oraz NOS- i CR-ir jądra łożyskowego dodatkowego pasma węchowego. O wysokiej aktywności CoA decyduje inna niż badana populacja komórkowa. Można przypuszczać, że neurony NOS-ir w BAOT i MeV odgrywają kluczową rolę w regulacji zachowań rozrodczych, aktywacji układu autonomicznego i osi PPN oraz w tworzeniu/przechowywaniu awersyjnej pamięci chemosensorycznej w nieznanym i nieprzyjnym środowisku.
6. Ciało migdałowe wykazuje określony schemat w aktywowaniu badanych populacji neuronalnych w odpowiedzi na test otwartego pola. Po OF

w jądrach ciała migdałowatego pobudzana jest względnie stała, porównywalna pula interneuronów (głównie CB-ir), które kontrolują aktywność neuronów projekcyjnych. O zróżnicowaniu aktywacji jąder ciała migdałowatego decyduje pobudzenie komórek projekcyjnych (m.in. NOS- i CR-ir), co skutkuje charakterystycznymi dla tego rodzaju stresu implikacjami czynnościowymi.

7 PIŚMIENNICTWO

1. Abe K., Watanabe Y., Saito H.: Differential role of nitric oxide in long-term potentiation in the medial and lateral amygdala. *Eur J Pharmacol.* 1996, 297, 1-2, 43-46.
2. Adolphs R., Tranel D., Damasio A.R.: The human amygdala in social judgment. *Nature.* 1998, 393, 6684, 470-474.
3. Aggleton J.P.: The contribution of the amygdala to normal and abnormal emotional states. *Trends Neurosci.* 1993, 16, 8, 328-333.
4. Aguilera G.: Corticotropin releasing hormone, receptor regulation and the stress response. *Trends Endocrinol Metab.* 1998, 9, 8, 329-336.
5. Alcántara S., De Lecea L., Del Río 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, 7, 1329-1339.
6. Alcantara S., Ferrer I.: Postnatal development of parvalbumin immunoreactivity in the cerebral cortex of the cat. *J Comp Neurol.* 1994, 348, 1, 133-149.
7. Alcantara S., Ferrer I., Soriano E.: Postnatal development of parvalbumin and calbindin D28K immunoreactivities in the cerebral cortex of the rat. *Anat Embryol.* 1993, 188, 1, 63-73.
8. Alheid G.F., DeOlmos S.J., Beltramino C.A.: Amygdala and extended amygdala. W: G. Paxinos (red.): *The Rat Nervous System.* San Diego: Academic Press, 1995, s. 495-578.
9. Alheid G.F., Heimer L.: New perspectives in basal forebrain organization of special relevance for neuropsychiatric disorders: The striatopallidal, amygdaloid, and corticopetal components of substantia innominata. *Neuroscience.* 1988, 27, 1, 1-39.
10. Amaral D.G., Price J.L., Pitkanen A., Carmichael S.T.: Anatomical organisation of the primate amygdaloid complex. W: J.P. Aggleton (red.): *The Amygdala.* New York: Wiley-Liss, 1992, s. 1-66.
11. Amaral D.G., Bauman M.D., Schumann C.M.: The amygdala and autism: Implications from non-human primate studies. *Genes Brain Behav.* 2003, 2, 5, 295-302.
12. Amir S., Rackover M., Funk D.: Blockers of nitric oxide synthase inhibit stress activation of c-fos expression in neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus in the rat. *Neuroscience.* 1997, 77, 3, 623-627.
13. Ammerman R.T., Cassisi J.E., Hersen M., Van Hasselt V.B.: Consequences of physical abuse and neglect in children. *Clin Psychol Rev.* 1986, 6, 4, 291-310.
14. Amorapanth P., LeDoux J.E., Nader K.: Different lateral amygdala outputs mediate reactions and actions elicited by a fear-arousing stimulus. *Nat Neurosci.* 2000, 3, 1, 74-79.

15. Andersen S.L.: Trajectories of brain development: Point of vulnerability or window of opportunity? *Neurosci Biobehav Rev.* 2003, 27, 1-2, 3-18.
16. Andressen C., Blumcke I., Celio M.R.: Calcium-binding proteins: Selective markers of nerve cells. *Cell Tissue Res.* 1993, 271, 2, 181-208.
17. Ang L., Shul D.D.: Peptidergic neurons of subcortical white matter in aging and Alzheimer's brain. *Brain Res.* 1995, 674, 2, 329-335.
18. Antoni F.A.: Hypothalamic control of adrenocorticotropin secretion: advances since the discovery of 41-residue corticotropin-releasing factor. *Endocr Rev.* 1986, 7, 4, 351-378.
19. Antoniadis E.A., McDonald R.J.: Amygdala, hippocampus, and unconditioned fear. *Exp Brain Res.* 2001, 138, 2, 200-209.
20. Archer J.: Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Anim Behav.* 1973, 21, 2, 205-235.
21. Arnold W.P., Mittal C.K., Katsuki S., Murad F.: Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1977, 74, 8, 3203-3207.
22. Asan E.: The catecholaminergic innervation of the rat amygdala. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 1998, 142, 1-118.
23. Ashwell K.W.S., Hardman C.D., Paxinos G.: Cyto- and chemoarchitecture of the amygdala of a monotreme, *Tachyglossus aculeatus* (the short-beaked echidna). *J Chem Neuroanat.* 2005, 30, 2-3, 82-104.
24. Avishai-Eliner S., Brunson K.L., Sandman C.A., Baram T.Z.: Stressed-out, or in (utero)? *Trends Neurosci.* 2002, 25, 10, 518-524.
25. Baimbridge K.G., Celio M.R., Rogers J.H.: Calcium-binding proteins in the nervous system. *Trends Neurosci.* 1992, 15, 8, 303-308.
26. 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, 2, 210-230.
27. Bauman M., Kemper T.L.: The neuropathology of the autism spectrum disorders: What have we learned? *Novartis Found Symp.* 2003, 251, 112-128.
28. Beaulieu S., Di Paolo T., Barden N.: Control of ACTH secretion by the central nucleus of the amygdala: Implication of the serotonergic system and its relevance to the glucocorticoid delayed negative feedback mechanism. *Neuroendocrinology.* 1986, 44, 2, 247-254.
29. Beaulieu S., Di Paolo T., Cote J., Barden N.: Participation of the central amygdaloid nucleus in the response of adrenocorticotropin secretion to immobilization stress: Opposing roles of the noradrenergic and dopaminergic systems. *Neuroendocrinology.* 1987, 45, 1, 37-46.
30. Behan M., Haberly L.B.: Intrinsic and efferent connections of the endopiriform nucleus in rat. *J Comp Neurol.* 1999, 408, 4, 532-548.
31. Behbehani M.M.: Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. *Prog Neurobiol.* 1995, 46, 6, 575-605.

32. Beijamini V., Guimarães F.S.: c-Fos expression increase in NADPH-diaphorase positive neurons after exposure to a live cat. *Behav Brain Res.* 2006, 170, 1, 52-61.
33. Belzung C.: Measuring exploratory behavior. W: W.E. Crusio (red.): *Handbook of Molecular Genetic Techniques for Brain and Behavior Research* Amsterdam: Elsevier, 1999, s. 739-749.
34. Berdel B., Moryś J.: Expression of calbindin-D28k and parvalbumin during development of rat's basolateral amygdaloid complex. *Int J Dev Neurosci.* 2000, 18, 6, 501-513.
35. 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.* 1991, 184, 4, 403-409.
36. Berk M.L., Finkelstein J.A.: Afferent projections to the preoptic area and hypothalamic regions in the rat brain. *Neuroscience.* 1981, 6, 8, 1601-1624.
37. Bernard J., Alden M., Besson J.: The organization of the efferent projections from the pontine parabrachial area to the amygdaloid complex: A Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L) study in the rat. *J Comp Neurol.* 1993, 329, 2, 201-229.
38. Bernard J.F., Peschanski M., Besson J.M.: A possible spino (trigemino)-ponto-amygdaloid pathway for pain. *Neurosci Lett.* 1989, 100, 1-3, 83-88.
39. Bertini G., Peng Z., Bentivoglio M.: The chemical heterogeneity of cortical interneurons: Nitric oxide synthase vs. calbindin and parvalbumin immunoreactivity in the rat. *Brain Res Bull.* 1996, 39, 4, 261-266.
40. Biały M., Kaczmarek L.: c-fos expression as a tool to search for the neurobiological base of the sexual behaviour of males. *Acta Neurobiol Exp.* 1996, 56, 2, 567-577.
41. Bidmon H., 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, 2, 321-330.
42. Blanchard D.C., Canteras N.S., Markham C.M., Pentkowski N.S., Blanchard R.J.: Lesions of structures showing FOS expression to cat presentation: Effects on responsiveness to a Cat, Cat odor, and nonpredator threat. *Neurosci Biobehav Rev.* 2005, 29, 8, 1243-1253.
43. Bogerts B.: Recent advances in the neuropathology of schizophrenia. *Schizophr Bull.* 1993, 19, 2, 431-445.
44. Bogerts B., Falkai P., Greve B., Schneider T., Pfeiffer U.: The neuropathology of schizophrenia: Past and present. *J Hirnforsch.* 1993, 34, 2, 193-205.
45. Boguszewski P., Zagrodzka J.: Expression of c-Fos in response to stressogenic stimuli in the amygdala of old vs. young rats - A preliminary study. *Acta Neurobiol Exp.* 2005, 65, 2, 191-194.
46. Boguszewski P., Zagrodzka J.: Emotional changes related to age in rats - A behavioral analysis. *Behav Brain Res.* 2002, 133, 2, 323-332.
47. Bombardi C., Grandis A., Chiocchetti R., Lucchi M.L.: Distribution of calbindin-D28k, neuronal nitric oxide synthase, and nicotinamide adenine dinucleotide pho-

- sphate diaphorase (NADPH-d) in the lateral nucleus of the sheep amygdaloid complex. *Anat Embryol.* 2006, 211, 6, 707-720.
48. Bordi F., LeDoux J.E.: Response properties of single units in areas of rat auditory thalamus that project to the amygdala. II. Cells receiving convergent auditory and somatosensory inputs and cells antidromically activated by amygdala stimulation. *Exp Brain Res.* 1994, 98, 2, 275-286.
 49. Boudaba C., Szabó K., Tasker J.G.: Physiological mapping of local inhibitory inputs to the hypothalamic paraventricular nucleus. *J Neurosci.* 1996, 16, 22, 7151-7160.
 50. Bouilleret V., Schwaller B., Schurmans S., Celio M.R., Fritschy J.M.: Neurodegenerative and morphogenic changes in a mouse model of temporal lobe epilepsy do not depend on the expression of the calcium-binding proteins parvalbumin, calbindin, or calretinin. *Neuroscience.* 2000, 97, 1, 47-58.
 51. Bouret S.G., Draper S.J., Simerly R.B.: Formation of projection pathways from the arcuate nucleus of the hypothalamus to hypothalamic regions implicated in the neural control of feeding behavior in mice. *J Neurosci.* 2004, 24, 11, 2797-2805.
 52. Bouwknecht J.A., Spiga F., Staub D.R., Hale M.W., Shekhar A., Lowry C.A.: Differential effects of exposure to low-light or high-light open-field on anxiety-related behaviors: Relationship to c-Fos expression in serotonergic and non-serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. *Brain Res Bull.* 2007, 72, 1, 32-43.
 53. Braak H., Braak E.: Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 1991, 82, 4, 239-259.
 54. Braak H., Braak E., Yilmazer D., De Vos R.A.I., Jansen E.N.H., Bohl J.: Pattern of brain destruction in Parkinson's and Alzheimer's diseases. *J Neural Transm.* 1996, 103, 4, 455-490.
 55. Brady D.R., Carey R.G., Mufson E.J.: Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase (NADPH-d) profiles in the amygdala of human and new world monkey (*Saimiri sciureus*). *Brain Res.* 1992, 577, 2, 236-248.
 56. Bragin A., Jando G., Nadasdy Z., Hetke J., Wise K., Buzsaki G.: Gamma (40-100 Hz) oscillation in the hippocampus of the behaving rat. *J Neurosci.* 1995, 15, 1, 47-60.
 57. Brecht D.S., Glatt C.E., Hwang P.M., Fotuhi M., Dawson T.M., Snyder S.H.: Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuron.* 1991, 7, 4, 615-624.
 58. Brecht D.S., Snyder S.H.: Transient nitric oxide synthase neurons in embryonic cerebral cortical plate, sensory ganglia, and olfactory epithelium. *Neuron.* 1994, 13, 2, 301-313.
 59. Brecht D.S., Snyder S.H.: Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron.* 1992, 8, 1, 3-11.

-
60. 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, 22, 9030-9033.
 61. Brenman J.E., Bredt D.S.: Synaptic signaling by nitric oxide. *Curr Opin Neurobiol*. 1997, 7, 3, 374-378.
 62. Brennan P.A.: The vomeronasal system. *Cell Mol Life Sci Cell Mol Life Sci*. 2001, 58, 4, 546-555.
 63. Brennan P.A., Kendrick K.M.: Mammalian social odours: Attraction and individual recognition. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2006, 361, 1476, 2061-2078.
 64. Brinley-Reed M., Mascagni F., McDonald A.J.: Synaptology of prefrontal cortical projections to the basolateral amygdala: An electron microscopic study in the rat. *Neurosci Lett*. 1995, 202, 1-2, 45-48.
 65. Broadwell R.D.: Olfactory relationships of the telencephalon and diencephalon in the rabbit. I. An autoradiographic study of the efferent connections of the main and accessory olfactory bulbs. *J Comp Neurol*. 1975, 163, 3, 329-345.
 66. Brown J.S., Kalish H.I., Farber I.E.: Conditioned fear as revealed by magnitude of startle response to an auditory stimulus. *J Exp Psychol*. 1951, 41, 5, 317-328.
 67. Brummelte S., Witte V., Teuchert-Noodt G.: Postnatal development of GABA and calbindin cells and fibers in the prefrontal cortex and basolateral amygdala of gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Int J Dev Neurosci*. 2007, 25, 3, 191-200.
 68. Brunson K.L., Kramár E., Lin B., Chen Y., Colgin L.L., Yanagihara T.K., Lynch G., Baram T.Z.: Mechanisms of late-onset cognitive decline after early-life stress. *J Neurosci*. 2005, 25, 41, 9328-9338.
 69. Brylińska J., Kwiatkowska J.: *Zwierzęta laboratoryjne. Metody hodowli i doświadczeń*. Kraków: Universitas, 1996. ISBN 8370523285.
 70. Bu J., Sathyendra V., Nagykerly N., Geula C.: Age-related changes in calbindin-D28k, calretinin, and parvalbumin-immunoreactive neurons in the human cerebral cortex. *Exp Neurol*. 2003, 182, 1, 220-231.
 71. Caffè A.R., Van Leeuwen F.W.: Vasopressin-immunoreactive cells in the dorsomedial hypothalamic region, medial amygdaloid nucleus and locus coeruleus of the rat. *Cell Tissue Res*. 1983, 233, 1, 23-33.
 72. Caffè A.R., Van Leeuwen F.W., Luiten P.G.M.: Vasopressin cells in the medial amygdala of the rat project to the lateral septum and ventral hippocampus. *J Comp Neurol*. 1987, 261, 2, 237-252.
 73. Caldji C., Diorio J., Meaney M.J.: Variations in maternal care in infancy regulate the development of stress reactivity. *Biol Psychiatry*. 2000, 48, 12, 1164-1174.
 74. Calka J., Block C.H.: Angiotensin-(1-7) and nitric oxide synthase in the hypothalamo- neurohypophyseal system. *Brain Res Bull*. 1993, 30, 5-6, 677-685.
 75. Calza L., Giardino L., Ceccatelli S.: NOS mRNA in the paraventricular nucleus of young and old rats after immobilization stress. *Neuroreport*. 1993, 4, 6, 627-630.

76. Canteras N.S.: The medial hypothalamic defensive system: Hodological organization and functional implications. *Pharmacol Biochem Behav.* 2002, 71, 3, 481-491.
77. Canteras N.S., Simerly R.B., Swanson L.W.: Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: A PHAL study in the rat. *J Comp Neurol.* 1995, 360, 2, 213-245.
78. Canteras N.S., Simerly R.B., Swanson L.W.: Organization of projections from the ventromedial nucleus of the hypothalamus: A Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study in the rat. *J Comp Neurol.* 1994, 348, 1, 41-79.
79. Canteras N.S., Simerly R.B., Swanson L.W.: Projections of the ventral premammillary nucleus. *J Comp Neurol.* 1992, 324, 2, 195-212.
80. Canteras N.S., Swanson L.W.: Projections of the ventral subiculum to the amygdala, septum, and hypothalamus: A PHAL anterograde tract-tracing study in the rat. *J Comp Neurol.* 1992, 324, 2, 180-194.
81. Carrasco G.A., Van De Kar L.D.: Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur J Pharmacol.* 2003, 463, 1-3, 235-272.
82. Carter R.N., Pinnock S.B., Herbert J.: Does the amygdala modulate adaptation to repeated stress? *Neuroscience.* 2004, 126, 1, 9-19.
83. Casey B.J., Getz S., Galvan A.: The adolescent brain. *Dev Rev.* 2008, 28, 1, 62-77.
84. Cassell M.D., Gray T.S., Kiss J.Z.: Neuronal architecture in the rat central nucleus of the amygdala: A cytological, hodological, and immunocytochemical study. *J Comp Neurol.* 1986, 246, 4, 478-499.
85. Ceccatelli S., Villar M.J., Goldstein M., Hokfelt T.: Expression of c-Fos immunoreactivity in transmitter-characterized neurons after stress. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989, 86, 23, 9569-9573.
86. Celio M.R.: Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience.* 1990, 35, 2, 375-475.
87. Celio M.R.: Calcium binding proteins in the brain. *Arch Ital Anat Embriol.* 1989, 94, 3, 227-236.
88. Celio M.R.: Parvalbumin in most γ -aminobutyric acid-containing neurons of the rat. *Science.* 1986, 231, 4741, 995-997.
89. Celio M.R., Heizmann C.W.: Calcium-binding protein parvalbumin as a neuronal marker. *Nature.* 1981, 293, 5830, 300-302.
90. Chakraborti A., Gulati K., Ray A.: Age related differences in stress-induced neurobehavioral responses in rats: Modulation by antioxidants and nitrenergic agents. *Behav Brain Res.* 2008, 194, 1, 86-91.
91. Chapman P.F., Kairiss E.W., Keenan C.L., Brown T.H.: Long-term synaptic potentiation in the amygdala. *Synapse.* 1990, 6, 3, 271-278.
92. Chapman W.P., Schroeder H.R., Geyer G., Brazier M.A.B., Fager C., Poppen J.L., Solomon H.C., Yakovlev P.I.: Physiological evidence concerning importance of the amygdaloid nuclear region in the integration of circulatory function and emotion in man. *Science.* 1954, 120, 3127, 949-950.

-
93. Chard P.S., Jordan J., Marcuccilli C.J., Miller R.J., Leiden J.M., Roos R.P., Ghadge G.D.: Regulation of excitatory transmission at hippocampal synapses by calbindin D(28k). *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995, 92, 11, 5144-5148.
 94. Chen J., Tu Y., Moon C., Matarazzo V., Palmer A.M., Ronnett G.V.: The localization of neuronal nitric oxide synthase may influence its role in neuronal precursor proliferation and synaptic maintenance. *Dev Biol*. 2004, 269, 1, 165-182.
 95. Chen X., Herbert J.: Regional changes in c-fos expression in the basal forebrain and brainstem during adaptation to repeated stress: Correlations with cardiovascular, hypothermic and endocrine responses. *Neuroscience*. 1995, 64, 3, 675-685.
 96. Cheng A., Wang S., Cai J., Rao M.S., Mattson M.P.: Nitric oxide acts in a positive feedback loop with BDNF to regulate neural progenitor cell proliferation and differentiation in the mammalian brain. *Dev Biol*. 2003, 258, 2, 319-333.
 97. Choi G.B., Dong H., Murphy A.J., Valenzuela D.M., Yancopoulos G.D., Swanson L.W., Anderson D.J.: Lhx6 delineates a pathway mediating innate reproductive behaviors from the amygdala to the hypothalamus. *Neuron*. 2005, 46, 4, 647-660.
 98. Chrousos G.P., Gold P.W.: The concepts of stress and stress system disorders: Overview of physical and behavioral homeostasis. *J Am Med Assoc*. 1992, 267, 9, 1244-1252.
 99. Cizza G., Gold P.W. Chrousos G.P.: Aging is associated in the 344/N Fischer rat with decreased stress responsivity of central and peripheral catecholaminergic systems and impairment of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Ann NY Acad Sci*. 1995, 771, 491-511.
 100. Clément Y., Calatayud F., Belzung C.: Genetic basis of anxiety-like behaviour: A critical review. *Brain Res Bull*. 2002, 57, 1, 57-71.
 101. Cobb S.R., Buhl E.H., Halasy K., Paulsen O., Somogyi P.: Synchronization of neuronal activity in hippocampus by individual GABAergic interneurons. *Nature*. 1995, 378, 6552, 75-78.
 102. Cole R.L., Sawchenko P.E.: Neurotransmitter regulation of cellular activation and neuropeptide gene expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J Neurosci*. 2002, 22, 3, 959-969.
 103. Collado P., Guillamón A., Pinos H., Pérez-Izquierdo M.A., García-Falgueras A., Carrillo B., Rodríguez C., Panzica G.: NADPH-diaphorase activity increases during estrous phase in the bed nucleus of the accessory olfactory tract in the female rat. *Brain Res*. 2003, 983, 1-2, 223-229.
 104. Collado P., Segovia S., Guillamón A.: Development of sex differences in the bed nucleus of the accessory olfactory tract in the rat. *Dev Brain Res*. 1998, 109, 1, 99-108.
 105. Contestabile A.: Roles of NMDA receptor activity and nitric oxide production in brain development. *Brain Res Rev*. 2000, 32, 2-3, 476-509.
 106. Coolen L.M., Wood R.I.: Bidirectional connections of the medial amygdaloid nucleus in the Syrian hamster brain: Simultaneous anterograde and retrograde tract tracing. *J Comp Neurol*. 1998, 399, 2, 189-209.

107. Cork R.J., Calhoun T., Perrone M., Ranney Mize R.: Postnatal development of nitric oxide synthase expression the mouse superior colliculus. *J Comp Neurol.* 2000, 427, 4, 581-592.
108. Crosby E.C., Humphrey T.: Studies of the vertebrate telencephalon. II. The nuclear pattern of the anterior olfactory nucleus, tuberculum olfactorium and the amygdaloid complex in adult man. *J Comp Neurol.* 1941, 74, 309-352.
109. Cruz R. Del Cerro M.: Role of the vomeronasal input in maternal behavior. *Psychoneuroendocrinology.* 1998, 23, 8, 905-926.
110. Cruz F.C., DeLucia R., Planeta C.S.: Effects of chronic stress on nicotine-induced locomotor activity and corticosterone release in adult and adolescent rats. *Addict Biol.* 2008, 13, 1, 63-69.
111. Cullinan W.E.: Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. *Neuroscience.* 1995, 64, 2, 477-505.
112. Cullinan W.E., Helmreich D.L., Watson S.J.: Fos expression in forebrain afferents to the hypothalamic paraventricular nucleus following swim stress. *J Comp Neurol.* 1996, 368, 1, 88-99.
113. Dávila J.C., Olmos L., Legaz I., Medina L., Guirado S., Real M.A.: Dynamic patterns of colocalization of calbindin, parvalbumin and GABA in subpopulations of mouse basolateral amygdalar cells during development. *J Chem Neuroanat.* 2008, 35, 1, 67-76.
114. Dávila J.C., Olmos L., Legaz I., Medina L., Guirado S., Real M.A.: Dynamic patterns of colocalization of calbindin, parvalbumin and GABA in subpopulations of mouse basolateral amygdalar cells during development. *J Chem Neuroanat.* 2008, 35, 1, 67-76.
115. Davis M.: The role of the amygdala in conditioned and unconditioned fear and anxiety. W: J.P. Aggleton (red.): *The amygdala.* Oxford: Oxford University Press, 2000, s. 213-287.
116. Davis M., Rainnie D., Cassell M.: Neurotransmission in the rat amygdala related to fear and anxiety. *Trends Neurosci.* 1994, 17, 5, 208-214.
117. Davis M., Whalen P.J.: The amygdala: Vigilance and emotion. *Mol Psychiatry.* 2001, 6, 1, 13-34.
118. 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, 3, 297-311.
119. Dawson V.L.: Nitric oxide: Role in neurotoxicity. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1995, 22, 4, 305-308.
120. Dawson V.L., Dawson T.M.: Physiological and toxicological actions of nitric oxide in the central nervous system. *Adv Pharmacol.* 1995, 34, 323-342.
121. Dayas C.V., Buller K.M., Crane J.W., Xu Y., Day T.A.: Stressor categorization: Acute physical and psychological stressors elicit distinctive recruitment patterns in the amygdala and in medullary noradrenergic cell groups. *Eur J Neurosci.* 2001, 14, 7, 1143-1152.
122. Dayas C.V., Buller K.M., Day T.A.: Neuroendocrine responses to an emotional stressor: Evidence for involvement of the medial but not the central amygdala. *Eur J Neurosci.* 1999, 11, 7, 2312-2322.

-
123. Dayas C.V., Day T.A.: Opposing roles for medial and central amygdala in the initiation of noradrenergic cell responses to a psychological stressor. *Eur J Neurosci.* 2002, 15, 10, 1712-1718.
 124. D'Costa A., Breese C.R., Boyd R.L., Booze R.M., Sonntag W.E.: Attenuation of Fos-like immunoreactivity induced by a single electroconvulsive shock in brains of aging mice. *Brain Res.* 1991, 567, 2, 204-211.
 125. De Jong G.I., Naber P.A., Van Der Zee E.A., Thompson L.T., Disterhoft J.F., Luiten P.G.M.: Age-related loss of calcium binding proteins in rabbit hippocampus. *Neurobiol Aging.* 1996, 17, 3, 459-465.
 126. De Kloet E.R., Sibug R.M., Helmerhorst F.M., Schmidt M.: Stress, genes and the mechanism of programming the brain for later life. *Neurosci Biobehav Rev.* 2005, 29, 2, 271-281.
 127. De Kloet E.R., Vreugdenhil E., Oitzl M.S., Joëls M.: Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev.* 1998, 19, 3, 269-301.
 128. De Oliveira R.M.W., Aparecida Del Bel E., Mamede-Rosa M.L.N., Padovan C.M., Deakin J.F.W., Guimarães F.S.: Expression of neuronal nitric oxide synthase mRNA in stress-related brain areas after restraint in rats. *Neurosci Lett.* 2000, 289, 2, 123-126.
 129. De Oliveira R.W., Del Bel E.A., Guimarães F.S.: Behavioral and c-fos expression changes induced by nitric oxide donors microinjected into the dorsal periaqueductal gray. *Brain Res Bull.* 2000, 51, 6, 457-464.
 130. 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, 1-19.
 131. Del Cerro M.C.R., Izquierdo M.A.P., Collado P., Segovia S., Guillemon A.: Bilateral lesions of the bed nucleus of the accessory olfactory tract facilitate maternal behavior in virgin female rats. *Physiol Behav.* 1991, 50, 1, 67-71.
 132. 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, 2, 247-259.
 133. Delfs J.M., Zhu Y., Druhan J.P., Aston-Jones G.: Noradrenaline in the ventral forebrain is critical for opiate withdrawal-induced aversion. *Nature.* 2000, 403, 6768, 430-434.
 134. Demeulemeester H., Vandesande F., Orban G.A., Brandon C., Vanderhaeghen J.J.: Heterogeneity of GABAergic cells in cat visual cortex. *J Neurosci.* 1988, 8, 3, 988-1000.
 135. Dent G., Choi D.C., Herman J.P., Levine S.: GABAergic circuits and the stress hyporesponsive period in the rat: Ontogeny of glutamic acid decarboxylase (GAD) 67 mRNA expression in limbic-hypothalamic stress pathways. *Brain Res.* 2007, 1138, 1, 1-9.
 136. DeOlmos J.S., Alheid G.F., Beltramino C.A.: Amygdala. W: G. Paxinos (red.): *The Rat Nervous System: Forebrain and Midbrain.* Sydney: Academic Press, 1985, s. 223-334.

137. Desjardins S., Mayo W., Vallée M., Hancock D., Le Moal M., Simon H., Abrous D.N.: Effect of aging on the basal expression of c-Fos, c-Jun, and Egr-1 proteins in the hippocampus. *Neurobiol Aging*. 1997, 18, 1, 37-44.
138. Dielenberg R.A., McGregor I.S.: Defensive behavior in rats towards predatory odors: A review. *Neurosci Biobehav Rev*. 2001, 25, 7-8, 597-609.
139. Diop A.G., Dussartre C., Barthe D., Hugon J.: Neuroprotective properties of cal-retinin against the HIV-1 gp120 toxicity. *Neurosci Res Commun*. 1996, 18, 2, 107-114.
140. Diorio D., Viau V., Meaney M.J.: The role of the medial prefrontal cortex (cingulate gyrus) in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *J Neurosci*. 1993, 13, 9, 3839-3847.
141. Dominguez J.M.: A role for preoptic glutamate in the regulation of male reproductive behavior. *Neuroscientist*. 2009, 15, 1, 11-19.
142. Dong H., Petrovich G.D., Swanson L.W.: Topography of projections from amygdala to bed nuclei of the stria terminalis. *Brain Res Rev*. 2001, 38, 1-2, 192-246.
143. Dong H., Petrovich G.D., Watts A.G., Swanson L.W.: Basic organization of projections from the oval and fusiform nuclei of the bed nuclei of the stria terminalis in adult rat brain. *J Comp Neurol*. 2001, 436, 4, 430-455.
144. Dong H., Swanson L.W.: Organization of axonal projections from the anterolateral area of the bed nuclei of the stria terminalis. *J Comp Neurol*. 2004, 468, 2, 277-298.
145. Doremus-Fitzwater T.L., Varlinskaya E.I., Spear L.P.: Motivational systems in adolescence: Possible implications for age differences in substance abuse and other risk-taking behaviors. *Brain Cogn*. 2010, 72, 1, 114-123.
146. Duncan G.E., Johnson K.B., Breese G.R.: Topographic patterns of brain activity in response to swim stress: Assessment by 2-deoxyglucose uptake and expression of Fos-like immunoreactivity. *J Neurosci*. 1993, 13, 9, 3932-3943.
147. Duncan G.E., Knapp D.J., Breese G.R.: Neuroanatomical characterization of Fos induction in rat behavioral models of anxiety. *Brain Res*. 1996, 713, 1-2, 79-91.
148. Dunn J.D., Whitener J.: Plasma corticosterone responses to electrical stimulation of the amygdaloid complex: Cytoarchitectural specificity. *Neuroendocrinology*. 1986, 42, 3, 211-217.
149. Dunn R.W., Reed T.A.W., Copeland P.D., Frye C.A.: The nitric oxide synthase inhibitor 7-nitroindazole displays enhanced anxiolytic efficacy without tolerance in rats following subchronic administration. *Neuropharmacology*. 1998, 37, 7, 899-904.
150. Echeverry M.B., Guimarães F.S., Del Bel E.A.: Acute and delayed restraint stress-induced changes in nitric oxide producing neurons in limbic regions. *Neuroscience*. 2004, 125, 4, 981-993.
151. Elliott E.M., Sapolsky R.M.: Corticosterone impairs hippocampal neuronal calcium regulation - Possible mediating mechanisms. *Brain Res*. 1993, 602, 1, 84-90.
152. Ellis B.J., Jackson J.J., Boyce W.T.: The stress response systems: Universality and adaptive individual differences. *Dev Rev*. 2006, 26, 2, 175-212.

-
153. Emmert M.H., Herman J.P.: Differential forebrain c-fos mRNA induction by ether inhalation and novelty: Evidence for distinctive stress pathways. *Brain Res.* 1999, 845, 1, 60-67.
 154. Enderlin S., Norman A.W., Celio M.R.: Ontogeny of the calcium binding protein calbindin D-28k in the rat nervous system. *Anat Embryol.* 1987, 177, 1, 15-28.
 155. Enthoven L., de Kloet E.R., Oitzl M.S.: Differential development of stress system (re)activity at weaning dependent on time of disruption of maternal care. *Brain Res.* 2008, 1217, C, 62-69.
 156. 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, 115-131.
 157. Eroglu L., Caglayan B.: Anxiolytic and antidepressant properties of methylene blue in animal models. *Pharmacol Res.* 1997, 36, 5, 381-385.
 158. Everitt B.J., Morris K.A., O'Brien A., Robbins T.W.: The basolateral amygdala-ventral striatal system and conditioned place preference: Further evidence of limbic-striatal interactions underlying reward-related processes. *Neuroscience.* 1991, 42, 1, 1-18.
 159. Fanselow M.S., Kim J.J.: Acquisition of contextual pavlovian fear conditioning is blocked by application of an NMDA receptor antagonist D,L-2-amino-5-phosphonovaleric acid to the basolateral amygdala. *Behav Neurosci.* 1994, 108, 1, 210-212.
 160. Farb C.R., Ledoux J.E.: Afferents from rat temporal cortex synapse on lateral amygdala neurons that express NMDA and AMPA receptors. *Synapse.* 1999, 33, 3, 218-229.
 161. Faria M.S., Muscará M.N., Moreno Jr. H., Teixeira S.A., Dias H.B., De Oliveira B., Graeff F.G., De Nucci G.: Acute inhibition of nitric oxide synthesis induces anxiolysis in the plus maze test. *Eur J Pharmacol.* 1997, 323, 1, 37-43.
 162. Feindel W., Rasmussen T.: Temporal lobectomy with amygdectomy and minimal hippocampal resection: Review of 100 cases. *Can J Neurol Sci* 1991, 18, SUPPL. 4, 603-605.
 163. Feldman S., Conforti N.: Amygdectomy inhibits adrenocortical responses to somatosensory and olfactory stimulation. *Neuroendocrinology.* 1981, 32, 6, 330-334.
 164. Feldman S., Conforti N., Itzik A., Weidenfeld J.: Differential effect of amygdaloid lesions on CRF-41, ACTH and corticosterone responses following neural stimuli. *Brain Res.* 1994, 658, 1-2, 21-26.
 165. Ferguson J.N., Aldag J.M., Insel T.R., Young L.J.: Oxytocin in the medial amygdala is essential for social recognition in the mouse. *J Neurosci.* 2001, 21, 20, 8278-8285.
 166. Figueiredo H.F., Bodie B.L., Tauchi M., Dolgas C.M., Herman J.P.: Stress integration after acute and chronic predator stress: differential activation of central stress circuitry and sensitization of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Endocrinology.* 2003, 144, 12, 5249-5258.

167. Fleming A., Vaccarino F., Tambosso L., Chee P.: Vomeronasal and olfactory system modulation of maternal behavior in the rat. *Science*. 1979, 203, 4378, 372-374.
168. Fleming A.S., Rosenblatt J.S.: Olfactory regulation of maternal behavior in rats: I. Effects of olfactory bulb removal in experienced and inexperienced lactating and cycling females. *J Comp Physiol Psychol*. 1974, 86, 2, 221-232.
169. Fleming A.S., Rosenblatt J.S.: Olfactory regulation of maternal behavior in rats: II. Effects of peripherally induced anosmia and lesions of the lateral olfactory tract in pup induced virgins. *J Comp Physiol Psychol*. 1974, 86, 2, 233-246.
170. Forestiero D., Manfrim C.M., Guimarães F.S., De Oliveira R.M.W.: Anxiolytic-like effects induced by nitric oxide synthase inhibitors microinjected into the medial amygdala of rats. *Psychopharmacology (Berl.)*. 2006, 184, 2, 166-172.
171. Fox C.A.: Certain basal telencephalic centers in the cat. *J Comp Neurol*. 1940, 72, 1-62.
172. 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, 4, 1203-1214.
173. Freund T.F.: Interneuron diversity series: Rhythm and mood in perisomatic inhibition. *Trends Neurosci*. 2003, 26, 9, 489-495.
174. Freund T.F., Buzsáki G.: Interneurons of the Hippocampus. *Hippocampus*. 1996, 6, 4, 347-470.
175. 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, 1, 55-66.
176. Friauf E.: Distribution of calcium-binding protein calbindin-D(28k) in the auditory system of adult and developing rats. *J Comp Neurol*. 1994, 349, 2, 193-211.
177. Frolkis V.V.: Stress-age syndrome. *Mech Ageing Dev*. 1993, 69, 1-2, 93-107.
178. Gall D., Roussel C., Susa I., D'Angelo E., Rossi P., Bearzatto B., Galas M.C., Blum D., Schurmans S., Schiffmann S.N.: Altered neuronal excitability in cerebellar granule cells of mice lacking calretinin. *J Neurosci*. 2003, 23, 28, 9320-9327.
179. Gallagher M., Graham P.W., Holland P.C.: The amygdala central nucleus and appetitive pavlovian conditioning: Lesions impair one class of conditioned behavior. *J Neurosci*. 1990, 10, 6, 1906-1911.
180. García-López M., Abellán A., Legaz I., Rubenstein J.L.R., Puellas L., Medina L.: Histogenetic compartments of the mouse centromedial and extended amygdala based on gene expression patterns during development. *J Comp Neurol*. 2008, 506, 1, 46-74.
181. Garthwaite J., Boulton C.L.: Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu Rev Physiol*. 1995, 57, 683-706.
182. 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, 4-5, 413-416.

183. Garthwaite J., Southam E., Anderton M.: A kainate receptor linked to nitric oxide synthesis from arginine. *J Neurochem.* 1989, 53, 6, 1952-1954.
184. Gauriau C., Bernard J.: Pain pathways and parabrachial circuits in the rat. *Exp Physiol.* 2002, 87, 2, 251-258.
185. Geula C., Schatz C.R., Mesulam M.: Differential localization of NADPH-diaphorase and calbindin-D (28k) within the cholinergic neurons of the basal forebrain, striatum and brainstem in the rat, monkey, baboon and human. *Neuroscience.* 1993, 54, 2, 461-476.
186. Gewirtz J.C., Davis M.: Second-order fear conditioning prevented by blocking NMDA receptors in amygdala. *Nature.* 1997, 388, 6641, 471-474.
187. Giachino C., Canalia N., Capone F., Fasolo A., Alleva E., Riva M.A., Cirulli F., Peretto P.: Maternal deprivation and early handling affect density of calcium binding protein-containing neurons in selected brain regions and emotional behavior in periadolescent rats. *Neuroscience.* 2007, 145, 2, 568-578.
188. Gibbs S.M.: Regulation of neuronal proliferation and differentiation by nitric oxide. *Mol Neurobiol.* 2003, 27, 2, 107-120.
189. Gilad G.M., Gilad V.H.: Strain, stress, neurodegeneration and longevity. *Mech Ageing Dev.* 1995, 78, 2, 75-83.
190. Givalois L., Li S., Pelletier G.: Central nitric oxide regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis in adult male rats. *Brain Res Mol Brain Res.* 2002, 102, 1-2, 1-8.
191. Goddard G.V.: Functions of the amygdala. *Psychol Bull.* 1964, 62, 2, 89-109.
192. Goldman L., Winget C., Hollingshead G.W., Levine S.: Postweaning development of negative feedback in the pituitary adrenal system of the rat. *Neuroendocrinology.* 1973, 12, 3, 199-211.
193. Gomez D.M., Newman S.W.: Differential projections of the anterior and posterior regions of the medial amygdaloid nucleus in the Syrian hamster. *J Comp Neurol.* 1992, 317, 2, 195-218.
194. Gonzalez-Hernandez T., De La Cruz M.A.P., Mantolan-Sarmiento B.: Histochemical and immunohistochemical detection of neurons that produce nitric oxide: Effect of different fixative parameters and immunoreactivity against non-neuronal NOS antisera. *J Histochem Cytochem.* 1996, 44, 12, 1399-1413.
195. Goyer M., Bui H., Chou L., Evans J., Keil L.C., Reid I.A.: Effect of inhibition of nitric oxide synthesis on vasopressin secretion in conscious rabbits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1994, 266, 2 35-2, 822-828.
196. Graeff F.G.: Brain defense system and anxiety. W: M. Roth (red.): *Handbook of Anxiety.* Amsterdam: Elsevier, 1990, s. 307-354.
197. Guimarães F.S., Bejjani V., Moreira F.A., Aguiar D.C., De Lucca A.C.B.: Role of nitric oxide in brain regions related to defensive reactions. *Neurosci Biobehav Rev.* 2005, 29, 8, 1313-1322.
198. Guirado S., Real M.A., Dávila J.C.: Distinct immunohistochemically defined areas in the medial amygdala in the developing and adult mouse. *Brain Res Bull.* 2008, 75, 2-4, 214-217.

199. Guirado S., Real M.A., Dávila J.C.: Distinct immunohistochemically defined areas in the medial amygdala in the developing and adult mouse. *Brain Res Bull.* 2008, 75, 2-4, 214-217.
200. Gurden H., Schiffmann S.N., Lemaire M., Böhme G.A., Parmentier M., Schurmans S.: Calretinin expression as a critical component in the control of dentate gyrus long-term potentiation induction in mice. *Eur J Neurosci.* 1998, 10, 9, 3029-3033.
201. Gurdjian E.S.: The corpus striatum of the rat. Studies on the brain of the rat, *J Comp Neurol.* 1928, 45, 249-281.
202. Haas H.S., Schauenstein K.: Neuroimmunomodulation via limbic structures - The neuroanatomy of psychoimmunology. *Prog Neurobiol.* 1997, 51, 2, 195-222.
203. Haase A., Bicker G.: Nitric oxide and cyclic nucleotides are regulators of neuronal migration in an insect embryo. *Development.* 2003, 130, 17, 3977-3987.
204. Hadeishi Y., Wood R.I.: Nitric oxide synthase in mating behavior circuitry of male Syrian hamster brain. *J Neurobiol.* 1996, 30, 4, 480-492.
205. Halász J., Liposits Z., Kruk M.R., Haller J.: Neural background of glucocorticoid dysfunction-induced abnormal aggression in rats: Involvement of fear- and stress-related structures. *Eur J Neurosci.* 2002, 15, 3, 561-569.
206. Haldane M., Frangou S.: New insights help define the pathophysiology of bipolar affective disorder: Neuroimaging and neuropathology findings. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2004, 28, 6, 943-960.
207. Hale M.W., Bouwknecht J.A., Spiga F., Shekhar A., Lowry C.A.: Exposure to high- and low-light conditions in an open-field test of anxiety increases c-Fos expression in specific subdivisions of the rat basolateral amygdaloid complex. *Brain Res Bull.* 2006, 71, 1-3, 174-182.
208. Hall J., Thomas K.L., Everitt B.J.: Fear memory retrieval induces CREB phosphorylation and Fos expression within the amygdala. *Eur J Neurosci.* 2001, 13, 7, 1453-1458.
209. Handa R.J., Cross M.K., George M., Gordon B.H., Burgess L.H., Cabrera T.M., Hata N., Campbell D.B., Lorens S.A.: Neuroendocrine and neurochemical responses to novelty stress in young and old male F344 rats: Effects of d-fenfluramine treatment. *Pharmacol Biochem Behav.* 1993, 46, 1, 101-109.
210. Hatakeyama S., Kawai Y., Ueyama T., Senba E.: Nitric oxide synthase-containing magnocellular neurons of the rat hypothalamus synthesize oxytocin and vasopressin and express Fos following stress stimuli. *J Chem Neuroanat.* 1996, 11, 4, 243-256.
211. Hauger R.L., Thrivikraman K.V., Plotsky P.M.: Age-related alterations of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in male Fischer 344 rats. *Endocrinology.* 1994, 134, 3, 1528-1536.
212. Hawkes C.: Olfaction in neurodegenerative disorder. *Mov Disord.* 2003, 18, 4, 364-372.
213. Heizmann C.W.: Calcium-binding proteins: basic concepts and clinical implications. *Gen Physiol Biophys.* 1992, 11, 5, 411-425.

-
214. Heizmann C.W.: Parvalbumin, an intracellular calcium-binding protein; distribution, properties and possible roles in mammalian cells. *Experientia*. 1984, 40, 9, 910-921.
 215. Heizmann C.W., Braun K.: Changes in Ca^{2+} -binding proteins in human neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci*. 1992, 15, 7, 259-264.
 216. Hendrickson A.E., Van Brederode J.F.M., Mulligan K.A., Celio M.R.: Development of the calcium-binding proteins parvalbumin and calbindin in monkey striate cortex. *J Comp Neurol*. 1991, 307, 4, 626-646.
 217. Herman J.P., Cullinan W.E.: Neurocircuitry of stress: Central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci*. 1997, 20, 2, 78-84.
 218. Herman J.P., Dolgas C.M., Carlson S.L.: Ventral subiculum regulates hypothalamo-pituitary-adrenocortical and behavioural responses to cognitive stressors. *Neuroscience*. 1998, 86, 2, 449-459.
 219. Herman J.P., Figueiredo H., Mueller N.K., Ulrich-Lai Y., Ostrander M.M., Choi D.C., Cullinan W.E.: Central mechanisms of stress integration: Hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol*. 2003, 24, 3, 151-180.
 220. Herman J.P., Mueller N.K., Figueiredo H.: Role of GABA and glutamate circuitry in hypothalamo-pituitary-adrenocortical stress integration. *Ann NY Acad Sci*. 2004, 1018, 35-45.
 221. Herman J.P., Tasker J.G., Ziegler D.R., Cullinan W.E.: Local circuit regulation of paraventricular nucleus stress integration: Glutamate-GABA connections. *Pharmacol Biochem Behav*. 2002, 71, 3, 457-468.
 222. Herrera D.G., Robertson H.A.: Activation of c-fos in the brain. *Prog Neurobiol*. 1996, 50, 2-3, 83-107.
 223. Herry C., Bach K., Scheffler E., Seifritz E., Luthi A.: The amygdala as a detector of unpredictability in mice and humans, Program No. 416. 1. 2005, Abstract Viewer/Itinerary Planner Washington, Society for Neuroscience (2005) (online, 2005).
 224. Heuser I., Lammers C., Toussaint, Thijssen, Finch, Swaab, De Kloet, Kessler, Salletu, De Wied, Nijhuis: Stress and the brain. *Neurobiol Aging*. 2003, 24, Suppl. 1, 69-76, 81-82.
 225. Hilbig H., Franke H., Bidmon H., Illes P.: Nitric oxide synthase isoenzymes during in vitro development of rat neuronal and human non-neuronal cells. *Neurosci Lett*. 2001, 297, 1, 9-12.
 226. Hindley S., Juurlink B.H.J., Gysbers J.W., Middlemiss P.J., Herman M.A.R., Rathbone M.P.: Nitric oxide donors enhance neurotrophin-induced neurite outgrowth through a cGMP-dependent mechanism. *J Neurosci Res*. 1997, 47, 4, 427-439.
 227. Hof P.R., Glezer I.I., Condé F., Flagg R.A., Rubin M.B., Nimchinsky E.A., Vogt Weisenhorn D.M.: 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, 2, 77-116.

-
228. Hofmann F., Dostmann W., Keilbach A., Landgraf W., Ruth P.: Structure and physiological role of cGMP-dependent protein kinase. *Biochim Biophys Acta*. 1992, 1135, 1, 51-60.
 229. Holahan M.R., White N.M.: Amygdala c-Fos induction corresponds to unconditioned and conditioned aversive stimuli but not to freezing. *Behav Brain Res*. 2004, 152, 1, 109-120.
 230. Holscher C.: Nitric oxide, the enigmatic neuronal messenger: Its role in synaptic plasticity. *Trends Neurosci*. 1997, 20, 7, 298-303.
 231. Honda K., Aradachi H., Higuchi T., Takano S., Negoro H.: Activation of paraventricular neurosecretory cells by local osmotic stimulation of the median preoptic nucleus. *Brain Res*. 1992, 594, 2, 335-338.
 232. Hope B.T., Michael G.J., Knigge K.M., Vincent S.R.: Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991, 88, 7, 2811-2814.
 233. Hudson L.P., Munoz D.G., Miller L., McLachlan R.S., Girvin J.P., Blume W.T.: Amygdaloid sclerosis in temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol*. 1993, 33, 6, 622-631.
 234. Hughes P., Lawlor P., Dragunow M.: Basal expression of Fos, Fos-related, Jun, and Krox 24 proteins in rat hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res*. 1992, 13, 4, 355-357.
 235. Hull E.M., Lorrain D.S., Du J., Matuszewich L., Lumley L.A., Putnam S.K., Moses J.: Hormone-neurotransmitter interactions in the control of sexual behavior. *Behav Brain Res*. 1999, 105, 1, 105-116.
 236. Humphrey T.: The telencephalon of the bat. I. The non-cortical nuclear masses and certain pertinent fiber connections. *J Comp Neurol*. 1936, 65, 603-711.
 237. Hurley K.M., Herbert H., Moga M.M., Saper C.B.: Efferent projections of the infralimbic cortex of the rat. *J Comp Neurol*. 1991, 308, 2, 249-276.
 238. Iacopino A., Christakos S., German D., Sonsalla P.K., Altar C.A.: Calbindin-D (28K)-containing neurons in animal models of neurodegeneration: Possible protection from excitotoxicity. *Brain Res Mol Brain Res*. 1992, 13, 3, 251-261.
 239. Iacopino A.M., Christakos S.: Specific reduction of calcium-binding protein (28-kilodalton calbindin-D) gene expression in aging and neurodegenerative diseases. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990, 87, 11, 4078-4082.
 240. Ikeda J., Nakajima T., Osborne O.C., Mies G., Nowak Jr. T.S.: Coexpression of c-fos and hsp70 mRNAs in gerbil brain after ischemia: Induction threshold, distribution and time course evaluated by in situ hybridization. *Brain Res Mol Brain Res*. 1994, 26, 1-2, 249-258.
 241. Imaki T., Shibasaki T., Hotta M., Demura H.: Intracerebroventricular administration of corticotropin-releasing factor induces c-fos mRNA expression in brain regions related to stress responses: Comparison with pattern of c-fos mRNA induction after stress. *Brain Res*. 1993, 616, 1-2, 114-125.
 242. Isaacs K.R., Wolpoe M.E., Jacobowitz D.M.: Vulnerability to calcium-induced neurotoxicity in cultured neurons expressing calretinin. *Exp Neurol*. 2000, 163, 2, 311-323.

-
243. Issa A.M., Rowe W., Gauthier S., Meaney M.J.: Hypothalamic-pituitary-adrenal activity in aged, cognitively impaired and cognitively unimpaired rats. *J Neurosci.* 1990, 10, 10, 3247-3254.
244. Izquierdo M.A.P., Collado P., Segovia S., Guillaumon A., Del Cerro M.C.R.: Maternal behavior induced in male rats by bilateral lesions of the bed nucleus of the accessory olfactory tract. *Physiol Behav.* 1992, 52, 4, 707-712.
245. Jaworski J., Biedermann I.W., Lapinska J., Szklarczyk A., Figiel I., Konopka D., Nowicka D., Filipkowski R.K., Hetman M., Kowalczyk A., Kaczmarek L.: Neuronal excitation-driven and AP-1-dependent activation of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 gene expression in rodent hippocampus. *J Biol Chem.* 1999, 274, 40, 28106-28112.
246. Jay T.M., Witter M.P.: Distribution of hippocampal CA1 and subicular efferents in the prefrontal cortex of the rat studied by means of anterograde transport of Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. *J Comp Neurol.* 1991, 313, 4, 574-586.
247. Jia H., Rao Z., Shi J.: Evidence of γ -aminobutyric acidergic control over the catecholaminergic projection from the medulla oblongata to the central nucleus of the amygdala. *J Comp Neurol.* 1997, 381, 3, 262-281.
248. Jin C., Rockhold R.W.: Effects of paraventricular hypothalamic microinfusions of kainic acid on cardiovascular and renal excretory function in conscious rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 1989, 251, 3, 969-975.
249. Johnston J.B.: Further contributions to the study of the evolution of the forebrain. *J Comp Neurol.* 1923, 35, 135-150.
250. Jolkkonen E., Pitkänen A.: Intrinsic connections of the rat amygdaloid complex: Projections originating in the central nucleus. *J Comp Neurol.* 1998, 395, 1, 53-72.
251. Joo K.M., Chung Y.H., Shin C.M., Lee Y.J., Cha C.I.: Region-specific alterations of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) expression in the amygdala of the aged rats. *Brain Res.* 2004, 999, 2, 231-236.
252. Joppa M.A., Meisel R.L., Garber M.A.: c-Fos expression in female hamster brain following sexual and aggressive behaviors. *Neuroscience.* 1995, 68, 3, 783-792.
253. Kaada B.R.: Somato-motor, autonomic and electroencephalographic responses to electrical stimulation of «rhinencephalic» and other structures in primates, cat and dog. *Acta Physiol Scand.* 1951, 23, 83, suppl.
254. Kaczmarek L.: Gene expression in learning processes. *Acta Neurobiol Exp.* 2000, 60, 3, 419-424.
255. Kaczmarek L.: Molecular biology of vertebrate learning: Is c-fos a new beginning? *J Neurosci Res.* 1993, 34, 4, 377-381.
256. Kaczmarek L., Chaudhuri A.: Sensory regulation of immediate-early gene expression in mammalian visual cortex: Implications for functional mapping and neural plasticity. *Brain Res Rev.* 1997, 23, 3, 237-256.

-
257. Kaczmarek L., Lapinska-Dzwonek J., Szymczak S.: Matrix metalloproteinases in the adult brain physiology: A link between c-Fos, AP-1 and remodeling of neuronal connections? *EMBO J.* 2002, 21, 24, 6643-6648.
258. Kasai H.: Cytosolic Ca^{2+} gradients, Ca^{2+} binding proteins and synaptic plasticity. *Neurosci Res.* 1993, 16, 1, 1-7.
259. Katchanov J., Waeber C., Gertz K., Gietz A., Winter B., Brück W., Dirnagl U., Veh R.W., Endres M.: Selective neuronal vulnerability following mild focal brain ischemia in the mouse. *Brain Pathol.* 2003, 13, 4, 452-464.
260. Kaufman J., Plotsky P.M., Nemeroff C.B., Charney D.S.: Effects of early adverse experiences on brain structure and function: Clinical implications. *Biol Psychiatry.* 2000, 48, 8, 778-790.
261. Kawaguchi Y., Wilson C.J., Augood S.J., Emson P.C.: Striatal interneurons: Chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci.* 1995, 18, 12, 527-535.
262. 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, 4, 1193-1201.
263. Keller M., Meurisse M., Lévy F.: Mapping the neural substrates involved in maternal responsiveness and lamb olfactory memory in parturient ewes using Fos imaging. *Behav Neurosci.* 2004, 118, 6, 1274-1284.
264. Keller M., Perrin G., Meurisse M., Ferreira G., Lévy F.: Cortical and medial amygdala are both involved in the formation of olfactory offspring memory in sheep. *Eur J Neurosci.* 2004, 20, 12, 3433-3441.
265. Kemppainen S., Pitkänen A.: Distribution of parvalbumin, calretinin, and calbindin-D(28k) immunoreactivity in the rat amygdaloid complex and colocalization with γ -aminobutyric acid. *J Comp Neurol.* 2000, 426, 3, 441-467.
266. Kendrick K.M., Guevara-Guzman R., Zorrilla J., Hinton M.R., Broad K.D., Mimmack M., Ohkura S.: Formation of olfactory memories mediated by nitric oxide. *Nature.* 1997, 388, 6643, 670-674.
267. Keng Chen Liang, Hon W., Davis M.: Pre- and posttraining infusion of N-methyl-d-aspartate receptor antagonists into the amygdala impair memory in an inhibitory avoidance task. *Behav Neurosci.* 1994, 108, 2, 241-253.
268. Kevetter G.A., Winans S.S.: Connections of the corticomedial amygdala in the golden hamster. I. Efferents of the 'vomeronasal amygdala'. *J Comp Neurol.* 1981, 197, 1, 81-98.
269. Kevetter G.A., Winans S.S.: Connections of the corticomedial amygdala in the golden hamster. II. Efferents of the 'olfactory amygdala'. *J Comp Neurol.* 1981, 197, 1, 99-111.
270. Kimpo R.R., Doupe A.J.: FOS is induced by singing in distinct neuronal populations in a motor network. *Neuron.* 1997, 18, 2, 315-325.

-
271. Kirischuk S., Verkhratsky A.: Calcium homeostasis in aged neurones. *Life Sci.* 1996, 59, 5-6, 451-459.
272. Kishimoto J., Tsuchiya T., Emson P.C., Nakayama Y.: Immobilization-induced stress activates neuronal nitric oxide synthase (nNOS) mRNA and protein in hypothalamic-pituitary-adrenal axis in rats. *Brain Res.* 1996, 720, 1-2, 159-171.
273. Kiyama H., Seto-Ohshima A., Emson P.C.: Calbindin D(28K) as a marker for the degeneration of the striatonigral pathway in Huntington's disease. *Brain Res.* 1990, 525, 2, 209-214.
274. Kiyokawa Y., Kikusui T., Takeuchi Y., Mori Y.: Mapping the neural circuit activated by alarm pheromone perception by c-Fos immunohistochemistry. *Brain Res.* 2005, 1043, 1-2, 145-154.
275. Klapstein G.J., Vietla S., Lieberman D.N., Gray P.A., Airaksinen M.S., Thoenen H., Meyer M., Mody I.: Calbindin-D(28k) fails to protect hippocampal neurons against ischemia in spite of its cytoplasmic calcium buffering properties: Evidence from calbindin-D(28k) knockout mice. *Neuroscience.* 1998, 85, 2, 361-373.
276. Klejbor I., Łuczyńska A., Ludkiewicz B., Domaradzka-Pytel B., Moryś J.: The developmental pattern of c-fos expression in the rat thalamus following open-field stress stimulation. *Pol J Vet Sci.* 2003, 6, 3, 201-207.
277. Kluver H., Bucy P.C.: "Psychic blindness" and other symptoms following bilateral temporal lobectomy in rhesus monkeys. *Am J Physiol.* 1937, 119, 352-353.
278. Knapska E., Radwanska K., Werka T., Kaczmarek L.: Functional internal complexity of amygdala: Focus on gene activity mapping after behavioral training and drugs of abuse. *Physiol Rev.* 2007, 87, 4, 1113-1173.
279. Knapska E., Walasek G., Nikolaev E., Neuhausser-Wespy F., Lipp H.-., Kaczmarek L., Werka T.: Differential involvement of the central amygdala in appetitive versus aversive learning. *Learn Mem.* 2006, 13, 2, 192-200.
280. Kollack-Walker S., Newman S.W.: Mating and agonistic behavior produce different patterns of Fos immunolabeling in the male Syrian hamster brain. *Neuroscience.* 1995, 66, 3, 721-736.
281. Koob G.F.: Corticotropin-releasing factor, norepinephrine, and stress. *Biol Psychiatry.* 1999, 46, 9, 1167-1180.
282. Koob G.F., Heinrichs S.C., Pich E.M., Menzaghi F., Baldwin H., Miczek K., Britton K.T.: The role of corticotropin-releasing factor in behavioural responses to stress. *Ciba Found Symp.* 1993, 172, 277-290.
283. Kosten T.A., Miserendino M.J.D., Bombace J.C., Lee H.J., Kim J.J.: Sex-selective effects of neonatal isolation on fear conditioning and foot shock sensitivity. *Behav Brain Res.* 2005, 157, 2, 235-244.
284. Kovács K.J.: c-Fos as a transcription factor: A stressful (re)view from a functional map. *Neurochem Int.* 1998, 33, 4, 287-297.
285. Kowiański P., Dziewiatkowski J., Moryś J.M., Majak K., Wójcik S., Edelstein L.R., Lietzau G., Moryś J.: Colocalization of neuropeptides with calcium-binding

- proteins in the claustral interneurons during postnatal development of the rat. *Brain Res Bull.* 2009, 80, 3, 100-106.
286. Kowiański P., Moryś J.M., Wójcik S., Dziewiatkowski J., Łuczyńska A., Spodnik E., Timmermans J., 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, 1, 97-110.
287. Kowiański P., Moryś J.M., Wójcik S., Dziewiatkowski J., Moryś J.: Co-localisation of NOS with calcium-binding proteins during the postnatal development of the rat claustrum. *Folia Morphol.* 2003, 62, 3, 211-214.
288. Kowiański P., Moryś J.M., Wójcik S., Dziewiatkowski J., Moryś J.: Postnatal development of NOS-ir neurons in the rat claustrum. *Folia Morphol.* 2003, 62, 1, 11-17.
289. Krettek J.E., Price J.L.: Amygdaloid projections to subcortical structures within the basal forebrain and brainstem in the rat and cat. *J Comp Neurol.* 1978, 178, 2, 225-253.
290. Krieger M.S., Conrad L.C., Pfaff D.W.: An autoradiographic study of the efferent connections of the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *J Comp Neurol.* 1979, 183, 4, 785-815.
291. Krukoff T.L.: Central actions of nitric oxide in regulation of autonomic functions. *Brain Res Rev.* 1999, 30, 1, 52-65.
292. Krukoff T.L., Khalili P.: Stress-induced activation of nitric oxide-producing neurons in the rat brain. *J Comp Neurol.* 1997, 377, 4, 509-519.
293. Krzywkowski P., Jacobowitz D.M., Lamour Y.: Calretinin-containing pathways in the rat forebrain. *Brain Res.* 1995, 705, 1-2, 273-294.
294. Kubo T., Okatani H., Nishigori Y., Hagiwara Y., Fukumori R., Goshima Y.: Involvement of the medial amygdaloid nucleus in restraint stress-induced pressor responses in rats. *Neurosci Lett.* 2004, 354, 1, 84-86.
295. 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 USA.* 1992, 89, 14, 6348-6352.
296. Lazarov N.E.: Comparative analysis of the chemical neuroanatomy of the mammalian trigeminal ganglion and mesencephalic trigeminal nucleus. *Prog Neurobiol.* 2002, 66, 1, 19-59.
297. LeDoux J.: *Mózg emocjonalny*. Poznań: Media Rodzina, 2000. ISBN 83-85594-93-0.
298. LeDoux J.E.: Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci.* 2000, 23, 155-184.
299. LeDoux J.E., Cicchetti P., Xagoraris A., Romanski L.M.: The lateral amygdaloid nucleus: Sensory interface of the amygdala in fear conditioning. *J Neurosci.* 1990, 10, 4, 1062-1069.

-
300. LeDoux J.E., Farb C., Ruggiero D.A.: Topographic organization of neurons in the acoustic thalamus that project to the amygdala. *J Neurosci.* 1990, 10, 4, 1043-1054.
 301. LeDoux J.E., Farb C.R.: Neurons of the acoustic thalamus that project to the amygdala contain glutamate. *Neurosci Lett.* 1991, 134, 1, 145-149.
 302. LeDoux J.E., Farb C.R., Milner T.A.: Ultrastructure and synaptic associations of auditory thalamo-amygdala projections in the rat. *Exp Brain Res.* 1991, 85, 3, 577-586.
 303. LeDoux J.E., Farb C.R., Romanski L.M.: Overlapping projections to the amygdala and striatum from auditory processing areas of the thalamus and cortex. *Neurosci Lett.* 1991, 134, 1, 139-144.
 304. LeDoux J.E., Iwata J., Cicchetti P., Reis D.J.: Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. *J Neurosci.* 1988, 8, 7, 2517-2529.
 305. LeDoux J.E., Ruggiero D.A., Forest R., Stornetta R., Reis D.J.: Topographic organization of convergent projections to the thalamus from the inferior colliculus and spinal cord in the rat. *J Comp Neurol.* 1987, 264, 1, 123-146.
 306. Legaz I., Olmos L., Real M.A., Guirado S., Dávila J.C., Medina L.: Development of neurons and fibers containing calcium binding proteins in the pallial amygdala of mouse, with special emphasis on those of the basolateral amygdalar complex. *J Comp Neurol.* 2005, 488, 4, 492-513.
 307. Leontovich T.A., Mukhina Y.K., Fedorov A.A.: Neurons of the basal ganglia of the human brain (striatum and basolateral amygdala) expressing the enzyme NADPH-d. *Neurosci Behav Physiol.* 2004, 34, 3, 277-286.
 308. Levine S.: The pituitary-adrenal system and the developing brain. *Prog Brain Res.* 1970, 32, 79-85.
 309. Li C., Maglinao T.L., Takahashi L.K.: Medial amygdala modulation of predator odor-induced unconditioned fear in the rat. *Behav Neurosci.* 2004, 118, 2, 324-332.
 310. Li H., Blaustein J.D., De Vries G.J., Wade G.N.: Estrogen-receptor immunoreactivity in hamster brain: Preoptic area, hypothalamus and amygdala. *Brain Res.* 1993, 631, 2, 304-312.
 311. Li H., Sawchenko P.E.: Hypothalamic effector neurons and extended circuitries activated in 'neurogenic' stress: A comparison of footshock effects exerted acutely, chronically, and in animals with controlled glucocorticoid levels. *J Comp Neurol.* 1998, 393, 2, 244-266.
 312. Li Y., Zhang W., Stern J.E.: Nitric oxide inhibits the firing activity of hypothalamic paraventricular neurons that innervate the medulla oblongata: Role of GABA. *Neuroscience.* 2003, 118, 3, 585-601.
 313. Lind R.W., Ganten D.: Angiotensin. W: M.J. Kuhar (red.): *Handbook of Chemical Neuroanatomy* 9. Amsterdam: Elsevier, 1990, s. 165-286.
 314. Lino De Oliveira C., Del Bel E.A., Guimarães F.S.: Effects of L-NOARG on plus-maze performance in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 1997, 56, 1, 55-59.

-
315. Lipton S.A., Singel D.J., Stamler J.S.: Neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and redox congeners. *Ann NY Acad Sci.* 1994, 738, 382-387.
 316. Lipton S.A., Singel D.J., Stamler J.S.: Nitric oxide in the central nervous system. *Prog Brain Res.* 1994, 103, 359-364.
 317. Liu D., Caldji C., Sharma S., Plotsky P.M., Meaney M.J.: Influence of neonatal rearing conditions on stress-induced adrenocorticotropin responses and norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus. *J Neuroendocrinol.* 2000, 12, 1, 5-12.
 318. Liu D., Diorio J., Tannenbaum B., Caldji C., Francis D., Freedman A., Sharma S., Pearson D., Plotsky P.M., Meaney M.J.: Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science.* 1997, 277, 5332, 1659-1662.
 319. Livia Terranova M., Cirulli F., Laviola G.: Behavioral and hormonal effects of partner familiarity in periadolescent rat pairs upon novelty exposure. *Psychoneuroendocrinology.* 1999, 24, 6, 639-656.
 320. Lupien S.J., McEwen B.S., Gunnar M.R., Heim C.: Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nat Rev Neurosci.* 2009, 10, 6, 434-445.
 321. Luskin M.B., Price J.L.: The topographic organization of associational fibers of the olfactory system in the rat, including centrifugal fibers to the olfactory bulb. *J Comp Neurol.* 1983, 216, 3, 264-291.
 322. Lyss P.J., Andersen S.L., Leblanc C.J., Teicher M.H.: Degree of neuronal activation following FG-7142 changes across regions during development. *Dev Brain Res.* 1999, 116, 2, 201-203.
 323. Makara G.B., Stark E.: Effect of gamma aminobutyric acid (GABA) and GABA antagonist drugs on ACTH release. *Neuroendocrinology.* 1974, 16, 3-4, 178-190.
 324. Mann D.M.A., Oliver R., Snowden J.S.: The topographic distribution of brain atrophy in Huntington's disease and progressive supranuclear palsy. *Acta Neuropathol.* 1993, 85, 5, 553-559.
 325. Marchei P., Diverio S., Falocci N., Fatjó J., Ruiz-de-la-Torre J.L., Manteca X.: Breed differences in behavioural development in kittens. *Physiol Behav.* 2009, 96, 4-5, 522-531.
 326. Marcos P., Coveñas R., Narváez J.A., Diaz-Cabiale Z., Aguirre J.A., Tramu G., González-Barón S.: Immunohistochemical mapping of enkephalins, NPY, CGRP, and GRP in the cat amygdala. *Peptides.* 1999, 20, 5, 635-644.
 327. Marcuzzo S., Dall'Oglio A., Ribeiro M.F.M., Achaval M., Rasia-Filho A.A.: Dendritic spines in the posterodorsal medial amygdala after restraint stress and ageing in rats. *Neurosci Lett.* 2007, 424, 1, 16-21.
 328. Maren S.: Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. *Annu Rev Neurosci.* 2001, 24, 897-931.
 329. Maren S.: Auditory fear conditioning increases CS-elicited spike firing in lateral amygdala neurons even after extensive overtraining. *Eur J Neurosci.* 2000, 12, 11, 4047-4054.

-
330. Maren S.: Long-term potentiation in the amygdala: A mechanism for emotional. *Trends Neurosci.* 1999, 22, 12, 561-567.
331. Maren S., Fanselow M.S.: The amygdala and fear conditioning: Has the nut been cracked? *Neuron.* 1996, 16, 2, 237-240.
332. Markram H., Toledo-Rodriguez M., Wang Y., Gupta A., Silberberg G., Wu C.: Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci.* 2004, 5, 10, 793-807.
333. Marks I.: *Fears, Phobias and Rituals: Panic, Anxiety, and Their Disorders.* New York: Oxford University Press, New York. ISBN 9780195039276.
334. Marques D.M.: Roles of the main olfactory and vomeronasal systems in the response of the female hamster to young. *Behav Neural Biol.* 1979, 26, 3, 311-329.
335. Martin D.S., Segura T., Haywood J.R.: Cardiovascular responses to bicuculline in the paraventricular nucleus of the rat. *Hypertension.* 1991, 18, 1, 48-55.
336. Martin S.J., Grimwood P.D., Morris R.G.M.: Synaptic plasticity and memory: An evaluation of the hypothesis. *Annu Rev Neurosci.* 2000, 23, 649-711.
337. Martinez A., Vitorica J., Satrustegui J.: Cytosolic free calcium levels increase with age in rat brain synaptosomes. *Neurosci Lett.* 1988, 88, 3, 336-342.
338. Martinez M.: Adaptation in patterns of c-fos expression in the brain associated with exposure to either single or repeated social stress in male rats. *Eur J Neurosci.* 1998, 10, 1, 20-33.
339. Mascagni F., McDonald A.J.: Immunohistochemical characterization of cholecystokinin containing neurons in the rat basolateral amygdala. *Brain Res.* 2003, 976, 2, 171-184.
340. Mason J.W.: A review of psychoendocrine research on the pituitary-adrenal cortical system. *Psychosom Med.* 1968, 30, 5, SUPPL: 576-607.
341. Mason J.W.: A review of psychoendocrine research on the sympathetic-adrenal medullary system. *Psychosom Med.* 1968, 30, 5, SUPPL: 631-653.
342. Masood A., Banerjee B., Vijayan V.K., Ray A.: Modulation of stress-induced neurobehavioral changes by nitric oxide in rats. *Eur J Pharmacol.* 2003, 458, 1-2, 135-139.
343. Matsumoto T., Nakane M., Pollock J.S., Kuk J.E., Forstermann U.: A correlation between soluble brain nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase activity is only seen after exposure of the tissue to fixative. *Neurosci Lett.* 1993, 155, 1, 61-64.
344. McBain C.J., Fisahn A.: Interneurons unbound. *Nat Rev Neurosci.* 2001, 2, 1, 11-23.
345. McCormick C.M., Mathews I.Z., Thomas C., Waters P.: Investigations of HPA function and the enduring consequences of stressors in adolescence in animal models. *Brain Cogn.* 2010, 72, 1, 73-85.
346. McDonald A.J.: Cell types and intrinsic connections of the amygdala. W: J.P. Aggleton (red.): *The Amygdala: Neurobiological aspects of emotion, memory and mental dysfunction.* New York: Wiley-Liss, 1992, s. 67-96.

347. McDonald A.J.: Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Prog Neurobiol.* 1998, 55, 3, 257-332.
348. McDonald A.J.: Calbindin-D28k immunoreactivity in the rat amygdala. *J Comp Neurol.* 1997, 383, 2, 231-244.
349. McDonald A.J.: Glutamate and aspartate immunoreactive neurons of the rat basolateral amygdala: Colocalization of excitatory amino acids and projections to the limbic circuit. *J Comp Neurol.* 1996, 365, 3, 367-379.
350. McDonald A.J.: Calretinin immunoreactive neurons in the basolateral amygdala of the rat and monkey. *Brain Res.* 1994, 667, 2, 238-242.
351. McDonald A.J.: Topographical organization of amygdaloid projections to the caudatoputamen, nucleus accumbens, and related striatal-like areas of the rat brain. *Neuroscience.* 1991, 44, 1, 15-33.
352. McDonald A.J.: Coexistence of somatostatin with neuropeptide Y, but not with cholecystikinin or vasoactive intestinal peptide, in neurons of the rat amygdala. *Brain Res.* 1989, 500, 1-2, 37-45.
353. McDonald A.J.: Immunohistochemical identification of γ -aminobutyric acid-containing neurons in the rat basolateral amygdala. *Neurosci Lett.* 1985, 53, 2, 203-207.
354. McDonald A.J.: Morphology of peptide-containing neurons in the rat basolateral amygdaloid nucleus. *Brain Res.* 1985, 338, 1, 186-191.
355. McDonald A.J.: Neuronal organization of the lateral and basolateral amygdaloid nuclei in the rat. *J Comp Neurol.* 1984, 222, 4, 589-606.
356. McDonald A.J.: Neurons of the lateral and basolateral amygdaloid nuclei: A Golgi study in the rat. *J Comp Neurol.* 1982, 212, 3, 293-312.
357. McDonald A.J., Augustine J.R.: Localization of GABA-like immunoreactivity in the monkey amygdala. *Neuroscience.* 1993, 52, 2, 281-294.
358. McDonald A.J., Baimbridge K.G.: Calcium binding protein containing neurons of the basolateral amygdala also exhibit GABA and cytochrome oxidase immunoreactivity. *Abstr Soc Neurosci.* 1990, 16, 431.
359. McDonald A.J., Betette R.L.: Parvalbumin-containing neurons in the rat basolateral amygdala: Morphology and co-localization of Calbindin-D28k. *Neuroscience.* 2001, 102, 2, 413-425.
360. McDonald A.J., Jackson T.R.: Amygdaloid connections with posterior insular and temporal cortical areas in the rat. *J Comp Neurol.* 1987, 262, 1, 59-77.
361. McDonald A.J., Mascagni F.: Immunohistochemical characterization of somatostatin containing interneurons in the rat basolateral amygdala. *Brain Res.* 2002, 943, 2, 237-244.
362. McDonald A.J., Mascagni F.: Colocalization of calcium-binding proteins and GABA in neurons of the rat basolateral amygdala. *Neuroscience.* 2001, 105, 3, 681-693.
363. McDonald A.J., Mascagni F.: Projections of the lateral entorhinal cortex to the amygdala: A Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study in the rat. *Neuroscience.* 1997, 77, 2, 445-459.

-
364. McDonald A.J., Mascagni F., Guo L.: Projections of the medial and lateral pre-frontal cortices to the amygdala: A Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study in the rat. *Neuroscience*. 1996, 71, 1, 55-75.
365. McDonald A.J., Payne D.R., Mascagni F.: Identification of putative nitric oxide producing neurons in the rat amygdala using NADPH-diaphorase histochemistry. *Neuroscience*. 1993, 52, 1, 97-106.
366. McEwen B.S.: Stress and hippocampal plasticity. *Annu Rev Neurosci*. 1999, 22, 105-122.
367. McEwen B.S.: Protective and damaging effects of stress mediators. *N Engl J Med*. 1998, 38, 670-678.
368. McEwen B.S., Stellar E.: Stress and the individual: Mechanisms leading to disease. *Arch Intern Med*. 1993, 153, 18, 2093-2101.
369. McGaugh J.L., Ferry B., Vazdarjanova A., Roozendaal B.: Amygdala: role in modulation of memory storage. W: J.P. Aggleton (red.): *The Amygdala: A functional analysis*. New York: Oxford University Press, 2000, s. 391-424.
370. McGaugh J.L., Introini-Collison I.B., Cahill L.F., Castellano C., Dalmaz C., Parent M.B., Williams C.L.: Neuromodulatory systems and memory storage: Role of the amygdala. *Behav Brain Res*. 1993, 58, 1-2, 81-90.
371. Meaney M.J., Diorio J., Francis D., Widdowson J., LaPlante P., Caldji C., Sharma S., Seckl J.R., Plotsky P.M.: Early environmental regulation of forebrain glucocorticoid receptor gene expression: Implications for adrenocortical responses to stress. *Dev Neurosci*. 1996, 18, 1-2, 49-72.
372. Medina L., Legaz I., González G., De Castro F., Rubenstein J.L.R., Puelles L.: Expression of Dbx1, Neurogenin 2, Semaphorin 5A, Cadherin 8, and Emx1 distinguish ventral and lateral pallial histogenetic divisions in the developing mouse claustroramygdaloid complex. *J Comp Neurol*. 2004, 474, 4, 504-523.
373. Meisler L., Sachs D.: The physiology of male sexual behavior. W: E. Knobil (red.): *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press, 1994, s. 3-106.
374. Menéndez L., Insua D., Rois J.L., Santamarina G., Suárez M.L., Pesini P.: The immunohistochemical localization of neuronal nitric oxide synthase in the basal forebrain of the dog. *J Chem Neuroanat*. 2006, 31, 3, 200-209.
375. Mercier S., Canini F., Buguet A., Cespuglio R., Martin S., Bourdon L.: Behavioural changes after an acute stress: Stressor and test types influences. *Behav Brain Res*. 2003, 139, 1-2, 167-175.
376. Meskenaite V.: Calretinin-immunoreactive local circuit neurons in area 17 of the cynomolgus monkey, *Macaca fascicularis*. *J Comp Neurol*. 1997, 379, 1, 113-132.
377. Meyza K.Z., Boguszewski P.M., Nikolaev E., Zagrodzka J.: Diverse sensitivity of RHA/Verh and RLA/Verh rats to emotional and spatial aspects of a novel environment as a result of a distinct pattern of neuronal activation in the fear/anxiety circuit. *Behav Genet*. 2009, 39, 1, 48-61.
378. Meyza K.Z., Boguszewski P.M., Nikolaev E., Zagrodzka J.: The effect of age on the dynamics and the level of c-Fos activation in response to acute restraint in Lewis rats. *Behav Brain Res*. 2007, 180, 2, 183-189.

-
379. Micevych P., Akesson T., Elde R.: Distribution of cholecystokinin-immunoreactive cell bodies in the male and female rat: II. Bed nucleus of the stria terminalis and amygdala. *J Comp Neurol.* 1988, 269, 3, 381-391.
380. Miettinen R., Gulyas A.I., Baimbridge K.G., Jacobowitz D.M., Freund T.F.: Calretinin is present in non-pyramidal cells of the rat hippocampus - II. Co-existence with other calcium binding proteins and GABA. *Neuroscience.* 1992, 48, 1, 29-43.
381. Miles R., Tóth K., Gulyás A.I., Hájos N., Freund T.F.: Differences between somatic and dendritic inhibition in the hippocampus. *Neuron.* 1996, 16, 4, 815-823.
382. Miller R.J.: Regulation of calcium homeostasis in neurons: The role of calcium-binding proteins. *Biochem Soc Trans.* 1995, 23, 3, 629-632.
383. Millhouse O.E., DeOlmos J.: Neuronal configurations in lateral and basolateral amygdala. *Neuroscience.* 1983, 10, 4, 1269-1300.
384. Milner L.C., Crabbe J.C.: Three murine anxiety models: Results from multiple inbred strain comparisons. *Genes Brain Behav.* 2008, 7, 4, 496-505.
385. 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, 4, 442-460.
386. Minciacchi D., Granato A.: Development of the thalamocortical system: Transient-crossed projections to the frontal cortex in neonatal rats. *J Comp Neurol.* 1989, 281, 1, 1-12.
387. 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, 313-332.
388. Moga M.M., Herbert H., Hurley K.M., Yasui Y., Gray T.S., Saper C.B.: Organization of cortical, basal forebrain, and hypothalamic afferents to the parabrachial nucleus in the rat. *J Comp Neurol.* 1990, 295, 4, 624-661.
389. 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, 6, 511-519.
390. Morys J., Berdel B., Kowiański P., Majak K., Tarnawski M., Wisniewski H.M.: Relationship of calcium-binding protein containing neurons and projection neurons in the rat basolateral amygdala. *Neurosci Lett.* 1999, 259, 2, 91-94.
391. Müller A., Kukley M., Stausberg P., Beck H., Müller W., Dietrich D.: Endogenous Ca^{2+} buffer concentration and Ca^{2+} microdomains in hippocampal neurons. *J Neurosci.* 2005, 25, 3, 558-565.
392. Muller J.F., Mascagni F., McDonald A.J.: Postsynaptic targets of somatostatin-containing interneurons in the rat basolateral amygdala. *J Comp Neurol.* 2007, 500, 3, 513-529.
393. Muller J.F., Mascagni F., McDonald A.J.: Pyramidal cells of the rat basolateral amygdala: Synaptology and innervation by parvalbumin-immunoreactive interneurons. *J Comp Neurol.* 2006, 494, 4, 635-650.

-
394. Muller J.F., Mascagni F., McDonald A.J.: Coupled networks of parvalbumin-immunoreactive interneurons in the rat basolateral amygdala. *J Neurosci.* 2005, 25, 32, 7366-7376.
395. Muller J.F., Mascagni F., McDonald A.J.: Synaptic connections of distinct interneuronal subpopulations in the rat basolateral amygdalar nucleus. *J Comp Neurol.* 2003, 456, 3, 217-236.
396. Munck A., Guyre P.M., Holbrook N.J.: Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocr Rev.* 1984, 5, 1, 25-44.
397. Muramoto K., Ono T., Nishijo H., Fukuda M.: Rat amygdaloid neuron responses during auditory discrimination. *Neuroscience.* 1993, 52, 3, 621-636.
398. Nacher J., Lanuza E., McEwen B.S.: Distribution of PSA-NCAM expression in the amygdala of the adult rat. *Neuroscience.* 2002, 113, 3, 479-484.
399. Nader K., Majidishad P., Amorapanth P., LeDoux J.E.: Damage to the lateral and central, but not other, amygdaloid nuclei prevents the acquisition of auditory fear conditioning. *Learn Mem.* 2001, 8, 3, 156-163.
400. Nagahara A.H., Handa R.J.: Age-related changes in c-fos mRNA induction after open-field exposure in the rat brain. *Neurobiol Aging.* 1997, 18, 1, 45-55.
401. Nakashima M., Uemura M., Yasui K., Ozaki H.S., Tabata S., Taen A.: An anterograde and retrograde tract-tracing study on the projections from the thalamic gustatory area in the rat: Distribution of neurons projecting to the insular cortex and amygdaloid complex. *Neurosci Res.* 2000, 36, 4, 297-309.
402. Nelson R.J., Kriegsfeld L.J., Dawson V.L., Dawson T.M.: Effects of nitric oxide on neuroendocrine function and behavior. *Front Neuroendocrinol.* 1997, 18, 4, 463-491.
403. Newcomb J.M., Watson III W.H.: Identifiable nitrergic neurons in the central nervous system of the nudibranch *Melibe leonina* localized with NADPH-diaphorase histochemistry and nitric oxide synthase immunoreactivity. *J Comp Neurol.* 2001, 437, 1, 70-78.
404. Nishijo H., Ono T., Nishino H.: Single neuron responses in amygdala of alert monkey during complex sensory stimulation with affective significance. *J Neurosci.* 1988, 8, 10, 3570-3583.
405. Nishijo H., Uwano T., Tamura R., Ono T.: Gustatory and multimodal neuronal responses in the amygdala during licking and discrimination of sensory stimuli in awake rats. *J Neurophysiol.* 1998, 79, 1, 21-36.
406. Nitecka L., Frotscher M.: Organization and synaptic interconnections of GABAergic and cholinergic elements in the rat amygdaloid nuclei: Single- and double-immunolabeling studies. *J Comp Neurol.* 1989, 279, 3, 470-488.
407. 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, 2, 147-150.
408. Ogilvie P., Schilling K., Billingsley M.L., Schmidt H.H.H.W.: Induction and variants of neuronal nitric oxide synthase type I during synaptogenesis. *FASEB J.* 1995, 9, 9, 799-806.

-
409. Okere C.O., Kaba H., Higuchi T.: Importance of endogenous nitric oxide synthase in the rat hypothalamus and amygdala in mediating the response to capsaicin. *J Comp Neurol.* 2000, 423, 4, 670-686.
410. 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, 6, 813-822.
411. Olmos J.L., Real M.Á., Medina L., Guirado S., Dávila J.C.: Distribution of nitric oxide-producing neurons in the developing and adult mouse amygdalar basolateral complex. *Brain Res Bull.* 2005, 66, 4-6, 465-469.
412. Ossenkopp K., Sorenson L., Mazmanian D.S.: Factor analysis of open-field behavior in the rat (*Rattus norvegicus*): Application of the three-way PARAFAC model to a longitudinal data set. *Behav Processes.* 1994, 31, 2-3, 129-144.
413. Ota M., Crofton J.T., Festavan G.T., Share L.: Evidence that nitric oxide can act centrally to stimulate vasopressin release. *Neuroendocrinology.* 1993, 57, 5, 955-959.
414. Ottersen O.P.: Connections of the amygdala of the rat. IV: Corticoamygdaloid and intraamygdaloid connections as studied with axonal transport of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol.* 1982, 205, 1, 30-48.
415. Ottersen O.P.: Afferent connections to the amygdaloid complex of the rat and cat. II. Afferents from the hypothalamus and the basal telencephalon. *J Comp Neurol.* 1980, 194, 1, 267-289.
416. Pacák K., Palkovits M.: Stressor specificity of central neuroendocrine responses: Implications for stress-related disorders. *Endocr Rev.* 2001, 22, 4, 502-548.
417. Packard M.G., Cahill L.: Affective modulation of multiple memory systems. *Curr Opin Neurobiol.* 2001, 11, 6, 752-756.
418. Palczewska M., Groves P., Ambrus A., Kaleta A., Kövér 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, 23, 6229-6237.
419. Pang Y., Kiba H., Jayaraman A.: Acute nicotine injections induce c-fos mostly in non-dopaminergic neurons of the midbrain of the rat. *Brain Res Mol Brain Res.* 1993, 20, 1-2, 162-170.
420. Pantazopoulos H., Lange N., Hassinger L., Berretta S.: Subpopulations of neurons expressing parvalbumin in the human amygdala. *J Comp Neurol.* 2006, 496, 5, 706-722.
421. Pardon M.: Stress and ageing interactions: A paradox in the context of shared etiological and physiopathological processes. *Brain Res Rev.* 2007, 54, 2, 251-273.
422. Pare D., Smith Y.: Distribution of GABA immunoreactivity in the amygdaloid complex of the cat. *Neuroscience.* 1993, 57, 4, 1061-1076.
423. Paton J.J., Belova M.A., Morrison S.E., Salzman C.D.: The primate amygdala represents the positive and negative value of visual stimuli during learning. *Nature.* 2006, 439, 7078, 865-870.
424. Paxinos G., Ashwell K.W.S., Tork I.: Atlas of the developing rat nervous system. San Diego: Academic Press, 1994. ISBN 9780125476102.

-
425. Paxinos G., Watson C.: The rat brain in stereotaxic coordinates. Acad. Press: San Diego, 1997. ISBN 0125476213.
 426. Pedersen W.A., Wan R., Mattson M.P.: Impact of aging on stress-responsive neuroendocrine systems. *Mech Ageing Dev.* 2001, 122, 9, 963-983.
 427. Pérez-Cerdá F., Martínez-Millán 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, 3, 422-432.
 428. Petrovich G.D., Canteras N.S., Swanson L.W.: Combinatorial amygdalar inputs to hippocampal domains and hypothalamic behavior systems. *Brain Res Rev.* 2001, 38, 1-2, 247-289.
 429. Petrovich G.D., Swanson L.W.: Projections from the lateral part of the central amygdalar nucleus to the postulated fear conditioning circuit. *Brain Res.* 1997, 763, 2, 247-254.
 430. 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, 22, 8809-8818.
 431. Pfau J.G., Heeb M.M.: Implications of immediate-early gene induction in the brain following sexual stimulation of female and male rodents. *Brain Res Bull.* 1997, 44, 4, 397-407.
 432. Phung Y.T., Bekker J.M., Hallmark O.G., Black S.M.: Both neuronal NO synthase and nitric oxide are required for PC12 cell differentiation: A cGMP independent pathway. *Brain Res Mol Brain Res.* 1999, 64, 2, 165-178.
 433. Pickel V.M., Van Bockstaele E.J., Chan J., Cestari D.M.: GABAergic neurons in rat nuclei of solitary tracts receive inhibitory-type synapses from amygdaloid efferents lacking detectable GABA-immunoreactivity. *J Neurosci Res.* 1996, 44, 5, 446-458.
 434. Pickel V.M., Van Bockstaele E.J., Chan J., Cestari D.M.: Amygdala efferents form inhibitory-type synapses with a subpopulation of catecholaminergic neurons in the rat nucleus tractus solitarius. *J Comp Neurol.* 1995, 362, 4, 510-523.
 435. Pitkanen A.: Connectivity of the rat amygdaloid complex. W: J.P. Aggleton (red.): *The Amygdala*. Oxford: Oxford University Press, 2000, s. 31-115.
 436. Pitkanen A., Amaral D.G.: The distribution of GABAergic cells, fibers, and terminals in the monkey amygdaloid complex: An immunohistochemical and in situ hybridization study. *J Neurosci.* 1994, 14, 4, 2200-2224.
 437. Pitkanen A., Amaral D.G.: Distribution of calbindin-D(28k) immunoreactivity in the monkey temporal lobe: The amygdaloid complex. *J Comp Neurol.* 1993, 331, 2, 199-224.
 438. Pitkanen A., Amaral D.G.: Distribution of parvalbumin-immunoreactive cells and fibers in the monkey temporal lobe: The amygdaloid complex. *J Comp Neurol.* 1993, 331, 1, 14-36.
 439. Pitkanen A., Amaral D.G.: Distribution of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase (NADPH-d) cells and fibers in the monkey amygdaloid complex. *J Comp Neurol.* 1991, 313, 2, 326-348.

-
440. Pitkänen A., Jolkkonen E., Kempainen S.: Anatomic heterogeneity of the rat amygdaloid complex. *Folia Morphol.* 2000, 59, 1, 1-23.
 441. Pitkänen A., Kempainen S.: Comparison of the distribution of calcium-binding proteins and intrinsic connectivity in the lateral nucleus of the rat, monkey, and human amygdala. *Pharmacol Biochem Behav.* 2002, 71, 3, 369-377.
 442. Pitkänen A., Pikkarainen M., Nurminen N., Ylinen A.: Reciprocal connections between the amygdala and the hippocampal formation, perirhinal cortex, and postrhinal cortex in rat. *Ann NY Acad Sci.* 2000, 911, 369-391.
 443. Pitkänen A., Savander V., LeDoux J.E.: Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: An emerging framework for understanding functions of the amygdala. *Trends Neurosci.* 1997, 20, 11, 517-523.
 444. Pitkänen A., Stefanacci L., Farb C.R., Go G., LeDoux J.E., Amaral D.G.: Intrinsic connections of the rat amygdaloid complex: Projections originating in the lateral nucleus. *J Comp Neurol.* 1995, 356, 2, 288-310.
 445. Pitkänen A., Tuunanen J., Kalviainen R., Partanen K., Salmenpera T.: Amygdala damage in experimental and human temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 1998, 32, 1-2, 233-253.
 446. Porter J.P.: Contribution of spinal N-methyl-D-aspartic acid receptors to control of sympathetic outflow by the paraventricular nucleus. *Brain Res Bull.* 1993, 32, 6, 653-660.
 447. Porter L.L., Rizzo E., Hornung J.: Dopamine affects parvalbumin expression during cortical development in vitro. *J Neurosci.* 1999, 19, 20, 8990-9003.
 448. Pouille F., Scanziani M.: Routing of spike series by dynamic circuits in the hippocampus. *Nature.* 2004, 429, 6993, 717-723.
 449. Prast H., Philippu A.: Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Prog Neurobiol.* 2001, 64, 1, 51-68.
 450. Prast H., Philippu A.: Nitric oxide releases acetylcholine in the basal forebrain. *Eur J Pharmacol.* 1992, 216, 1, 139-140.
 451. Prewitt C.M.F., Herman J.P.: Anatomical interactions between the central amygdaloid nucleus and the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat: A dual tract-tracing analysis. *J Chem Neuroanat.* 1998, 15, 3, 173-185.
 452. Price J.L., Russchen F.T., Amaral D.G.: The limbic region. II: the amygdaloid complex. W: A. Björklund (red.): *Handbook of Chemical Neuroanatomy. Vol. 5, Integrated Systems of the CNS.* 1987, 279-388.
 453. Prut L., Belzung C.: The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: A review. *Eur J Pharmacol.* 2003, 463, 1-3, 3-33.
 454. Pryce C.R., Bettschen D., Feldon J.: Comparison of the effects of early handling and early deprivation on maternal care in the rat. *Dev Psychobiol.* 2001, 38, 4, 239-251.

-
455. Pryce C.R., Feldon J.: Long-term neurobehavioural impact of the postnatal environment in rats: Manipulations, effects and mediating mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev.* 2003, 27, 1-2, 57-71.
456. Puellas L., Kuwana E., Puellas E., Bulfone A., Shimamura K., Keleher J., Smiga S., Rubenstein J.L.R.: Pallial and subpallial derivatives in the embryonic chick and mouse telencephalon, traced by the expression of the genes *Dlx-2*, *Emx-1*, *Nkx-2.1*, *Pax-6*, and *Tbr-1*. *J Comp Neurol.* 2000, 424, 3, 409-438.
457. 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, 4, 374-391.
458. Quock R.M., Nguyen E.: Possible involvement of nitric oxide in chlordiazepoxide-induced anxiolysis in mice. *Life Sci.* 1992, 51, 25, 255-260.
459. Raber J., Koob G.F., Bloom F.E.: Interleukin-2 (IL-2) induces corticotropin-releasing factor (CRF) release from the amygdala and involves a nitric oxide-mediated signaling; Comparison with the hypothalamic response. *J Pharmacol Exp Ther.* 1995, 272, 2, 815-824.
460. Rachman I.M., Pfaff D.W., Cohen R.S.: NADPH diaphorase activity and nitric oxide synthase immunoreactivity in lordosis-relevant neurons of the ventromedial hypothalamus. *Brain Res.* 1996, 740, 1-2, 291-306.
461. Radulovic J., Kammermeier J., Spiess J.: Relationship between FOS production and classical fear conditioning: Effects of novelty, latent inhibition, and unconditioned stimulus preexposure. *J Neurosci.* 1998, 18, 18, 7452-7461.
462. Rainnie D.G., Asprodini E.K., Shinnick-Gallagher P.: Excitatory transmission in the basolateral amygdala. *J Neurophysiol.* 1991, 66, 3, 986-998.
463. Rainnie D.G., Mania I., Mascagni F., McDonald A.J.: Physiological and morphological characterization of parvalbumin-containing interneurons of the rat basolateral amygdala. *J Comp Neurol.* 2006, 498, 1, 142-161.
464. Rajakumar N., Rushlow W., Naus C.C.G., Elisevich K., Flumerfelt B.A.: Neurochemical compartmentalization of the globus pallidus in the rat: An immunocytochemical study of calcium-binding proteins. *J Comp Neurol.* 1994, 346, 3, 337-348.
465. Ramos A., Mormède P.: Stress and emotionality: A multidimensional and genetic approach. *Neurosci Biobehav Rev.* 1997, 22, 1, 33-57.
466. Ray J.P., Price J.L.: The organization of the thalamocortical connections of the mediodorsal thalamic nucleus in the rat, related to the ventral forebrain-prefrontal cortex topography. *J Comp Neurol.* 1992, 323, 2, 167-197.
467. 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, 1, 165-167.
468. Reznikov L.R., Reagan L.P., Fadel J.R.: Activation of phenotypically distinct neuronal subpopulations in the anterior subdivision of the rat basolateral amygdala following acute and repeated stress. *J Comp Neurol.* 2008, 508, 3, 458-472.
469. Richardson Morton K.D., Van de Kar L.D., Brownfield M.S., Bethea C.L.: Neuronal cell bodies in the hypothalamic paraventricular nucleus mediate stress-

- induced renin and corticosterone secretion. *Neuroendocrinology*. 1989, 50, 1, 73-80.
470. Rinaman L.: Postnatal development of catecholamine inputs to the paraventricular nucleus of the hypothalamus in rats. *J Comp Neurol*. 2001, 438, 4, 411-422.
471. Risold P.Y., Canteras N.S., Swanson L.W.: Organization of projections from the anterior hypothalamic nucleus: A Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study in the rat. *J Comp Neurol*. 1994, 348, 1, 1-40.
472. Rivier C.: Role of nitric oxide and carbon monoxide in modulating the activity of the rodent hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Front Horm Res*. 2002, 29, 15-49.
473. Rivier C.: Role of gaseous neurotransmitters in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Ann NY Acad Sci*. 2001, 933, 254-264.
474. Rizvi T.A., Ennis M., Behbehani M., Shipley M.T.: Connections between the central nucleus of the amygdala and the midbrain periaqueductal gray: Topography and reciprocity. *J Comp Neurol*. 1991, 303, 1, 121-131.
475. Roberts G.W., Woodhams P.L., Polak J.M., Crow T.J.: Distribution of neuropeptides in the limbic system of the rat: The amygdaloid complex. *Neuroscience*. 1982, 7, 1, 99-131.
476. Rodríguez C., Guillaumon A., Pinos H., Collado P.: Postpartum changes in the GABAergic system in the bed nucleus of the accessory olfactory tract. *Neurochem Int*. 2004, 44, 3, 179-183.
477. Roesler R., Vianna M.R.M., De-Paris F., Rodrigues C., Sant'Anna M.K., Quevedo J., Ferreira M.B.C.: NMDA receptor antagonism in the basolateral amygdala blocks enhancement of inhibitory avoidance learning in previously trained rats. *Behav Brain Res*. 2000, 112, 1-2, 99-105.
478. Rollins B.L., Stines S.G., McGuire H.B., King B.M.: Effects of amygdala lesions on body weight, conditioned taste aversion, and neophobia. *Physiol Behav*. 2001, 72, 5, 735-742.
479. Romeo R.D., Lee S.J., Chhua N., McPherson C.R., McEwen B.S.: Testosterone cannot activate an adult-like stress response in prepubertal male rats. *Neuroendocrinology*. 2004, 79, 3, 125-132.
480. Romeo R.D., Richardson H.N., Sisk C.L.: Puberty and the maturation of the male brain and sexual behavior: Recasting a behavioral potential. *Neurosci Biobehav Rev*. 2002, 26, 3, 381-391.
481. Roozendaal B., Koolhaas J.M., Bohus B.: Attenuated cardiovascular, neuroendocrine, and behavioral responses after a single footshock in central amygdaloid lesioned male rats. *Physiol Behav*. 1991, 50, 4, 771-775.
482. Rosas H.D., Koroshetz W.J., Chen Y.I., Skeuse C., Vangel M., Cudkovicz M.E., Caplan K., Marek K., Seidman L.J., Makris N., Jenkins B.G., Goldstein J.M.: Evidence for more widespread cerebral pathology in early HD: An MRI-based morphometric analysis. *Neurology*. 2003, 60, 10, 1615-1620.
483. Rosen J.B.: The neurobiology of conditioned and unconditioned fear: a neurobehavioral system analysis of the amygdala. *Behav Cogn Neurosci Rev*. 2004, 3, 1, 23-41.

-
484. Rosen J.B., Fanselow M.S., Young S.L., Sitcoske M., Maren S.: Immediate-early gene expression in the amygdala following footshock stress and contextual fear conditioning. *Brain Res.* 1998, 796, 1-2, 132-142.
 485. Rosen J.B., Schulkin J.: From Normal Fear to Pathological Anxiety. *Psychol Rev.* 1998, 105, 2, 325-350.
 486. Rosenfeld P., Wetmore J.B., Levine S.: Effects of repeated maternal separations on the adrenocortical response to stress of preweanling rats. *Physiol Behav.* 1992, 52, 4, 787-791.
 487. Roskams A.J., Bredt D.S., Dawson T.M., Ronnett G.V.: Nitric oxide mediates the formation of synaptic connections in developing and regenerating olfactory receptor neurons. *Neuron.* 1994, 13, 2, 289-299.
 488. Sadikot A.F., Burhan A.M., Bélanger M., Sasseville R.: NMDA receptor antagonists influence early development of GABAergic interneurons in the mammalian striatum. *Dev Brain Res.* 1998, 105, 1, 35-42.
 489. Sah P., Faber E.S.L., De Armentia M.L., Power J.: The amygdaloid complex: Anatomy and physiology. *Physiol Rev.* 2003, 83, 3, 803-834.
 490. Saha S., Batten T.F.C., Henderson Z.: A GABAergic projection from the central nucleus of the amygdala to the nucleus of the solitary tract: A combined anterograde tracing and electron microscopic immunohistochemical study. *Neuroscience.* 2000, 99, 4, 613-626.
 491. Sakanaka M., Shibasaki T., Lederis K.: Distribution and efferent projections of corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in the rat amygdaloid complex. *Brain Res.* 1986, 382, 2, 213-238.
 492. Salchner P., Lubec G., Singewald N.: Decreased social interaction in aged rats may not reflect changes in anxiety-related behaviour. *Behav Brain Res.* 2004, 151, 1-2, 1-8.
 493. Samama B., Chateau D., Boehm N.: Expression of NADPH-diaphorase in the rat forebrain during development. *Neurosci Lett.* 1995, 184, 3, 204-207.
 494. Sánchez M.M., Ladd C.O., Plotsky P.M.: Early adverse experience as a developmental risk factor for later psychopathology: Evidence from rodent and primate models. *Dev Psychopathol.* 2001, 13, 3, 419-449.
 495. Santacana M., Uttenthal L.O., Bentura M.L., Fernández A.P., Serrano J., Martínez De Velasco J., Alonso D., Martínez-Murillo R., Rodrigo J.: Expression of neuronal nitric oxide synthase during embryonic development of the rat cerebral cortex. *Dev Brain Res.* 1998, 111, 2, 205-222.
 496. Saper C.B., Loewy A.D., Swanson L.W., Cowan W.M.: Direct hypothalamo autonomic connections. *Brain Res.* 1976, 117, 2, 305-312.
 497. Sapolsky R.M., Krey L.C., McEwen B.S.: The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis. *Endocr Rev.* 1986, 7, 3, 284-301.
 498. Sapolsky R.M., Meaney M.J.: Maturation of the adrenocortical stress response: neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period. *Brain Res.* 1986, 396, 1, 64-76.

-
499. Sapolsky R.M., Romero L.M., Munck A.U.: How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev.* 2000, 21, 1, 55-89.
 500. Satoh K., Arai R., Ikemoto K., Narita M., Nagai T., Ohshima H., Kitahama K.: Distribution of nitric oxide synthase in the central nervous system of *Macaca fuscata*: Subcortical regions. *Neuroscience.* 1995, 66, 3, 685-696.
 501. Savonenko A., Filipkowski R.K., Werka T., Zielinski K., Kaczmarek L.: Defensive conditioning-related functional heterogeneity among nuclei of the rat amygdala revealed by c-Fos mapping. *Neuroscience.* 1999, 94, 3, 723-733.
 502. Savonenko A., Werka T., Nikolaev E., Zieliński K., Kaczmarek L.: Complex effects of NMDA receptor antagonist APV in the basolateral amygdala on acquisition of two-way avoidance reaction and long-term fear memory. *Learn Mem.* 2003, 10, 4, 293-303.
 503. Sawchenko P.E., Brown E.R., Chan R.K.W., Ericsson A., Li H., Roland B.L., Kovacs K.J.: The paraventricular nucleus of the hypothalamus and the functional neuroanatomy of visceromotor responses to stress. *Prog Brain Res.* 1996, 107, 201-222.
 504. Sawchenko P.E., Li H., Ericsson A.: Circuits and mechanisms governing hypothalamic responses to stress: A tale of two paradigms. *Prog Brain Res.* 2000, 122, 61-78.
 505. Sawchenko P.E., Swanson L.W.: The organization of forebrain afferents to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *J Comp Neurol.* 1993, 219, 121-144.
 506. Sawchenko P.E., Swanson L.W.: Immunohistochemical identification of neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus that project to the medulla or to the spinal cord in the rat. *J Comp Neurol.* 1982, 205, 3, 260-272.
 507. Sawchenko P.E., Swanson L.W.: The organization of noradrenergic pathways from the brainstem to the paraventricular and supraoptic nuclei in the rat. *Brain Res Rev.* 1982, 4, 3, 275-325.
 508. Scalia F., Winans S.S.: The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals. *J Comp Neurol.* 1975, 161, 1, 31-55.
 509. Schafe G.E., Nader K., Blair H.T., LeDoux J.E.: Memory consolidation of Pavlovian fear conditioning: A cellular and molecular perspective. *Trends Neurosci.* 2001, 24, 9, 540-546.
 510. Schierle G.S., Gander J., D'Orlando C., Celio M.R., Vogt Weisenhorn D.M.: Calretinin-immunoreactivity during postnatal development of the rat isocortex: A qualitative and quantitative study. *Cereb Cortex.* 1997, 7, 2, 130-142.
 511. Schiffmann S.N., Cheron G., Lohof A., D'Alcantara P., Meyer M., Parmentier M., Schurmans S.: Impaired motor coordination and Purkinje cell excitability in mice lacking calretinin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999, 96, 9, 5257-5262.
 512. Schlösser B., Klaus G., Prime G., Bruggencate G.T.: Postnatal development of calretinin- and parvalbumin-positive interneurons in the rat neostriatum: An immunohistochemical study. *J Comp Neurol.* 1999, 405, 2, 185-198.

-
513. Schmidt H.H.H.W., Gagne G.D., Nakane M., Pollock J.S., Miller M.F., Murad F.: Mapping of neural nitric oxide synthase in the rat suggests frequent co-localization with NADPH diaphorase but not with soluble guanylyl cyclase, and novel paraneural functions for nitrinergic signal transduction. *J Histochem Cytochem.* 1992, 40, 10, 1439-1456.
514. Schmidt M., Enthoven L., Van Der Mark M., Levine S., De Kloet E.R., Oitzl M.S.: The postnatal development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the mouse. *Int J Dev Neurosci.* 2003, 21, 3, 125-132.
515. Schmidt M.L., Huang R., Martin J.A., Henley J., Mawal-Dewan M., Hurtig H.I., Lee V.M., Trojanowski J.Q.: Neurofibrillary tangles in progressive supranuclear palsy contain the same tau epitopes identified in Alzheimer's disease PHFtau. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1996, 55, 5, 534-539.
516. Schmoll H., Badan I., Fischer B., Wagner A.P.: Dynamics of gene expression for immediate early- and late genes after seizure activity in aged rats. *Arch Gerontol Geriatr.* 2001, 32, 3, 199-218.
517. Schoenfeld N.M., Leatham J.H., Rabii J.: Maturation of adrenal stress responsiveness in the rat. *Neuroendocrinology.* 1980, 31, 2, 101-105.
518. 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, 3, 208-226.
519. Schuman E.M., Madison D.V.: Nitric oxide and synaptic function. *Annu Rev Neurosci.* 1994, 17, 153-183.
520. Schuman E.M., Meffert M.K., Schulman H., Madison D.V.: An ADP-ribosyltransferase as a potential target for nitric oxide action in hippocampal long-term potentiation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994, 91, 25, 11958-11962.
521. Schurmans S., Schiffmann S.N., Gurden H., Lemaire M., Lipp H.-., Schwam V., Pochet R., Imperato A., Böhme G.A., Parmentier M.: Impaired long-term potentiation induction in dentate gyrus of calretinin-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997, 94, 19, 10415-10420.
522. Schwaller B., Meyer M., Schiffmann S.: 'New' functions for 'old' proteins: The role of the calcium-binding proteins calbindin D-28k, calretinin and parvalbumin, in cerebellar physiology. Studies with knockout mice. *Cerebellum.* 2002, 1, 4, 241-258.
523. Seggie J.: Differential responsivity of corticosterone and prolactin to stress following lesions of the septum or amygdala: Implications for psychoneuroendocrinology. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 1987, 11, 2-3, 315-324.
524. Segovia G., Mora F.: Role of nitric oxide in modulating the release of dopamine, glutamate, and GABA in striatum of the freely moving rat. *Brain Res Bull.* 1998, 45, 3, 275-279.
525. Segovia S., Guillaumon A.: Sexual dimorphism in the vomeronasal pathway and sex differences in reproductive behaviors. *Brain Res Rev.* 1993, 18, 1, 51-74.
526. Seo D.O., Rivier C.: Microinfusion of a nitric oxide donor in discrete brain regions activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Neuroendocrinol.* 2001, 13, 11, 925-933.

-
527. Sesack S.R., Deutch A.Y., Roth R.H., Bunney B.S.: Topographical organization of the efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: An anterograde tract-tracing study with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *J Comp Neurol.* 1989, 290, 2, 213-242.
528. Setzer M., Ulfing N.: Differential expression of calbindin and calretinin in the human fetal amygdala. *Microsc Res Tech.* 1999, 46, 1, 1-17.
529. Sewards T.V., Sewards M.A.: Fear and power-dominance drive motivation: Neural representations and pathways mediating sensory and mnemonic inputs, and outputs to premotor structures. *Neurosci Biobehav Rev.* 2002, 26, 5, 553-579.
530. Shammah-Lagnado S.J., Beltramino C.A., McDonald A.J., Miselis R.R., Yang M., De Olmos J., Heimer L., Alheid G.F.: Supracapsular bed nucleus of the stria terminalis contains central and medial extended amygdala elements: Evidence from anterograde and retrograde tracing experiments in the rat. *J Comp Neurol.* 2000, 422, 4, 533-555.
531. Sheng M., Greenberg M.E.: The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron.* 1990, 4, 4, 477-485.
532. Shenton M.E., Dickey C.C., Frumin M., McCarley R.W.: A review of MRI findings in schizophrenia. *Schizophr Res.* 2001, 49, 1-2, 1-52.
533. Shi C., Cassell M.D.: Perirhinal cortex projections to the amygdaloid complex and hippocampal formation in the rat. *J Comp Neurol.* 1999, 406, 3, 299-328.
534. Shi C., Cassell M.D.: Cascade projections from somatosensory cortex to the rat basolateral amygdala via the parietal insular cortex. *J Comp Neurol.* 1998, 399, 4, 469-491.
535. Shi C., Cassell M.D.: Cortical, thalamic, and amygdaloid connections of the anterior and posterior insular cortices. *J Comp Neurol.* 1998, 399, 4, 440-468.
536. Shin C.M., Chung Y.H., Kim M.J., Lee E.Y., Kim E., Cha C.I.: Age-related changes in the distribution of nitrotyrosine in the cerebral cortex and hippocampus of rats. *Brain Res.* 2002, 931, 2, 194-199.
537. Sidorowicz M., Dziwiątkowski J., Moryś J., Berdel B., Maciejewska B., Słoniewski P., Zegarska Z.: Calcium binding proteins in the development of central nucleus of amygdaloid body-a morphometric and immunohistochemical study. *Folia Morphol.* 1996, 55, 4, 437-439.
538. Sigurdsson T., Doyère V., Cain C.K., LeDoux J.E.: Long-term potentiation in the amygdala: A cellular mechanism of fear. *Learn Mem. Neuropharmacology.* 2007, 52, 1, 215-227.
539. Simerly R.B., Swanson L.W.: Castration reversibly alters levels of cholecystokinin immunoreactivity within cells of three interconnected sexually dimorphic forebrain nuclei in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987, 84, 7, 2087-2091.
540. Simerly R.B., Swanson L.W.: The organization of neural inputs to the medial preoptic nucleus of the rat. *J Comp Neurol.* 1986, 246, 3, 312-342.
541. Simerly R.B., Young B.J., Capozza M.A., Swanson L.W.: Estrogen differentially regulates neuropeptide gene expression in a sexually dimorphic olfactory pathway. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989, 86, 12, 4766-4770.

-
542. Sims K.S., Williams R.S.: The human amygdaloid complex: A cytologic and histochemical atlas using Nissl, myelin, acetylcholinesterase and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase staining. *Neuroscience*. 1990, 36, 2, 449-472.
543. Siucińska E.: Neuroprzekaznik hamujący w plastyczności kory mózgu. *Kosmos*. 2005, 54, 4, 195-212.
544. Smith Y., Pare D.: Intra-amygdaloid projections of the lateral nucleus in the cat: PHA-L anterograde labeling combined with postembedding GABA and glutamate immunocytochemistry. *J Comp Neurol*. 1994, 342, 2, 232-248.
545. Smith Y., Paré J., Paré D.: Differential innervation of Parvalbumin-immunoreactive interneurons of the basolateral amygdaloid complex by cortical and intrinsic inputs. *J Comp Neurol*. 2000, 416, 4, 496-508.
546. Smith Y., Paré J., Paré D.: Cat intraamygdaloid inhibitory network: Ultrastructural organization of parvalbumin-immunoreactive elements. *J Comp Neurol*. 1998, 391, 2, 164-179.
547. Snyder S.H.: Janus faces of nitric oxide. *Nature*. 1993, 364, 6438, 577.
548. Solbach S., Celio M.R.: Ontogeny of the calcium binding protein parvalbumin in the rat nervous system. *Anat Embryol*. 1991, 184, 2, 103-124.
549. Solodkin A., Veldhuizen S.D., Van Hoesen G.W.: Contingent vulnerability of entorhinal parvalbumin-containing neurons in Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 1996, 16, 10, 3311-3321.
550. Somerville L.H., Jones R.M., Casey B.J.: A time of change: Behavioral and neural correlates of adolescent sensitivity to appetitive and aversive environmental cues. *Brain Cogn*. 2010, 72, 1, 124-133.
551. Somogyi P., Klausberger T.: Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. *J. Physiol*. 2005, 562, 1, 9-26.
552. Sonnenberg J.L., Macgregor-Leon P.F., Currant T., Morgant J.I.: Dynamic alterations occur in the levels and composition of transcription factor AP-1 complexes after seizure. *Neuron*. 1989, 3, 3, 359-365.
553. Sorvari H., Miettinen R., Soininen H., Paljärvi L., Karkola K., Pitkänen A.: Calretinin-immunoreactive terminals make synapses on calbindin D28k- immunoreactive neurons in the lateral nucleus of the human amygdala. *Brain Res*. 1998, 783, 2, 355-358.
554. Sorvari H., Miettinen R., Soininen H., Pitkänen A.: Parvalbumin-immunoreactive neurons make inhibitory synapses on pyramidal cells in the human amygdala: A light and electron microscopic study. *Neurosci Lett*. 1996, 217, 2-3, 93-96.
555. Sorvari H., Soininen H., Paljarvi L., Karkola K., Pitkanen A.: Distribution of parvalbumin-immunoreactive cells and fibers in the human amygdaloid complex. *J Comp Neurol*. 1995, 360, 2, 185-212.
556. Sorvari H., Soininen H., Pitkänen A.: Calbindin-D28K-immunoreactive cells and fibres in the human amygdaloid complex. *Neuroscience*. 1996, 75, 2, 421-443.
557. Sorvari H., Soininen H., Pitkänen A.: Calretinin-immunoreactive cells and fibers in the human amygdaloid complex. *J Comp Neurol*. 1996, 369, 2, 188-208.

-
558. Spear L.P.: The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci Biobehav Rev.* 2000, 24, 4, 417-463.
559. Spear L.P.: Neurobehavioral changes in adolescence. *Curr Dir Psychol Sci.* 2000, 9, 4, 111-114.
560. Stöhr T., Szuran T., Welzl H., Pliska V., Feldon J., Pryce C.R.: Lewis/Fischer rat strain differences in endocrine and behavioural responses to environmental challenge. *Pharmacol Biochem Behav.* 2000, 67, 4, 809-819.
561. Stratakis C.A., Chrousos G.P.: Neuroendocrinology and pathophysiology of the stress system. *Ann NY Acad Sci.* 1995, 771, 1-18.
562. Sun N., Cassell M.D.: Intrinsic GABAergic neurons in the rat central extended amygdala. *J Comp Neurol.* 1993, 330, 3, 381-404.
563. Swanson L.W.: Cerebral hemisphere regulation of motivated behavior. *Brain Res.* 2000, 886, 1-2, 113-164.
564. Swanson L.W., Kuypers H.G.J.M.: The paraventricular nucleus of the hypothalamus: Cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods. *J Comp Neurol.* 1980, 194, 3, 555-570.
565. Swanson L.W., Petrovich G.D.: What is the amygdala? *Trends Neurosci.* 1998, 21, 8, 323-331.
566. Swanson L.W., Sawchenko P.E.: Hypothalamic integration: Organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Annu Rev Neurosci.* 1983, 6, 269-324.
567. Swanson L.W., Sawchenko P.E.: Paraventricular nucleus: A site for the integration of neuroendocrine and autonomic mechanisms. *Neuroendocrinology.* 1980, 31, 6, 410-417.
568. Swanson L.W., Sawchenko P.E., Rivier J., Vale W.W.: Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: An immunohistochemical study. *Neuroendocrinology.* 1983, 36, 3, 165-186.
569. Swanson L.W., Sawchenko P.E., Wiegand S.J., Price J.L.: Separate neurons in the paraventricular nucleus project to the median eminence and to the medulla or spinal cord. *Brain Res.* 1980, 198, 1, 190-195.
570. Takahashi L.K., Nakashima B.R., Hong H., Watanabe K.: The smell of danger: A behavioral and neural analysis of predator odor-induced fear. *Neurosci Biobehav Rev.* 2005, 29, 8, 1157-1167.
571. Talarek S., Fidecka S.: Involvement of nitricoxidergic system in the hypnotic effects of benzodiazepines in mice. *Pol J Pharmacol.* 2004, 56, 6, 719-726.
572. Tanaka M., Ikeda T., Hayashi S., Iijima N., Amaya F., Hisa Y., Ibata Y.: Nitrogenic neurons in the medial amygdala project to the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat. *Brain Res.* 1997, 777, 1-2, 13-21.
573. Terada H., Nagai T., Okada S., Kimura H., Kitahama K.: Ontogenesis of neurons immunoreactive for nitric oxide synthase in rat forebrain and midbrain. *Dev Brain Res.* 2001, 128, 2, 121-137.
574. Thakur M.K., Oka T., Natori Y.: Gene expression and aging. *Mech Ageing Dev.* 1993, 66, 3, 283-298.

-
575. Thiruvikraman K.V., Nemeroff C.B., Plotsky P.M.: Sensitivity to glucocorticoid-mediated fast-feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis is dependent upon stressor specific neurocircuitry. *Brain Res.* 2000, 870, 1-2, 87-101.
576. Thiruvikraman K.V., Ying S.U., Plotsky P.M.: Patterns of Fos-immunoreactivity in the CNS induced by repeated hemorrhage in conscious rats: Correlations with pituitary-adrenal axis activity. *Stress.* 1997, 2, 2, 145-158.
577. Tomaz C., Dickinson-Anson H., McGaugh J.L.: Basolateral amygdala lesions block diazepam-induced anterograde amnesia in an inhibitory avoidance task. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992, 89, 8, 3615-3619.
578. Toth K., Freund T.F.: Calbindin D(28k)-containing nonpyramidal cells in the rat hippocampus: Their immunoreactivity for GABA and projection to the medial septum. *Neuroscience.* 1992, 49, 4, 793-805.
579. Tracey W.R., Nakane M., Pollock J.S., Forstermann U.: Nitric oxide synthases in neuronal cells, macrophages and endothelium are NADPH diaphorases, but represent only a fraction of total cellular NADPH diaphorase activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993, 195, 2, 1035-1040.
580. Tsigos C., Chrousos G.P.: Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res.* 2002, 53, 4, 865-871.
581. Tsuda M.: Cascade of gene expression induced by Ca^{2+} signals in neurons. *Neurochem Int.* 1996, 29, 5, 443-451.
582. Ulfing N.: Calcium-binding proteins in the human developing brain. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 2002, 165, 3-9, 1-92.
583. Unger J.W., Lapham L.W., McNeill T.H., Eskin T.A., Hamill R.W.: The amygdala in Alzheimer's disease: Neuropathology and Alz 50 immunoreactivity. *Neurobiol Aging.* 1991, 12, 5, 389-399.
584. Urban J.H., Miller M.A., Drake C.T., Dorsa D.M.: Detection of vasopressin mRNA in cells of the medial amygdala but not the locus coeruleus by in situ hybridization. *J Chem Neuroanat.* 1990, 3, 4, 277-283.
585. Usunoff K.G., Itzev D.E., Rolf A., Schmitt O., Wree A.: Nitric oxide synthase-containing neurons in the amygdaloid nuclear complex of the rat. *Anat Embryol.* 2006, 211, 6, 721-737.
586. Vaid R.R., Yee B.K., Shalev U., Rawlins J.N.P., Weiner I., Feldon J., Totterdell S.: Neonatal nonhandling and in utero prenatal stress reduce the density of NADPH-diaphorase-reactive neurons in the fascia dentata and Ammon's horn of rats. *J. Neurosci.* 1997, 17, 5599-5609.
587. Valentino R.J., Curtis A.L., Page M.E., Pavcovich L.A., Florin-Lechner S.M.: Activation of the locus ceruleus brain noradrenergic system during stress: circuitry, consequences, and regulation. *Adv Pharmacol.* 1998, 42, 781-784.
588. Valentino R.J., Foote S.L., Page M.E.: The locus coeruleus as a site for integrating corticotropin-releasing factor and noradrenergic mediation of stress responses. *Ann NY Acad Sci.* 1993, 697, 173-188.
589. Van De Kar L.D., Blair M.L.: Forebrain pathways mediating stress-induced hormone secretion. *Front Neuroendocrinol.* 1999, 20, 1, 1-48.

-
590. Van De Kar L.D., Piechowski R.A., Rittenhouse P.A., Gray T.S.: Amygdaloid lesions: Differential effect on conditioned stress and immobilization-induced increases in corticosterone and renin secretion. *Neuroendocrinology*. 1991, 54, 2, 89-95.
591. Van Der Kooy D., Koda L.Y., McGinty J.F.: The organization of projections from the cortex, amygdala, and hypothalamus to the nucleus of the solitary tract in rat. *J Comp Neurol*. 1984, 224, 1, 1-24.
592. Vazquez D.M., Akil H.: Pituitary-adrenal response to ether vapor in the weanling animal: Characterization of the inhibitory effect of glucocorticoids on adrenocorticotropin secretion. *Pediatr Res*. 1993, 34, 5, 646-653.
593. Veening J.G., Coolen L.M.: Neural activation following sexual behavior in the male and female rat brain. *Behav Brain Res*. 1998, 92, 2, 181-193.
594. Veening J.G., Swanson L.W., Sawchenko P.E.: The organization of projections from the central nucleus of the amygdala to brainstem sites involved in central autonomic regulation: A combined retrograde transport-immunohistochemical study. *Brain Res*. 1984, 303, 2, 337-357.
595. Venugopal J., Rao K.S.: Gene expression in different cell types of aging rat brain. *J Neurochem*. 1991, 56, 3, 812-817.
596. Vincent S.R.: Nitric oxide: A radical neurotransmitter in the central nervous system. *Prog Neurobiol*. 1994, 42, 1, 129-160.
597. Vincent S.R., Kimura H.: Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience*. 1992, 46, 4, 755-784.
598. Vizzard M.A., Erdman S.L., Erickson V.L., Stewart R.J., Roppolo J.R., De Groat W.C.: Localization of NADPH diaphorase in the lumbosacral spinal cord and dorsal root ganglia of the cat. *J Comp Neurol*. 1994, 339, 1, 62-75.
599. Volke V., Koks S., Vasar E., Bourin M., Bradwejn J., Mannisto P.T.: Inhibition of nitric oxide synthase causes anxiolytic-like behaviour in an elevated plus-maze. *Neuroreport*. 1995, 6, 10, 1413-1416.
600. Von Bohlen K., Halbach O., Unsicker K.: Morphological alterations in the amygdala and hippocampus of mice during ageing. *Eur J Neurosci*. 2002, 16, 12, 2434-2440.
601. Waldvogel H.J., Faull R.L.M., Williams M.N., Dragunow M.: Differential sensitivity of calbindin and parvalbumin immunoreactive cells in the striatum to excitotoxins. *Brain Res*. 1991, 546, 2, 329-335.
602. Walker D.L., Davis M.: Double dissociation between the involvement of the bed nucleus of the stria terminalis and the central nucleus of the amygdala in startle increases produced by conditioned versus unconditioned fear. *J Neurosci*. 1997, 17, 23, 9375-9383.
603. Watanabe Y., Saito H., Abe K.: Nitric oxide is involved in long-term potentiation in the medial but not lateral amygdala neuron synapses in vitro. *Brain Res*. 1995, 688, 1-2, 233-236.
604. Watkins L.R., Wiertelak E.P., Maier S.F.: The amygdala is necessary for the expression of conditioned but not unconditioned analgesia. *Behav Neurosci*. 1993, 107, 2, 402-405.

-
605. Weiskrantz L.: Behavioural changes associated with ablation of the amygdaloid complex in monkeys. *J Comp Physiol Pharmacol.* 1956, 49, 129-158.
606. Weitzdoerfer R., Hoeger H., Engidawork E., Engelmann M., Singewald N., Lubec G., Lubec B.: Neuronal nitric oxide synthase knock-out mice show impaired cognitive performance. *Nitric Oxide.* 2004, 10, 3, 130-140.
607. Welberg L.A.M., Seckl J.R.: Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of the brain. *J Neuroendocrinol.* 2001, 13, 2, 113-128.
608. Węsierska M.: Specyfika zachowań eksploracyjnych oposa (*Monodelphis domestica*) i szczura (*Rattus norvegicus*) odmiany Long-Evans. *Kosmos.* 2002, 51, 1, 19-33.
609. Whalen P.J.: Fear, vigilance, and ambiguity: Initial neuroimaging studies of the human amygdala. *Curr Dir Psychol Sci.* 1998, 7, 6, 177-188.
610. Whitfield J.F., Bird R.P., Chakravarthy B.R., Isaacs R.J., Morley P.: Calcium-cell cycle regulator, differentiator, killer, chemopreventor, and maybe, tumor promoter. *J Cell Biochem Suppl.* 1995, 58, SUPPL. 22, 74-91.
611. Whitnall M.H.: Regulation of the hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurosecretory system. *Prog Neurobiol.* 1993, 40, 5, 573-629.
612. Wiedenmayer C.P., Barr G.A.: Developmental changes in c-fos expression to an age-specific social stressor in infant rats. *Behav Brain Res.* 2001, 126, 1-2, 147-157.
613. Wiley J.L., Cristello A.F., Balster R.L.: Effects of site-selective NMDA receptor antagonists in an elevated plus-maze model of anxiety in mice. *Eur J Pharmacol.* 1995, 294, 1, 101-107.
614. Wójcik S., Dziewiątkowski J., Spodnik E., Ludkiewicz B., Kowiański P., Spodnik J.H., Moryś J.: Distribution of immunoreactivity of calcium-binding proteins in the rabbit piriform cortex. *Folia Neuropathol.* 2004, 42, 4, 209-220.
615. Wójcik S., Spodnik E., Spodnik J.H., Dziewiątkowski J., Moryś J.: Distribution of neuronal nitric oxide synthase (nNOS)-immunoreactive elements in the rabbit piriform cortex. *Folia Morphol.* 2007, 66, 4, 296-302.
616. Wolf H.K., Aliashkevich A.F., Blümcke I., Wiestler O.D., Zentner J.: Neuronal loss and gliosis of the amygdaloid nucleus in temporal lobe epilepsy: A quantitative analysis of 70 surgical specimens. *Acta Neuropathol.* 1997, 93, 6, 606-610.
617. Wood R.I., Newman S.W.: Mating activates androgen receptor-containing neurons in chemosensory pathways of the male Syrian hamster brain. *Brain Res.* 1993, 614, 1-2, 65-77.
618. Woodruff A.R., Monyer H., Sah P.: GABAergic excitation in the basolateral amygdala. *J Neurosci.* 2006, 26, 46, 11881-11887.
619. Woodruff A.R., Sah P.: Inhibition and synchronization of basal amygdala principal neuron spiking by parvalbumin-positive interneurons. *J Neurophysiol.* 2007, 98, 5, 2956-2961.
620. Woodruff A.R., Sah P.: Networks of parvalbumin-positive interneurons in the basolateral amygdala. *J Neurosci.* 2007, 27, 3, 553-563.
621. Wu Y.L., Tanaka M., Yoshida M., Yokoo H., Tanaka T., Tomita M., Ishikawa M.: Effect of aging on psychological stress-induced increases in noradrenaline re-

- lease in the rat anterior hypothalamus: An in vivo microdialysis study. *Brain Res.* 1997, 771, 2, 347-350.
622. Xu Y., Day T.A., Buller K.M.: The central amygdala modulates hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to systemic interleukin-1 β administration. *Neuroscience.* 1999, 94, 1, 175-183.
623. Yamada K., Emson P., Hökfelt T.: Immunohistochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat hypothalamus and colocalization with neuropeptides. *J Chem Neuroanat.* 1996, 10, 3-4, 295-316.
624. Yan Y., Van Brederode J.F.M., Hendrickson A.E.: Developmental changes in calretinin expression in GABAergic and nonGABAergic neurons in monkey striate cortex. *J Comp Neurol.* 1995, 363, 1, 78-92.
625. Yasin S., Costa A., Trainer P., Windle R., Forsling M.L., Grossman A.: Nitric oxide modulates the release of vasopressin from rat hypothalamic explants. *Endocrinology.* 1993, 133, 3, 1466-1469.
626. 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, 3, 143-154.
627. Yun H., Dawson V.L., Dawson T.M.: Nitric oxide in health and disease of the nervous system. *Mol Psychiatry.* 1997, 2, 4, 300-310.
628. Zagrodzka J.: Neurofizjologiczne mechanizmy zachowania emocjonalnego. W: Górka T., Grabowska A., Zagrodzka J. (red.): *Mózg a zachowanie*. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 1997, s. 359-377.
629. Zech M., Roberts G.W., Bogerts B.: Neuropeptides in the amygdala of controls, schizophrenics and patients suffering from Huntington's chorea: An immunohistochemical study. *Acta Neuropathol.* 1986, 71, 3-4, 259-266.
630. Zola-Morgan S., Squire L.R., Alvarez-Royo P., Clower R.P.: Independence of memory functions and emotional behavior: separate contributions of the hippocampal formation and the amygdala. *Hippocampus.* 1991, 1, 2, 207-220.

8 STRESZCZENIE

Ciało migdałowe stanowi grupę jąder położoną w płacie skroniowym kresomózgowia. O ile fakt znaczącej roli ciała migdałowego w ośrodkowej kontroli reakcji stresowej jest powszechnie uznawany, to mechanizmy jego działania, szczególnie w kontekście rozwoju, dojrzewania i starzenia oraz zróżnicowania czynnościowego jego jąder wciąż pozostawiają wiele pytań. Słabo poznana jest również natura immunocytochemiczna komórek zaangażowanych w odpowiedź na określony stresor.

Celem pracy był ogólny opis morfologii i występowania komórek zawierających białka wiążące wapń i syntazę tlenu azotu w ciele migdałowatym oraz analiza aktywacji jąder tej struktury w odpowiedzi na awersyjny bodziec psychologiczny w rozwoju postnatalnym, dojrzewaniu i starzeniu mózgowia szczura.

Materiał badawczy obejmował samce szczurów rasy Wistar w wieku od P0 do P720. Grupę eksperymentalną stanowiły zwierzęta poddane jednorazowej ekspozycji na psychologiczny bodziec awersyjny (test otwartego pola; OF). Następnie metodą podwójnego barwienia immunocytochemicznego oceniono u nich (i u szczurów z opowiadającej im grupy kontrolnej) występowanie w komórkach ciała migdałowego białka c-Fos (marker aktywności neuronów) oraz podwójne wybarwienie białka c-Fos i odpowiednio kalretyny (CR), kalbindyny (CB), parwalbuminy (PV) oraz syntazy tlenu azotu (NOS). Pozostałe zwierzęta z grup kontrolnych użyto do immunocytochemicznej analizy występowania i morfologii komórek zawierających białka wiążące wapń (CR, CB, PV) oraz NOS w jądrach ciała migdałowego. Uzyskane wyniki analizowano jakościowo, półilościowo oraz ilościowo (przy użyciu obiektywnych metod morfometrycznych).

Stwierdzono, że:

- Rozwój postnatalny szczura charakteryzuje się zróżnicowaniem dynamiki i charakteru zmian ilościowych i jakościowych populacji neuronów ciała migdałowego zawierających CaBPs i NOS. W procesie starzenia zachodzą zmiany jakościowe w populacjach neuronów NOS-ir.
- Badane jądra ciała migdałowego cechuje podobny schemat zmian pobudzenia pod wpływem bodźca awersyjnego (OF) w zależności od wieku. Okres P0-P7 charakteryzuje relatywnie niski poziom aktywności; w okresie P14-P90 następuje wyraźne zwiększenie pobudzenia, po czym od P90 aktywacja jąder ciała migdałowego stopniowo, ale systematycznie się zmniejsza.
- Najwyższy poziom aktywacji w odpowiedzi na OF wykazują jądra: przyśrodkowe, łożyskowe dodatkowego pasma węchowego i korowe przednie. Wśród badanych populacji komórkowych, znacząco większe zaangażowanie wykazują komórki NOS-ir jądra przyśrodkowego oraz NOS- i CR-ir jądra łożyskowego dodatkowego pasma węchowego.

- Jądra ciała migdałowatego wykazują określone „preferencje” w aktywowaniu badanych populacji neuronalnych w odpowiedzi na OF. W większości jąder (zwłaszcza tych wykazujących słabsze zaangażowanie) preferencyjnie pobudzana jest pula komórek CB-ir. W jądrach: BAOT, Me i CoA, (najbardziej aktywnych) pobudzane są głównie komórki NOS- i CR-ir.

Wyniki przedstawione w niniejszej pracy porównano z danymi uzyskanymi przez innych autorów.

9 Summary

The amygdaloid body constitutes a group of nuclei placed in the temporal lobe of telencephalon. While the fact of the significant function of the amygdaloid body in the central control of stress reaction is widely recognized, the mechanisms of its functioning, particularly in the context of development, maturation, and ageing, as well as functional diversification of its nuclei still leaves many questions unanswered. The immunocytochemical nature of cells engaged in reacting to a given stressor is also hardly known.

The aim of this study is a general description of morphology and occurrence of cells containing calcium binding proteins, as well as nitric oxide synthase in the amygdaloid body and the analysis of nuclei activation of this structure in response to an aversive psychological stimulus in postnatal development, maturation and ageing of the rat's encephalon.

Wistar male rats aged from P0 to P720 were used in this study. Experimental group were animals which underwent a single exposition to a psychological aversive stimulus (open field test; OF). Subsequently, by the use of the double staining immunocytochemical technique, they (and the respective animals from the control group) were evaluated for the occurrence of c-Fos proteins (neuronal activity marker) in the amygdaloid body cells, as well as double staining of c-Fos protein and respectively carletinin (CR), calbindin (CB), parvalbumin (PV) and the neuronal form of nitric oxide synthase (NOS). The remaining control animals were used for immunocytochemical analysis of morphology and occurrence of cells containing calcium binding proteins (CR, CB, PV) as well as NOS in the nuclei of the amygdaloid body. The achieved results underwent qualitative, semi-quantitative and quantitative analysis (by the use of objective morphometric methods).

It was determined that:

- The rat's postnatal development is characterized by diversification in dynamics and character of qualitative and quantitative changes of the neuron population in the amygdaloid body containing CaBPs and NOS. In the process of ageing, qualitative changes appear in the NOS-ir neuron populations.
- Studied nuclei of the amygdaloid body are characterized by a similar chart of stimulation change under the influence of an aversive stimulus (OF) depending on age. The P0-P7 period is characterized by a relatively low level of activity; in the P14-P90 period there is a visible increase in activation, and then from P90 the activation of the nuclei of the amygdaloid body decreases gradually, yet systematically.
- The highest level of activation in response to OF is demonstrated by the medial nucleus, bed nucleus of the accessory olfactory tract and anterior cortical nucleus. Among the tested populations of cells, the NOS-ir cells of the me-

dial nucleus and NOS- and CR-ir of the lateral olfactory tract nucleus show significantly higher involvement.

- The nuclei of the amygdaloid body show certain “preferences” in activating the tested neuron populations in response to OF. In most of the nuclei (especially those showing lower involvement) the compartment of CB-ir cells is preferentially stimulated. In the nuclei: BAOT, Me and CoA (the most active) the NOS- and CR-ir cells are predominantly activated.

The results presented in the article were compared with data obtained by other authors.