



UNIwersytet Jagielloński w Krakowie

Wydział Biologii

Neurobiologia

Zmiany w układzie GABAergicznym w korze czołowej u samic i samców myszy w okresie dojrzewania

Karolina Przyborowicz

Praca magisterska

wykonana pod opieką

prof. dra hab. Jana Rodrigueza Parkitny

w Zakładzie Neurofarmakologii Molekularnej

Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk

Kraków 2024

Wszystkim,
którzy pomagali mi przy powstaniu
tej pracy dyplomowej:

Prof. dr. hab. Janowi Rodriguezowi Parkitnie,

Dr Zofii Hardej,

Dr Julicie Wesołowskiej,

Dr Małgorzacie Borczyk,

Oraz innym osobom z zespołu NF MOL

za motywowanie mnie do działania,

Dziękuję.

Część badawcza pracy była dofinansowana ze środków
z projektu grantowego Miniatura 2021/05/X/NZ4/00690
przyznanego przez Narodowe Centrum Nauki

SPIS TREŚCI

Streszczenie.....	4
Abstract.....	5
Wykaz skrótów	6
1. Wstęp	7
1.1 Transmisja GABAergiczna w korze mózgowej	8
1.2 Interneurony w układzie GABAergicznym	10
1.3 Zmiany zachodzące w układzie GABAergicznym w korze mózgu podczas dojrzewania	12
2. Cel i założenia pracy	16
3. Materiały i metody	16
3.1 Zwierzęta doświadczalne	16
3.2 Barwienie immunofluorescencyjne	17
3.3 Obrazowanie mikroskopowe	19
3.4 Analiza obrazów mikroskopowych.....	21
3.5 Analiza statystyczna.....	21
4. Wyniki.....	23
4.1 Procedura wyboru optymalnych ustawień w programie Fiji	23
4.2 Zmiany liczby komórek układu GABAergicznego zależne od wieku.....	30
5. Dyskusja i wnioski.....	33
Spis tabel.....	37
Spis rycin	38
Bibliografia	39
Aneks	44

Streszczenie

Układ GABAergiczny pełni funkcję hamującą w ośrodkowym układzie nerwowym i podlega stałemu rozwojowi podczas dojrzewania. Sugeruje się, że rozwój tego układu może być powiązany z występującymi w tym okresie zmianami behawioralnymi takimi jak np. zmniejszona preferencja przebywania wśród członków rodziny w środkowym etapie dojrzewania. Choć zmiany behawioralne pojawiające się w czasie dojrzewania są dobrze opisane, neurobiologiczne podłoże tychże zmian nie jest dostatecznie poznane. Istnieją badania porównujące układ GABAergiczny zwierząt w fazie adolescencji i dorosłości, jednak zmiany zachodzące w trakcie samego procesu dojrzewania są wciąż niewystarczająco poznane.

W niniejszej pracy dyplomowej zbadano zmiany w układzie GABAergicznym w korze przedczołowej (PFC) i oczodołowo-czołowej (OFC) u samców i samic myszy podczas dojrzewania. Przebadano 29 samców i 34 samice myszy C57BL/6 w 4 grupach wiekowych obejmujących wczesny (około 32 dni), środkowy (38 dni) i późny (43 dni) okres dojrzewania płciowego oraz okres dorosłości (72 dni). Przeprowadzono barwienie immunofluorescencyjne w celu wyznakowania komórek wyrażających parwalbuminę (PV) oraz kalretyninę (CAL) – białek wiążących wapń będących markerami głównych rodzajów interneuronów GABAergicznych. Skrawki mózgu zobrazowano przy pomocy mikroskopu konfokalnego a następnie policzono liczby interneuronów PV lub CAL. W wyniku badań u samic nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian w liczbie komórek wyrażających PV lub CAL podczas dojrzewania ani w PFC, ani w OFC. Natomiast u samców w PFC wykryto stopniowy wzrost liczby komórek wyrażających PV, z najniższą liczbą w 32 dniu życia i najwyższą w 72 dniu życia. Zmian tych nie odnotowano w OFC. W przypadku komórek wyrażających CAL, u samców zaobserwowano wzrost ich liczby w dorosłości w każdej ze struktur.

W przyszłości niniejsze badania można rozszerzyć, uwzględniając takie czynniki jak faza cyklu płciowego samic, lateralizacja mózgu czy zmiany w liczbie komórek wyrażających somatostatynę (SST). Te dodatkowe informacje mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia neurobiologicznych mechanizmów leżących u podłoża zmian behawioralnych występujących podczas dojrzewania. Poznanie tych procesów pozwoliłoby na weryfikację prawidłowego rozwoju osobnika, a ewentualne nieprawidłowości mogłyby być korygowane za pomocą farmakoterapii lub innych, obecnie jeszcze nieznanych metod.

Abstract

The GABAergic system has an inhibitory function in the central nervous system and undergoes continuous development during puberty. It is suggested that the development of this system may be linked to behavioral changes observed during this period, such as a decreased preference for spending time with family during mid-adolescence. Although behavioral changes during adolescence are well-described, the neurobiological basis of these changes are not fully understood. There are studies comparing the GABAergic system in adolescent and adult animals, but the changes that happen during the maturation process itself are still not well understood.

In this thesis, I examined changes in the GABAergic system in the prefrontal cortex (PFC) and orbitofrontal cortex (OFC) in male and female mice during adolescence. I studied 29 male and 34 female C57BL/6 mice in 4 age groups: early (about 32 days), middle (38 days), late (43 days) sexual maturation, and adulthood (72 days). Immunofluorescence staining was used to mark cells that express parvalbumin (PV) and calretinin (CAL), calcium-binding proteins that are markers of GABAergic interneurons. Brain scrapings were imaged using confocal microscopy, and the numbers of PV- or CAL-expressing interneurons was counted. The results showed no statistically significant changes in the number of PV- or CAL-expressing cells in females during adolescence in either the PFC or OFC. However, in males, there was a gradual increase in the number of PV-expressing cells in the PFC, with the lowest number at 2 days of age and the highest at 72 days of age. These changes were not observed in the OFC. For CAL-expressing cells, males showed an increase in their number in adulthood in both brain structures.

In the future, this study could be expanded by including factors such as the phase of the estrous cycle in females, brain lateralization, or changes in the number of somatostatin (SST) expressing cells. These additional data might help to better understand the neurobiological mechanisms behind behavioral changes during adolescence. Understanding these processes would provide important insight into development during adolescence, possibly revealing targets for therapies preventing or reversing maladaptations.

Wykaz skrótów

BDNF – neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego (ang. *brain-derived neurotrophic factor*)

CAL – kalretynina (ang. *calretinin*)

FSH – hormon folikulotropowy (ang. *follicle-stimulating hormone*)

GABA – kwas γ -aminomasłowy (ang. *γ -aminobutyric acid*)

GAD – dekarboksylaza kwasu glutaminowego (ang. *glutamic acid decarboxylase*)

GnRH – gonadoliberyna (ang. *gonadotropin-releasing hormone*)

LH – hormon luteinizujący (ang. *luteinizing hormone*)

OFC – kora okołoczodołowa (ang. *orbitofrontal cortex*)

PCs – neurony/komórki piramidowe (ang. *pyramidal neurons/cells*)

PFC – kora przedczołowa (ang. *prefrontal cortex*)

dmPFC – grzbietowo-brzuszną kora przedczołowa (ang. *dorso medial prefrontal cortex*)

PV – parwalbumina (ang. *parvalbumin*)

ROI – region zainteresowania (ang. *region of interests*)

SST – somatostatyna (ang. *somatostatin*)

1. Wstęp

Okres dorastania definiuje się jako czas pomiędzy początkiem dojrzewania płciowego a akceptacją roli dorosłego członka społeczności. Faza ta obejmuje okres przejścia od dziecka, które silnie zależy od opieki rodziców, do dorosłego, który pod względem fizjologicznym, psychologicznym i społecznym jest zdolny do reprodukcji (Sebastian et al., 2008). Dorastanie wiąże się z głębokimi zmianami w zachowaniu, które przystosowują nastolatka do wyzwań występujących w tym okresie. Są one oparte na szeregu drastycznych (zarówno postępowych, jak i regresywnych) zmian w mózgu. Co ciekawe, u ludzi, naczelnych innych niż człowiek i gryzoni rozwijają się podobne zachowania podczas dojrzewania płciowego, w tym oddzielenie się od rodziców, wzrost częstotliwości społecznych interakcji z rówieśnikami, zwiększona skłonność do podejmowania ryzyka i poszukiwania wrażeń, zwiększone spożycie pokarmu oraz opóźnione cykle snu (Spear, 2000).

Powszechnie obserwuje się występowanie zmian behawioralnych w okresie dojrzewania (Sebastian et al., 2008). Jednakże dojrzewanie płciowe to okres intensywnych zmian nie tylko w zachowaniu ale również w strukturze i funkcjonowaniu mózgu (Crone & Dahl, 2012). W tym czasie nadal rozwija się układ GABAergiczny (neuroprzebieżnikiem w tym układzie jest kwas γ -aminomasłowy, GABA) będący głównym układem odpowiedzialnym za przebieżnictwo hamujące w korze przedczołowej. Dodatkowo, podczas dojrzewania wzrasta objętości istoty białej w mózgu (Paus et al., 2008). Ponadto, niektóre zaburzenia neuropsychiatryczne, np. schizofrenia czy depresja, ujawniają się w tym okresie rozwojowym. Wiele obserwacji wspiera hipotezę, że upośledzenie funkcyjne lub zaburzenie rozwoju układu GABAergicznego może być przyczyną występowania objawów schizofrenicznych (Lewis et al., 2005; Lisman et al., 2008). Podsumowując, zmiany behawioralne w czasie dojrzewania są dobrze zbadane. Jednakże zmiany w mózgu, które leżą u podłoża tychże zmian stale wymagają dalszych badań, które mogłyby się przyczynić do rozwoju nowych terapii chorób, których pierwsze objawy występują na etapie adolescencji.

W okresie dojrzewania obserwujemy również znaczące zmiany hormonalne (Bell, 2018). W podwzgórzu wydzielana jest gonadoliberyna (GnRH). W odpowiedzi na GnRH przysadka mózgowa wydziela dwie kluczowe gonadotropiny: hormon luteinizujący (LH) oraz hormon folikulotropowy (FSH). Wspomniane gonadotropiny wpływają na gonady i prowadzą do zwiększonej produkcji hormonów płciowych: u samców – testosteronu, u samic – estrogenu

i progesteronu. W tym kontekście, interesującą cechą układu GABAergicznego jest jego wrażliwość na hormony steroidowe, a w szczególności hormony płciowe (Belelli et al., 2006). Mogą one wpływać na układ GABAergiczny m.in poprzez regulację ekspresji podjednostek receptorów GABA_A (Zhang et al., 1999).

1.1 Transmisja GABAergiczna w korze mózgowej

W literaturze dotyczącej okresu dojrzewania i zmian w układzie nerwowym podczas dojrzewania wskazuje się istotną rolę układu GABAergicznego. GABA jest głównym neuroprzekaźnikiem hamującym w ośrodkowym układzie nerwowym ssaków (Farrant & Kaila, 2007; Mody & Pearce, 2004). Odgrywa on kluczową rolę w wielu procesach neuronalnych, np. w regulacji poziomów aktywności neuronalnej, generowaniu aktywności oscylacyjnej oraz plastyczności neuronalnej (Fagiolini et al., 2008; Mody & Pearce, 2004; Frédéric Pouille & Scanziani, 2004; Whittington & Traub, 2003). Hamujący efekt GABAergiczny dzieli się na dwie formy: fazową i toniczną. Hamowanie fazowe odpowiada za szybką transmisję sygnału z jednego neuronu do drugiego oraz zachodzi za pośrednictwem receptorów zlokalizowanych w obrębie synapsy (Mody & Pearce, 2004). Hamowanie toniczne reguluje pobudliwość sieci neuronalnej poprzez wpływ na opór wejścia błony komórkowej i związane jest z receptorami zlokalizowanymi poza synaptycznie (Constantinidis et al., 2002; Gabernet et al., 2005; Swadlow, 2003).

Kwas GABA, będący neuroprzekaźnikiem hamującym u kręgowców i bezkręgowców występuje w całym ośrodkowym układzie nerwowym. Jest on syntetyzowany z glutaminianu przez dekarboksylazę kwasu glutaminowego (GAD) występującą w dwóch izoformach: GAD65 i GAD67. GAD67 katalizuje głównie powstawanie cytoplazmatycznego GABA, podczas gdy GAD65 preferencyjnie katalizuje syntezę synaptycznie kierowanego GABA (Soghomonian & Martin, 1998). Zgodnie z różnorodnymi funkcjami przypisywanymi systemowi GABAergicznemu, różne typy receptorów neuroprzekaźników pośredniczą w odpowiedziach postsynaptycznych. W układzie nerwowym występują dwie ogólne klasy receptorów GABA: jonotropowe receptory GABA_A oraz metabotropowe receptory GABA_B (Emson, 2007; Farrant & Kaila, 2007).

Receptory GABA_A są heteropentamerowymi białkami błonowymi. Struktura receptorów GABA_A składa się z dwóch podjednostek α , dwóch podjednostek β i jednej podjednostki γ . Każda podjednostka ma wiele izoform, a inne podjednostki, takie jak δ i ϵ , mogą występować zamiast podjednostki γ (Luo, 2020). Aktywacja receptora GABA_A powoduje zmianę konformacyjną receptora, która skutkuje otwarciem kanału jonowego w wyniku czego następuje napływ jonów chlorkowych do wnętrza komórki. Proces ten powoduje wzrost różnicy potencjałów pomiędzy stronami błony komórkowej, czyli hiperpolaryzację (Farrant & Kaila, 2007; Ghit et al., 2021). Hiperpolaryzacja błony utrudnia wywołanie potencjału czynnościowego ale nie zmienia cech potencjałów czynnościowych. Jednakże na wczesnych etapach rozwoju mózgu (w pierwszych 2 tygodniach życia) GABA może działać jako neurotransmitter pobudzający (Ben-Ari, 2002). Ten efekt zmienia się w miarę rozwoju, gdy neurony zaczynają efektywniej wypompowywać jony chlorkowe na zewnątrz komórki, co prowadzi do klasycznego, hamującego działania GABA. Receptor GABA_A poza miejscem wiążącym GABA posiada miejsca wiązania dla allosterycznych modulatorów, wśród których są barbiturany, benzodiazepiny czy alkohol. Ich przyłączenie do receptora zwiększa prawdopodobieństwo otwarcia się kanału (Hevers & Lüddens, 1998; Luo, 2020). Z tego powodu wiele leków bazujących na tych substancjach oddziałuje na receptory GABA_A, modulując hamowanie w mózgu. Najczęściej stosowane leki przeciwpadaczkowe, przeciwłękowe i nasenne wiążą się z receptorami GABA_A i wzmacniają ich funkcje (Luo, 2020).

Drugim rodzajem receptorów GABA są receptory GABA_B, które należą do receptorów metabotropowych posiadających 7 helis transbłonowych sprzężonych z białkiem G_i (Kaupmann et al., 1998). Funkcjonalne GABA_B są heterodimerami (podjednostka GABA_{B1} – zawierająca miejsce wiązania GABA; podjednostka GABA_{B2} – niezbędna do interakcji z białkami G oraz do przekazywania sygnału wewnątrzkomórkowego). Aktywacja tych receptorów prowadzi do uruchomienia kaskady przekazywania sygnału z użyciem białka G_i, co skutkuje zamknięciem kanałów wapniowych, redukcją aktywności cykazy adenylowej oraz otwarciem dokomórkowych prostowniczych kanałów potasowych (Bassetti, 2022; Chebib & Johnston, 1999). Z uwagi na to, że potencjał równowagi dla jonów potasu jest zawsze bardziej ujemny niż potencjał spoczynkowy, otwarcie kanałów K⁺ zawsze powoduje hiperpolaryzację, co sprawia, że neurony stają się mniej podatne na osiągnięcie progu dla wywołania potencjału czynnościowego w odpowiedzi na pobudzający bodziec (Luo, 2020). W przeciwieństwie do GABA_A receptory GABA_B nie oddziałują z benzodiazepinami

czy barbituranami. Ich agonistą jest m. in. baklofen, którego połączenie z receptorami GABA_B skutkuje powolnym i przedłużonym w czasie zahamowaniem aktywności.

1.2 Interneurony GABAergiczne

Szacuje się, że w korze znajduje się ponad 20 różnych podtypów interneuronów GABAergicznych. Podtypy te są rozróżniane na podstawie m.in. kryteriów morfologicznych, właściwości elektrofizjologicznych czy typów połączeń synaptycznych. Jednym z kryteriów jest typ białka, które interneurony GABAergiczne wyrażają (Gonchar & Burkhalter, 1997; Kawaguchi & Kubota, 1997; Markram et al., 2004). Znacznikami 3 głównych grup interneuronów GABAergicznych są białka wiążące wapń: parwalbumina (PV) i kalretynina (CAL) oraz neuropeptyd somatostatyna (SST). Co warto wspomnieć, populacja interneuronów wyrażających PV jest niezależna od populacji wyrażającej CAL, co oznacza, że ekspresja tych markerów nie nakłada się na siebie (Xu et al., 2010).

Grupa interneuronów PV w PFC jest rozmieszczona od II do V warstwy kory mózgowej, z największą gęstością w warstwach III i V. Składa się ona z dwóch typów komórek: koszykowych i żyrandolowych (Kawaguchi & Kubota, 1997). Komórki koszykowe zazwyczaj mają morfologię multipolarną. Wyróżnia się trzy podtypy komórek koszykowych (gniazdowe, małe i duże) według ich wzorców projekcji aksonalnych (Markram et al., 2004). Celują one w ciało komórki neuronu piramidowego (z ang. *pyramidal cells*, PCs), wpływając tym samym na integrację wejść synaptycznych ze wszystkich gałęzi dendrytycznych (Luo, 2020). Wykazano, że szybkie wyładowania neuronów koszykowych są dominującym systemem hamującym w korze nowej, gdzie pośredniczą w szybkim hamowaniu docelowych neuronów (Cruikshank et al., 2007; F. Pouille & Scanziani, 2001). Wyładowania te odgrywają dużą rolę w regulacji równowagi między wejściami pobudzającymi i hamującymi w korze mózgowej (Haider & McCormick, 2009; Hasenstaub et al., 2005). Znacznie mniej wiadomo o drugiej podgrupie interneuronów wyrażających PV, czyli o komórkach żyrandolowych. W przeciwieństwie do neuronów koszykowych, komórki żyrandolowe celują w synapsy na początkowych segmentach aksonów PCs, co oznacza, że mają najbardziej bezpośredni wpływ na produkcję potencjałów czynnościowych (Kawaguchi & Kubota, 1997; Luo, 2020). Zarówno komórki koszykowe, jak i komórki żyrandolowe są szybkie w wyładowaniach, ale różnią się właściwościami

elektrofizjologicznymi (Glickfeld et al., 2009). Oddziaływanie komórek koszyczkowych ma globalny efekt na aktywność PCs, hamując całe ciało komórkowe i zapewniając ogólną kontrolę nad wyładowaniami neuronów. Komórki żyrandolowe natomiast działają bardziej selektywnie, hamując aktywność PCs na poziomie aksonów, co daje im możliwość precyzyjnej regulacji potencjałów czynnościowych.

Interneurony PV są kluczowe w generowaniu oscylacji γ w PFC, które są związane z funkcjami poznawczymi, takimi jak uwaga, pamięć robocza czy podejmowanie decyzji (Buzsáki & Wang, 2012; Sohal et al., 2009). Odgrywają one również rolę w synchronizacji aktywności neuronalnej między różnymi obszarami kory, co jest niezbędne dla integracji informacji i wykonywania złożonych zadań poznawczych. Jak wspomniano, w PFC interneurony PV regulują aktywność PCs, co jest kluczowe dla modulacji impulsów neuronalnych związanych z procesami decyzyjnymi i kontrolą zachowania. Dysfunkcje komórek PV w PFC są powiązane z wieloma zaburzeniami neuropsychiatrycznymi, w tym schizofrenią, zaburzeniami lękowymi czy depresją (Gonzalez-Burgos & Lewis, 2008). Uważa się również, że zmniejszona ekspresja PV lub zakłócenie funkcji interneuronów PV prowadzi do zaburzeń równowagi między pobudzeniem a hamowaniem w PFC, co może prowadzić do problemów z przetwarzaniem poznawczym i kontrolą emocji.

Następną grupą interneuronów GABAergiczych są interneurony kalretyninowe (CAL). CAL, podobnie jak PV, jest białkiem wiążącym wapń. W większości przypadków interneurony CAL w korze mózgu to komórki dwubiegunowe lub wielobiegunowe (Qi et al., 2022). Dwubiegunowe neurony CAL łączą się ze sobą poprzez złącza szczelinowe i pośredniczą w przekazywaniu sygnału do PCs znajdujących się w II i III warstwie kory. Natomiast neurony wielobiegunowe tworzą synapsy elektryczne z komórkami PV. W przeciwieństwie do gryzoni, warstwy IV, V i VI kory nowej człowieka mają nielicznie występujące neurony CAL, a w warstwie I pojawiają się komórki Cajala-Retziusa wyrażające CAL (Džaja et al., 2014; Qi et al., 2022). Interneurony CAL mają najczęściej rozległe, cienkie dendryty o nieregularnym przebiegu. Są kluczowe dla regulacji hamowania w sieciach neuronalnych co jest istotne dla integracji informacji i utrzymania plastyczności synaptycznej (Caputi et al., 2009; Gulyás et al., 1996). Dysfunkcje komórek CAL i ich podatność na ekscytotoksyczność mogą być powiązane z występowaniem m.in. epilepsji (Qi et al., 2022).

Kolejną grupą interneuronów GABAergiczych są interneurony wyrażające SST, znane jako komórki Martinottiego. Występują one w korze mózgowej, gdzie rozgałęziają się

w warstwie I kory i tworzą synapsy na pęczkach dendrytów PCs (Kawaguchi & Kubota, 1997; Luo, 2020; Markram et al., 2004). Choć komórki Martinottiego znajdują się we wszystkich warstwach korowych II-VI, największe ich zagęszczenie obserwuje się w warstwie V (Kawaguchi & Kubota, 1997; Uematsu et al., 2008). W przeciwieństwie do interneuronów wyrażających PV, komórki Martinottiego hamują pośrednie i dystalne dendryty PCs. W sytuacji, gdy PCs zaczyna wykazywać nadmierną aktywność, interneurony wyrażające SST aktywują się, przekazując sygnały hamujące do dendrytów otaczających je PCs. Proces ten nazywany jest hamowaniem dendrytycznym. Dzięki temu procesowi komórki Martinottiego skutecznie ograniczają nadmierne pobudzenie PCs, przyczyniając się do utrzymania homeostazy w lokalnych sieciach neuronalnych (Beierlein et al., 2003; Fanselow et al., 2008; Silberberg & Markram, 2007).

1.3 Zmiany zachodzące w układzie GABAergicznym w korze mózgu podczas dojrzewania

Zmiany w zachowaniu są powszechnie obserwowane w okresie dojrzewania (Sebastian et al., 2008). Wiadomo jednak, że rozwój i występowanie niektórych zachowań w czasie dojrzewania jest nieliniowy (Lin & Wilbrecht, 2021). Ludzie (i gryznie) w środku dojrzewania zachowują się inaczej niż na początku dojrzewania oraz na jego końcu czy w dorosłości (Larson & Richards, 1991). Częste przebywanie wśród rodziny (u ludzi), występuje na początku i końcu dojrzewania. U gryzoni, podobną zależność obserwuje się w przypadku testu preferencji miejsca warunkowanej kontekstem społecznym (z ang. social conditioned place preference, SCPP, (Harda et al., 2023; Misiółek et al., 2023)). Badane zwierzę warunkuje się do kontekstu izolacji oraz kontekstu społecznego, po czym bada się czas spędzony w każdym z kontekstów. W tym przypadku preferencja przebywania w kontekście społecznym występuje również na początku i końcu dojrzewania. Jednakże oba te zjawiska, zarówno u ludzi jak i u gryzoni, zmniejszają swoją intensywność w środkowym etapie adolescencji (Foulkes & Blakemore, 2016; Harda et al., 2023; Larson & Richards, 1991; Misiółek et al., 2023). Neuronalne podłoże tych nieliniowych zmian nie jest dobrze poznane.

W niniejszej pracy dyplomowej podjęto analizę dynamiki zmian w układzie GABAergicznym w korze mózgu podczas dojrzewania. W celu właściwej interpretacji wyników oraz zidentyfikowania zależności, które mogą mieć potencjalne zastosowanie

w badaniach nad ludźmi, konieczne było powiązanie wieku postnatalnego zwierząt doświadczalnych z odpowiadającymi im etapami rozwoju człowieka. U zwierząt, początek dojrzewania można wyraźnie zidentyfikować na podstawie zmian w poziomie hormonów, początku rui lub pojawienia się dojrzałych plemników w jądrach. U myszy adolescencja trwa od 28 do około 60 dnia życia u samic, od 30 do około 60 dnia życia u samców; u ludzi między 10 a 21 rokiem życia u dziewczynek oraz 11-21 rokiem życia u chłopców (Bell, 2018). Mimo tego, że znane są dokładne ramy czasowe odnoszące okres dojrzewania człowieka do etapu rozwojowego u gryzoni, aktualna wiedza na temat zmian w układzie GABAergicznym podczas okresu dojrzewania jest uboga. Istnieją badania, które porównują układ GABAergiczny zwierząt podczas adolescencji z dorosłymi osobnikami. Jednakże zmiany zachodzące pomiędzy różnymi etapami dojrzewania (wczesnym, średnim i późnym) nie są dokładnie zbadane.

Piekarski i współpracownicy zwrócili niedawno uwagę na możliwą kluczową rolę komórek wyrażających PV w regulacji zmian behawioralnych w okresie dojrzewania (Piekarski et al., 2017). Wskazali, że interneurony PV regulują okresy wrażliwości kory zmysłowej podczas wczesnego dzieciństwa a przekaźnictwo hamujące w przedniej korze kojarzeniowej wzrasta podczas dojrzewania. Dodatkowo zauważyli, że w korze mózgowej receptory estrogenowe są zlokalizowane wyłącznie w komórkach wyrażających PV. Oznacza to, że hormony płciowe prawdopodobnie selektywnie regulują funkcję komórek wyrażających PV (Heldring et al., 2007). Wiadomo, że u dojrzałych samic estradiol jest naturalnie występującym hormonem płciowym produkowanym głównie przez jajniki. Jednakże również u samców estradiol może być obecny wskutek przekształcania testosteronu przez aromatazę występującą m.in. w tkance tłuszczowej, mózgu, nadnerczach czy tkance kostnej (Simpson et al., 1994). Ekspresja aromatazy wskazuje na to, że bez względu na płeć estradiol może oddziaływać na receptory estrogenowe zlokalizowane na komórkach wyrażających PV w mózgu (Luo, 2020; Simpson et al., 1994). W badaniach przeprowadzonych na samicach myszy stwierdzono stopniowy wzrost ekspresji PV w hipokampie w okresie dojrzewania, który korelował z poziomem estradiolu w surowicy (Candace et al., 2014). Przeprowadzono także eksperymenty z owarektomią (usunięcie jajników) oraz terapią zastępczą estradiolem. Wykazano wówczas, że zabieg ten prowadzi do obniżenia poziomu PV w hipokampie, a podawanie estradiolu zapobiega temu spadkowi. U samców myszy nie odnotowano istotnych zmian w ekspresji PV w trakcie rozwoju w okresie dojrzewania w hipokampie.

Wskazuje się również na wpływ doświadczeń społecznych występujących podczas dojrzewania na rozwój kory przedczołowej i układu GABAergicznego u ssaków. Wykazano, że izolacja społeczna mająca miejsce na przełomie późnego dzieciństwa a wczesnego etapu dojrzewania płciowego (21-35 dzień życia myszy) ma szkodliwy wpływ na prawidłowe funkcjonowanie kory przedczołowej (PFC) u samców myszy (Bicks et al., 2020). Zidentyfikowano swoisty wzór aktywacji interneuronów PV w grzbietowo-przyśrodkowej PFC (z ang. *dorso-medial prefrontal cortex*, dmPFC) przed aktywną interakcją społeczną. Myszy, które były w okresie dojrzewania poddane izolacji społecznej wykazywały obniżoną aktywację dmPFC–PV co objawiało się nieprawidłowościami behawioralnymi w dorosłości. Myszy te wykazywały znacząco mniejszą aktywną eksplorację otoczenia w porównaniu do myszy, które nie były poddane epizodowi izolacji. Dodatkowo myszy, które były izolowane podczas okresu dojrzewania nie wykazywały obserwowanej u myszy kontrolnych preferencji przebywania w przedziale społecznym w teście trzech komór, co nie jest naturalnie występującym zjawiskiem obserwowanym wśród myszy. Zbadano również wpływ izolacji społecznej u samic myszy podczas późnego dojrzewania i wczesnej dorosłości (50-90 dzień życia; Jeon et al., 2023). Wykazano, że myszy należące do grupy kontrolnej (brak epizodu izolacji) charakteryzowały się zmniejszoną ekspresją komórek PV w lewej OFC w porównaniu do prawej OFC u tych samych myszy. Stwierdzono również, że izolacja społeczna u samic powoduje nadmierną socjalność w okresie dorosłości. Objawiała się ona znacząco dłuższym czasem interakcji nos-nos oraz czasem obwąchiwania nieznannej wcześniej myszy w porównaniu do samic nie izolowanych społecznie w okresie dojrzewania. Co ciekawe, izolacja znacząco zmniejszyła zarówno liczbę aktywowanych neuronów, jak i poziom aktywności myszy podczas obwąchiwania społecznego u samic myszy.

W badaniach nad zmianami w układzie GABAergicznym podczas dojrzewania szczególną uwagę poświęcono liczbie komórek tego układu (PV lub CAL) oraz intensywności ekspresji owych białek. W badaniach Caballero i współpracowników przeprowadzonych na samcach szczurów szczepu Sprague–Dawley zauważono, że poziom białka PV w korze przedczołowej (PFC) jest najniższy u szczurów przed okresem dojrzewania (25-35 dni życia) i wzrasta podczas adolescencji (45-55 dzień życia) do poziomów podobnych do tych obserwowanych u dorosłych (65-75 dzień życia) (Caballero et al., 2014). W przeciwieństwie do tego, ekspresja białka CAL jest zmniejszona u dorosłych w porównaniu do dojrzewających zwierząt. Inne badania wskazały na wzrost ekspresji PV podczas rozwoju w okresie dojrzewania w przyśrodkowym PFC u myszy obu płci (Du et al., 2018). Sprawdzone również

jak zmienia się ekspresja białka CAL. U samców myszy zaobserwowano jej stopniowy spadek wraz z dojrzewaniem osobnika. U samic nie zaobserwowano znamienych zmian w ekspresji białka CAL. Potwierdzili oni, że interneurony PV oraz CAL nadal rozwijają się we wczesnym okresie dojrzewania w przyśrodkowym PFC (Du et al., 2018). Wykazali, że kluczową rolę w tym rozwoju pełni neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego (ang. *brain-derived neurotrophic factor*, BDNF), który wpływa na zmiany w ekspresji komórek należących do układu GABAergicznego, gdyż myszy w przypadku pozbawienia BDNF przestały wykazywać wyżej opisane zmiany ekspresji białek (Du et al., 2018). Zbadano również liczbę komórek wyrażających PV u samic myszy w OFC (Jeon et al., 2023). Badano wówczas 3 punkty wiekowe: etap przed dojrzewaniem płciowym (21 dzień życia), późny etap dojrzewania płciowego (50 dzień życia) oraz etap dorosłości (80 dzień życia). Zauważono, że liczba komórek wyrażających PV w lewej korze oczodołowo-czołowej (OFC) jest znacząco wyższa podczas dorosłości niż w pozostałych etapach. Dla prawego OFC zmiany te nie były tak znaczące, wykryto jednak istotny statystycznie wzrost liczby komórek PV między 21 dniem życia myszy a 80 dniem.

Podsumowując, wykazano, że liczba komórek wyrażających PV rośnie (u szczurów i myszy) a CAL maleje podczas dojrzewania płciowego (u szczurów) w PFC (Caballero et al., 2014; Du et al., 2018). Wykazano także, że liczba komórek PV w lewej korze OFC rośnie u samic myszy pomiędzy okresem dojrzewania a okresem dorosłości (Du et al., 2018). Nie przeprowadzono natomiast badań, które pokazywałyby, jakie zmiany w liczbie komórek PV i CAL występują w czasie dojrzewania w OFC u samców myszy. Brak również danych na temat zmian w komórkach CAL u samic, zarówno w OFC jak i PFC. Dlatego w niniejszej pracy postanowiono zbadać zmiany w liczbie komórek PV i CAL u obu płci, w obu omawianych strukturach mózgu (PFC i OFC).

Pozostają także niejasności w zakresie zmian zachodzących między początkowym a końcowym okresem dojrzewania. W cytowanych pracach najczęściej badano jeden moment podczas dojrzewania. Nie zbadano potencjalnych różnic pomiędzy wczesnym, środkowym a późnym etapem dojrzewania. Wiadomo, że zmiany behawioralne i hormonalne zachodzące w organizmie w okresie dojrzewania są dynamiczne i często mają skomplikowany przebieg (Bell, 2018; Harda et al., 2023; Larson & Richards, 1991; Lin & Wilbrecht, 2021). Dodatkowo wiemy, że rozwój mózgu w okresie dojrzewania przebiega inaczej w zależności od płci. Dlatego w niniejszej pracy zbadano liczbę komórek PV i CAL w czterech punktach wiekowych (wczesny, środkowy i późny etap dojrzewania oraz dorosłość) u myszy obu płci.

2. Cel i założenia pracy

Celem niniejszej pracy dyplomowej było zbadanie zmian liczby komórek układu GABAergicznego zachodzących w czasie dojrzewania u myszy obu płci. Uznano za celowe zbadanie dwóch typów komórek hamujących: komórek wyrażających PV lub CAL. Skupiono się na dwóch obszarach mózgu: OFC oraz PFC. Przebadano myszy z zachowaniem rozdzielczości czasowej pozwalającej wykryć zmiany strukturalne w korze mózgowej występujące w czasie dojrzewania.

3. Materiały i metody

3.1 Zwierzęta doświadczalne

W badaniach wykorzystano myszy C57BL/6 (n=63) pochodzące z hodowli Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk w Krakowie. Zwierzęta odstawiano od matki w wieku 27-28 dni. Po odstawieniu trzymano myszy w grupach rodzeństwa tej samej płci, po 2-3 osobniki na klatkę, z wolnym dostępem do pokarmu (Labofeed H, WPiK) oraz wody. W zwierzętarni utrzymywano stałe warunki oświetlenia (cykl 12 godz. Światło/ciemność, 7:00-19:00) i temperatury (22 ± 2 °C). Myszy zostały podzielone na 4 grupy wiekowe obejmujące wczesny (około 32 dni), środkowy (38 dni) i późny (43 dni) okres dojrzewania płciowego oraz okres dorosłości (72 dni) (Bell, 2018). Szczegółowy wykaz zwierząt wykorzystanych w badaniu przedstawiono w Tabeli 1. Wszystkie doświadczenia były wykonywane zgodnie z obowiązującymi przepisami w zakresie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych.

Tabela 1 - Wykaz zwierząt wykorzystanych do badań z podziałem na płeć

Płeć	Grupa wiekowa [dni]	Liczba osobników	Wiek osobnika [dni]			Waga osobnika [g]		Waga jąder [mg]	
			Przedział	Średnia	Błąd standardowy średniej	Średnia	Błąd standardowy średniej	Średnia	Błąd standardowy średniej
Samce	≈32	7	33-34	33,3	0,19	16,67	0,60	106,23	4,98
	≈38	9	35-40	37,6	0,58	18,76	0,52	125,46	5,19
	≈43	6	42-43	42,7	0,21	19,92	0,34	134,23	5,34
	≈72	7	70-74	72	0,72	25,73	0,77	179,8	2,91
Samice	≈32	7	31-33	32,4	0,34	13,94	0,59	b.d.	b.d.
	≈38	13	35-39	36,8	0,43	15,88	0,44	b.d.	b.d.
	≈43	7	42-44	43,1	0,34	16,54	0,56	b.d.	b.d.
	≈72	7	70-75	71,9	0,83	19,67	0,52	b.d.	b.d.

3.2 Barwienie immunofluorescencyjne

Myszy uśmiercono dootrzewnowym zastrzykiem letalnej dawki mieszanki pentobarbitalu sodu (133,3mg/ml) i pentobarbitalu (26,7 mg/ml; nazwa handlowa Morbital, producent Biowet Puławy), używając 100 ml roztworu na mysz. Następnie wykonano perfuzję, początkowo buforowanym fizjologicznym roztworem soli (PBS, skład: NaCl – 1,37 M, KCl – 27mM, Na₂HPO₄ – 100 mM, KH₂PO₄ – 20mM; Serva, pH 7,4, 50 ml), a następnie 4% (wag./obj.) roztworem paraformaldehydu, (Carl Roth, 50 ml). Roztwory były schłodzone do temperatury 4°C. Wyizolowane mózgi dodatkowo utrwalono w 4% roztworze paraformaldehydu w temperaturze 4°C przez 24 godziny. Następnie mózgi przełożono do roztworu krioprotekcyjnego 1 (30% (wag./obj.) sacharoza, 0.01% NaN₃ w PBS) i trzymano w nim aż do opadnięcia na dno naczynia w 4°C. Po tym czasie mózgi pokrojono na kriostacie (CM3050 S, Leica, temperatura komory: -20°C, temperatura preparatu: -10°C) w płaszczyźnie czołowej na skrawki o grubości 50 µm. Skrawki przechowywano w temperaturze -20°C w roztworze krioprotekcyjnym 2 (15% sacharoza (wag./obj.), 30% glikol etylenowy (obj./obj.), 0,05% (wag./obj.) NaN₃ w PBS).

Do barwienia wybrano co czwarty skrawek (łącznie 8 skrawków) z badanego fragmentu mózgu (Bregma 2,34 mm – 0,38 mm). Przed barwieniem skrawki wypłukano w 5,5 ml PBS (3x6 min.). Następnie, w celu zablokowania niespecyficznego wiązania przeciwciał, skrawki inkubowano w 5,5 ml 5% roztworu surowicy koziej (z ang. *normal goat serum*, NGS)

przez 30 minut (5% NGS, 0,1% TX-100 w PBS). Po blokowaniu skrawki wyplukano w 5,5 ml PBS (3x6 min.). Następnie skrawki inkubowano przez noc ze swoistymi przeciwciałami pierwszorzędowymi (rozcieńczenie przeciwciała 1:1000) wiążącymi się do białek PV, CAL i GAD67 w roztworze takim samym jak roztwór użyty do inkubacji z NGS. Szczegółowy spis przeciwciał użytych do procedury znajduje się w Tabeli 2.

Tabela 2 - Spis przeciwciał użytych do barwienia immunofluorescencyjnego

Przeciwciała pierwszorzędowe				
Nazwa przeciwciała	Gatunek gospodarza	Producent	Nr katalogowy	Stężenie
Anty-CR	kawia domowa	SWANT	CRgp7	1:1000
Anty-PV	królik	SWANT	PV27	1:1000
Anty-GAD67	mysz	Merck Sigma- Aldrich	MAB5406	1:1000
Przeciwciała drugorzędowe				
Nazwa przeciwciała	Fluorochrom	Producent	Nr katalogowy	Stężenie
Anty-kawiove	Alexa Fluor 647	Invitrogen	2446026	1:500
Anty-królicze	Alexa Fluor 488	Invitrogen	2420731	1:500
Anty-mysie	Alexa Fluor 555	Invitrogen	2418520	1:500

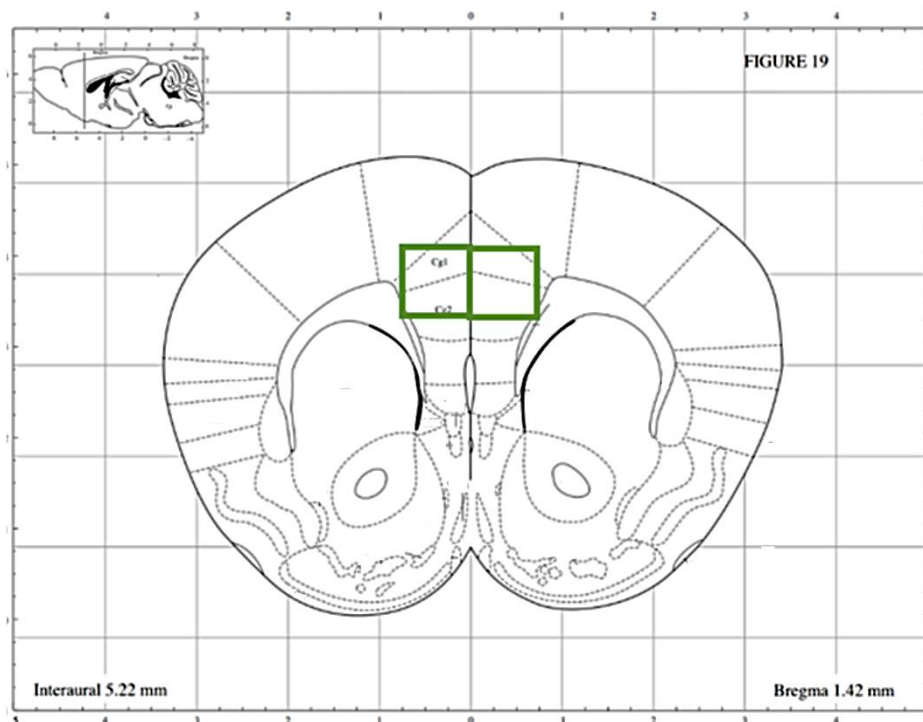
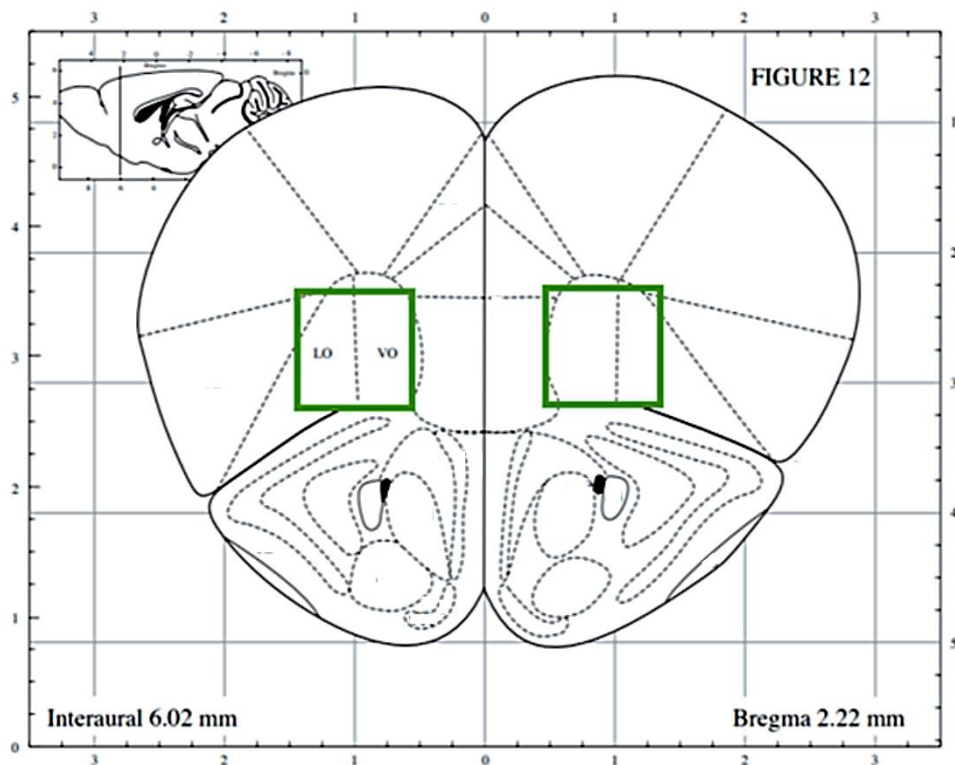
Po upływie nocy skrawki wyplukano w 5,5 ml PBS (3x6 min.), a następnie inkubowano z przeciwciałami drugorzędowymi (w roztworze o rozcieńczeniu przeciwciała 1:500 w 1 ml PBS) przez 2 godziny. Skrawki ponownie wyplukano w 5,5 ml PBS (3x6 min.), nałożono na szkiełka podstawowe (Menzel Gläser, SuperFrost® Plus, producent Thermo Scientific) przy pomocy pędzelka i przykryto medium (ProLong Glass Antifade Mountant, Invitrogen). Wszystkie opisane wyżej procedury przeprowadzano w temperaturze pokojowej a spis przeciwciał użytych do procedur zawarto w Tabeli 2.

Barwienia immunofluorescencyjne zostały podzielone na trzy tury, z których każda zawierała równe proporcje myszy z poszczególnych grup wiekowych. W turze pierwszej zostały poddane barwieniu tylko samice (10 zwierząt), w drugiej samce (15 zwierząt), w trzeciej obie płcie (38 zwierząt).

3.3 Obrazowanie mikroskopowe

Obrazowanie przeprowadzono z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego Leica TCS SP8 WLL; obiektyw HC PL APO CS2 20x/0.75 DRY, przy użyciu oprogramowania Leica Application Suite X (wersja 3.5.7.23225). Częstotliwość skanowana obrazu 400 Hz, dwukierunkowa w osi X; uśrednianie liniowe sygnału:3; powiększanie cyfrowe 1. Cyfrowy format obrazu wynosił 2048x2048 piksela i fizycznej wielkości piksela 284x284 nm.

W celu wzbudzenia fluoroforów użyto światła laserowego o długości fali 499 nm (Alexa Fluor 488), 553 nm (Alexa Fluor 555) oraz 653 nm (Alexa Fluor 647). Zdjęcia mikroskopowe rejestrowano sekwencyjnie: Alexa Fluor 488 i Alexa Fluor 647 w sekwencji pierwszej, Alexa Fluor 555 w sekwencji drugiej, aby uniknąć efektu naciekania kanałów emisji fluorescencji. Do detekcji sygnału użyto trzech spektralnych detektorów hybrydowych (HyD) w zakresach 470-476 nm (Alexa Fluor 488), 507-566 nm (Alexa Fluor 555) oraz 664-700 nm (Alexa Fluor 647). Obrazy mikroskopowe OFC (Bregma 2,34mm – 1,98mm) oraz PFC (Bregma 2,10mm – 0,38mm) wykonywano w najlepszej płaszczyźnie ostrości w osi Z. Do ustalenia miejsc obrazowania posłużono się atlasem mózgu mysiego Paxinosa (Paxinos & Franklin, 2001). Schemat miejsc obrazowania zostały przedstawione na Rycinie 1.



Rycina 1 - Przykładowy obszar obrazowania

A. – Obszar kory orbitofrontalnej (OFC): LO – boczna kora oczodołowa, ang. lateral orbital cortex; VO – brzuszna kora oczodołowa, ang. ventral orbital cortex; B. – Obszar kory przedczołowej (PFC): Cg1 – kora zakrętu obręczy, obszar 1, ang. cingulate cortex, area 1; Cg2 – kora zakrętu obręczy, obszar 2, ang. cingulate cortex, area 2; Zielone kwadraty obrazują miejsca wykonywania zdjęć mikroskopowych. Rycina zawiera obrazy z atlasu mózgu myszy Paxinosa (Paxinos & Franklin, 2001)

3.4 Analiza obrazów mikroskopowych

Do przeprowadzenia automatycznej analizy liczby komórek wykorzystano skrypt napisany w programie FIJI (Fiji Is Just ImageJ, 1.53t; Wayne Rasband and contributors, National Institutes of Health, USA Schindelin et al., 2019). Obrazy mikroskopowe poddano automatycznej korekcji jasności oraz kontrastu. Do detekcji oraz liczenia komórek użyto funkcji *Analyze particles*. Komórkę zdefiniowano jako obiekt o owalności w przedziale 0.00 – 1.00 oraz o wielkości odpowiednio: 25-700 μm dla PV, 45-500 μm dla CAL, oraz 50-500 μm dla GAD67. Kanał 3, zawierający komórki wyrażające GAD67 nie został uwzględniony w dalszych analizach. Jednakże warto wspomnieć, że wstępna analiza wykonana przez eksperymentatora wykazała, że zarówno komórki PV jak i CAL kolokalizują z GAD67. Skrypt dostępny jest na platformie GitHub (https://github.com/ch0lina/Changes-in-the-GABAergic-system-in-the-frontal-cortex-in-female-and-male-mice-during-adolescence/blob/a96795cbca8427b8756a7a62086ff339abc7494a/FIJI_script).

3.5 Analiza statystyczna

Pierwszy etap analizy danych wykonano przy użyciu skryptu w R (R Statistical Software, wersja 4.2.1, https://github.com/ch0lina/Changes-in-the-GABAergic-system-in-the-frontal-cortex-in-female-and-male-mice-during-adolescence/blob/88395b41f865a9bef04f854b28960cce812f1a75/R_script), którego autorami są prof. dr hab. Jan Manuel Rodriguez Parkitna oraz dr Małgorzata Boreczyk. Liczbę komórek widocznych na jednym zdjęciu mikroskopowym poddano normalizacji z względu na obszar analizowany. Podczas przygotowywania preparatów część skrawków uległa uszkodzeniu przez co koniecznym było dostosowanie obszaru poddawanego dalszym analizom tak, aby nie obejmował on miejsc uszkodzonych (z ang. *region of interest*; ROI, liczba zdjęć poddanych normalizacji – 792 na 3324, tj. 24%, pozostałe zdjęcia analizowano w całości). Następnie wykonano test na wartości odstające na poziomie zdjęć w grupach myszy z tej samej płci, grupy wiekowej oraz tury barwienia (iteracyjny test Grubbsa, kryterium iteracji ustalono jako $p > 0,05$). Wartości odstające wykluczono z dalszych etapów analizy (15 zdjęć samic, 2 zdjęcia samców; łącznie 17). Wykonano test Shapiro-Wilka oraz test Levene'a. Niniejsze testy przeprowadzono ponieważ ANOVA jest testem wymagającym założenia normalności rozkładu i homogenności wariancji. Założenia te zostały spełnione w związku z czym analizę

statystyczną przeprowadzono za pomocą analizy wariancji i testu Tukey'a post hoc. Dla wszystkich testów jako próg znamienności przyjęto $p < 0.05$. Jednoczynnikowa analiza wariancji w większości zmiennych wykazała istotny wpływ tury barwienia. Szczegółowe wyniki analizy przedstawione zostały w Tabeli 3. Z tego powodu postanowiono znormalizować wszystkie wyniki zwierząt pierwszej oraz drugiej tury barwienia względem trzeciej tury barwienia mnożąc je przez iloraz między średnią liczbą komórek odpowiednich tur barwień przyjmując trzecią turę barwienia jako punkt odniesienia.

Tabela 3 - Analiza wariancji wpływu tury barwienia

Płeć	Struktura	Białko	Wartość F	Wartość p	Normalizowana tura barwienia	Iloraz użyty do normalizacji
Samice	OFC	PV	1,2524	0,2742	1	0,8425
	PFC	PV	1,4658	0,2369	1	1,1331
	OFC	CAL	5,3384	0,0298¹	1	0,7456
	PFC	CAL	11,3237	0,0024	1	0,7695
	OFC	GAD67	6,0715	0,0213	1	1,4579
	PFC	GAD67	5,6482	0,0251	1	1,4362
Samce	OFC	PV	11,7162	0,0029	2	1,4290
	PFC	PV	8,1657	0,0094	2	1,2001
	OFC	CAL	0,8754	0,3612	2	1,1185
	PFC	CAL	7,2991	0,0134	2	1,2245
	OFC	GAD67	0,6404	0,4335	2	1,1061
	PFC	GAD67	0,5097	0,4831	2	0,9142

¹Pogrubione wartości w tabeli są istotne statystycznie ($p < 0,05$).

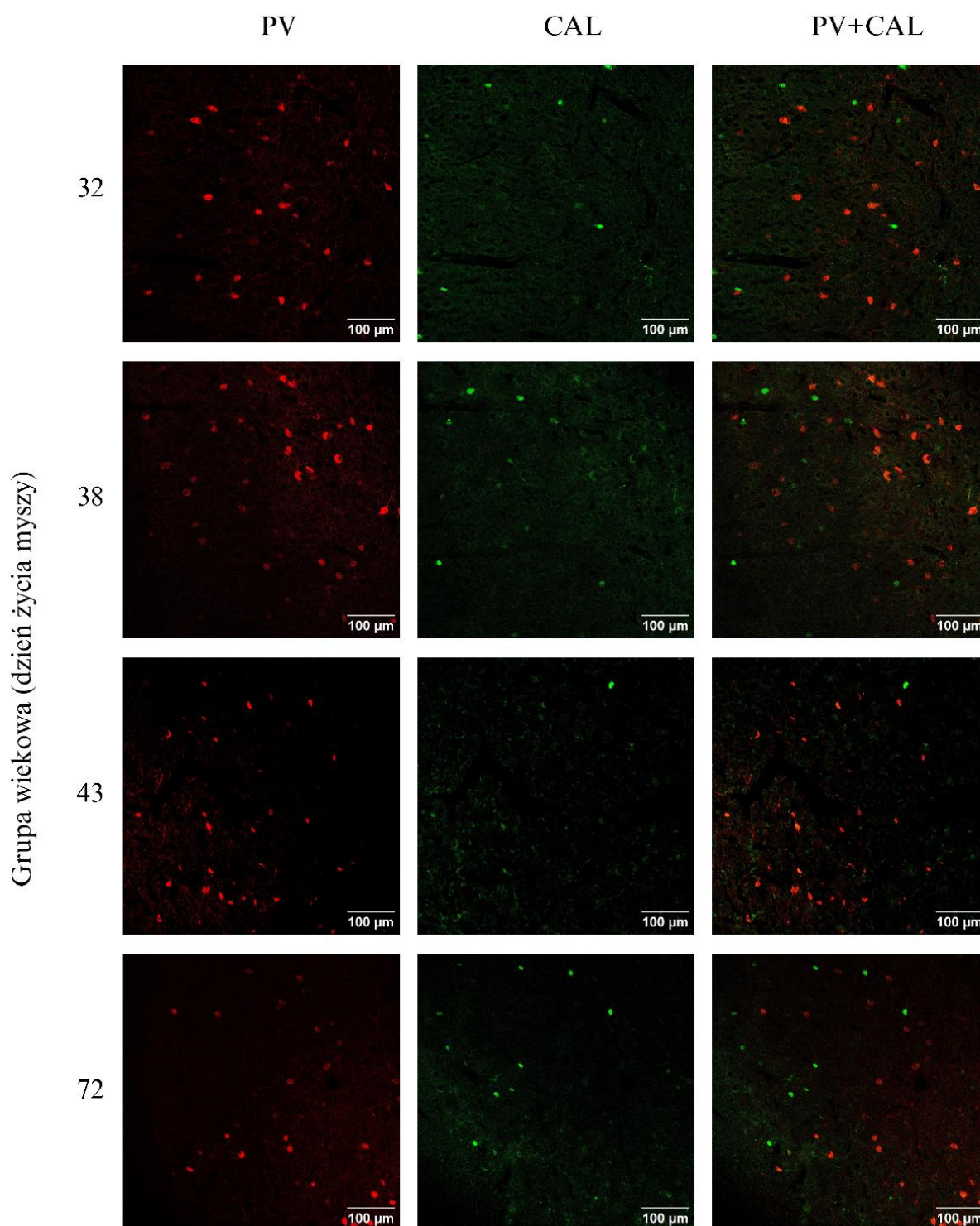
Kolejne etapy analizy statystycznej zostały wykonane w programie GraphPad Prism 10.2.3. Zidentyfikowano osobniki odstające za pomocą testu Grubbsa (wykryto 3 wartości dla samic, 2 dla samców). Wartości te zostały wykluczone z dalszych analiz. Następnie, w celu zbadania wpływu wieku na liczbę komórek przeprowadzono jednoczynnikową analizę wariancji oraz *post-hoc* test Tukey'a dla przypadków gdzie jednoczynnikowa analiza wariancji wykazała istotność statystyczną. We wszystkich analizach jako kryterium istotności statystycznej przyjęto $p < 0,05$.

4. Wyniki

4.1 Procedura wyboru optymalnych ustawień w programie Fiji

Podczas badania wykorzystano łącznie 63 zwierzęta. Podczas analizy mikroskopowej skrawków mózgu zwierząt wygenerowano łącznie 3324 zdjęć. Poniżej, na Rycinie 2 (PFC) oraz Rycinie 3 (OFC) przedstawiono przykładowe zdjęcia pochodzące ze skrawków mózgu zwierząt należących do każdej grupy wiekowej. Obrazy w dwóch pierwszych kolumnach przedstawiają jeden kanał zdjęcia (PV lub CAL), obrazy zamieszczone w ostatniej kolumnie przedstawiają połączenie obu tych kanałów (PV + CAL). Zdjęcia z obu struktur mózgowych z tej samej grupy wiekowej pochodzą od tego samego zwierzęcia.

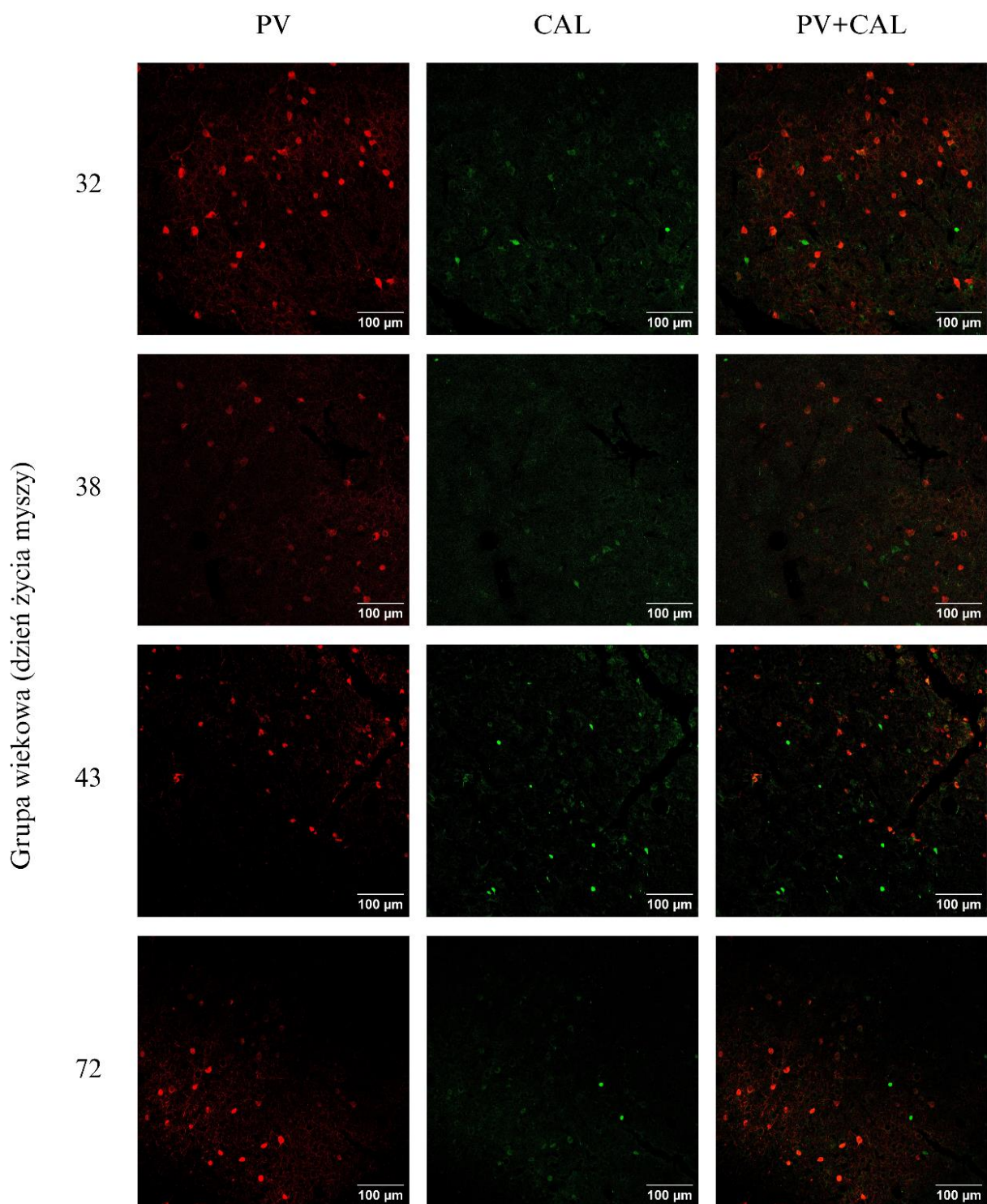
Struktura mózgu - PFC



Rycina 2 - Przykładowe zdjęcia poddane analizie liczby komórek wyrażających PV lub CAL pochodzące z PFC.

Na rycinie przedstawiono zdjęcia zawierające komórki wyrażające PV (po lewej), komórki wyrażające CAL (na środku) oraz połączenia obu zdjęć razem (po prawej, PV+CAL). Zdjęcia pochodzą od myszy z każdej grupy wiekowej (grupa 1 – 32 dzień życia, grupa 2 – 38 dzień życia, grupa 3 – 43 dzień życia, grupa 4 – 72 dzień życia). Na zdjęciach widoczny jest brak kolokalizacji między oboma typami komórek. Skala umieszczona na zdjęciach pokazuje odległość 100 μm .

Struktura mózgu - OFC



Grupa wiekowa (dzień życia myszy)

Rycina 3 - Przykładowe zdjęcia poddane analizie liczby komórek wyrażających PV lub CAL pochodzące z OFC.

Na rycinie przedstawiono zdjęcia zawierające komórki wyrażające PV (po lewej), komórki wyrażające CAL (na środku) oraz połączenia obu zdjęć razem (po prawej, PV+CAL). Zdjęcia pochodzą od myszy z każdej grupy wiekowej (grupa 1 – 32 dzień życia, grupa 2 – 38 dzień życia, grupa 3 – 43 dzień życia, grupa 4 – 72 dzień życia). Na zdjęciach widoczny jest brak kolokalizacji między oboma typami komórek. Skala umieszczona na zdjęciach pokazuje odległość 100 μm .

Z powodu dużej liczby danych postanowiono, że do analizy liczby komórek wyrażających PV lub CAL konieczne jest napisanie oraz użycie autorskiego skryptu w programie Fiji. W celu ustalenia optymalnych ustawień wykorzystywanych do analizy liczby komórek wyrażających PV lub CAL wybrano treningowy zbiór zdjęć po 14 zwierząt spośród każdej tury barwienia (w przypadku trzeciej tury barwienia obejmującej obie płcie wybrano 7 samic i 7 samców). Następnie wybrano po 7 zdjęć mikroskopowych z dwóch struktur: OFC oraz PFC. Każde zdjęcie pochodziło od innego zwierzęcia. W tak utworzonym zbiorze treningowym ręcznie dostosowano poziom kontrastu, jasności, punktu odcięcia oraz zakresu wielkości komórki do każdego ze zdjęć indywidualnie. Następnie policzono liczby komórek wyrażających PV lub CAL przy użyciu funkcji *Analyze Particles*. Wyniki analizy liczby komórek zliczonych przez eksperymentatora zostały przedstawione w aneksie (Tabela 12 oraz Tabela 13).

Uśrednione wartości kontrastu, jasności, punktu odcięcia oraz zakresu wielkości komórki pochodzące z manualnej analizy każdego ze zdjęć ze zbioru treningowego zaimplementowano w skrypcie Fiji. Parametry te zostały zamieszczone w Tabeli 4 oraz Tabeli 5.

Tabela 4 - Średnie wartości ustawień dla zbioru treningowego (PV)

Tura barwienia	Jasność PV	Odchylenie standardowe [Jasność PV]	Kontrast PV	Odchylenie standardowe [Kontrast PV]	Punkt odcięcia X PV	Odchylenie standardowe [Punkt odcięcia X PV]	Punkt odcięcia Y PV	Odchylenie standardowe [Punkt odcięcia Y PV]	Rozmiar komórki PV
1	21,86	12,17	91,36	35,08	117,86	10,72	252,86	7,73	20-700
2	27,14	10,76	103,36	38,24	142,93	35,72	255,00	0,00	25-700
3	49,21	29,22	121,14	38,33	182,50	54,05	255,00	0,00	25-700

Tabela 5 - Średnie wartości ustawień dla zbioru treningowego (CAL)

Tura barwienia	Jasność CAL	Odchylenie standardowe [Jasność CAL]	Kontrast CAL	Odchylenie standardowe [Kontrast CAL]	Punkt odcięcia X CAL	Odchylenie standardowe [Punkt odcięcia X CAL]	Punkt odcięcia Y CAL	Odchylenie standardowe [Punkt odcięcia Y CAL]	Rozmiar komórki CAL
1	48,79	18,56	138,71	27,08	123,36	10,26	255,00	0,00	35-500
2	25,93	7,34	103,00	18,63	110,21	18,49	255,00	0,00	45-500
3	51,86	30,52	118,07	41,20	167,86	49,49	255,00	0,00	45-500

Zauważono, że średnie wartości jasności, kontrastu, punktu odcięcia (X; Y) oraz zakresu wielkości komórki różniły się zarówno między turami barwienia jak i między kanałami (wartości dla komórek wyrażających PV były inne niż wartości dla komórek wyrażających CAL). Z tego powodu w skrypcie przyjęto różne wartości optymalne dla każdej tury barwienia oraz każdego kanałów. Parametry użyte w analizie 1 zostały zamieszczone w Tabeli 6 oraz Tabeli 7.

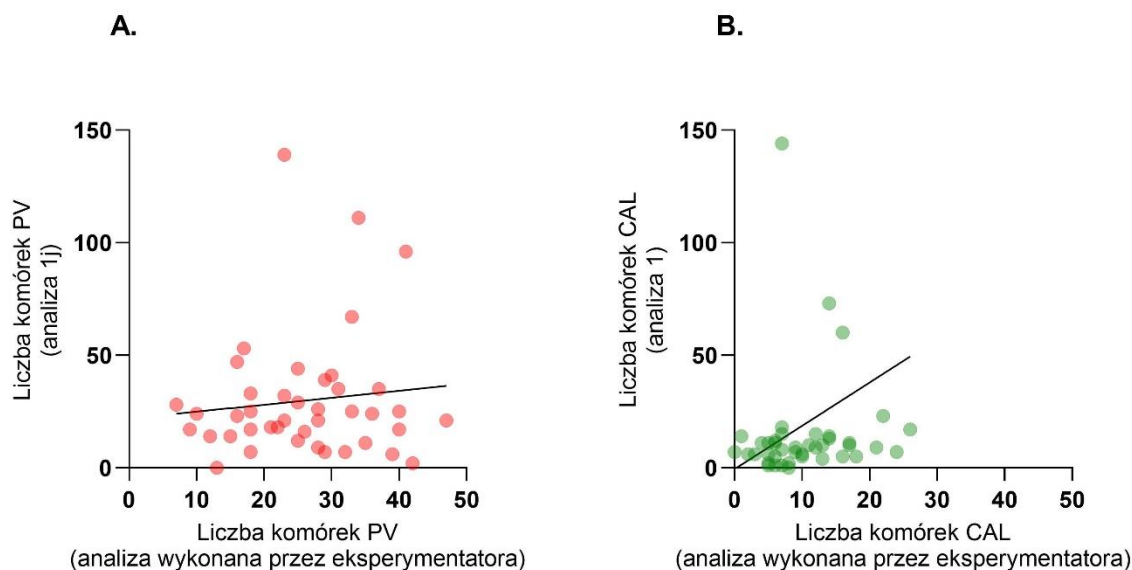
Tabela 6 - Parametry w analizie 1 (PV)

Tura barwienia	Jasność PV	Kontrast PV	Punkt odcięcia X PV	Punkt odcięcia Y PV	Rozmiar komórki PV
1	22	91	118	253	20-700
2	27	103	143	255	25-700
3	49	121	183	255	25-700

Tabela 7 - Parametry w analizie 1 (CAL)

Tura barwienia	Jasność CAL	Kontrast CAL	Punkt odcięcia X CAL	Punkt odcięcia Y CAL	Rozmiar komórki CAL
1	49	139	123	255	35-500
2	26	103	110	255	45-500
3	52	118	168	255	45-500

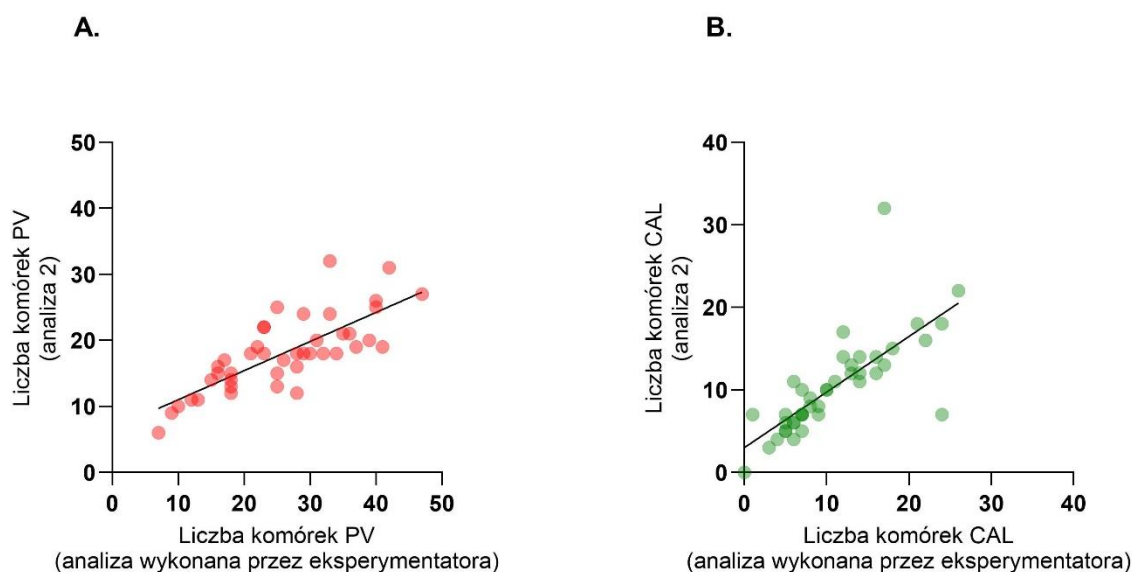
Postanowiono zweryfikować podobieństwo wyników powstałych podczas liczenia komórek przez eksperymentatora a liczenia komórek za pomocą skryptu podczas analizy 1. W tym celu wykonano analizę korelacji. Wyniki analizy zostały przedstawione na Rycinie 4. Współczynnik korelacji między analizami wynosił: w przypadku PV: $R^2 = 0,012$ ($p = 0,4899$); w przypadku CAL: $R^2 = 0,09237$ ($p = 0,0504$).



Rycina 4 - Analiza korelacji między liczbą komórek wyrażających PV lub CAL uzyskanych drogą analizy wykonanej przez eksperymentatora a liczbą komórek wyrażających PV lub CAL generowanych podczas analizy 1 (zbiór treningowy).

A. Analiza korelacji liczby komórek wyrażających PV; na osi X – liczba komórek PV policzonych przez eksperymentatora, na osi Y – liczba komórek PV policzona w analizie 1; czerwone kropki pokazują liczbę komórek dla pojedynczego zdjęcia; czarna linia jest linią regresji, $R^2 = 0,012$, ($p = 0,4899$); B. Analiza korelacji liczby komórek wyrażających CAL: na osi X – liczba komórek CAL policzonych przez eksperymentatora, na osi Y – liczba komórek CAL policzona w analizie 1; zielone kropki pokazują liczbę komórek dla pojedynczego zdjęcia; czarna linia jest linią regresji, $R^2 = 0,09237$ ($p = 0,0504$).

Analizy korelacji wykazała znikomą zgodność między analizą wykonaną przez eksperymentatora a analizą 1 (PV: $R^2 = 0,012$; CAL: $R^2 = 0,09237$). Z tego powodu postanowiono sprawdzić czy dodanie do skryptu automatycznego sposobu wybierania wartości jasności oraz kontrastu dla każdego ze zdjęć oddzielnie poprawi dokładność jego działania (analiza 2). Dzięki temu możliwe było użycie tych samych ustawień do całego zbioru zdjęć bez względu na turę barwienia, z którego dane zdjęcie pochodziło. Parametry punktów odcięcia wykorzystane do przeprowadzenia analizy przy użyciu skryptu automatycznie dostosowującego jasność oraz kontrast do każdego ze zdjęć oddzielnie (PV: X = 148; Y = 255; CAL: X = 161; Y = 255) oraz wielkości komórki (PV: 25 - 700; CAL: 45 - 500) oparte były na średnich wartościach ustawień analizy przeprowadzonej przez eksperymentatora. Wyniki liczby komórek wyrażających PV lub CAL uzyskane przy użyciu skryptu podczas analizy 2 oraz liczby komórek wyrażających PV lub CAL policzonych przez eksperymentatora zostały poddane analizie korelacji (Rycina 5). Współczynnik korelacji między analizami wynosił: w przypadku PV: $R^2 = 0,5966$; w przypadku CAL: $R^2 = 0,5602$.

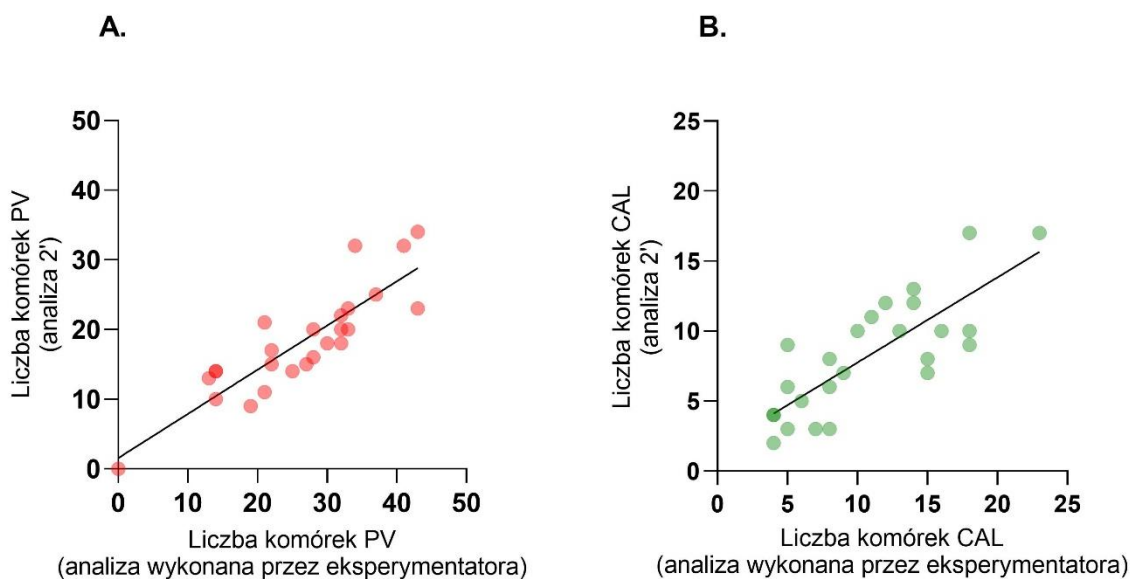


Rycina 5 – Analiza korelacji między liczbą komórek wyrażających PV oraz CAL uzyskanych drogą analizy wykonanej przez eksperymentatora a liczbą komórek wyrażających PV oraz CAL generowanych podczas analizy 2 (zbiór treningowy).

A. Analiza korelacji liczby komórek wyrażających PV; na osi X – liczba komórek PV policzonych przez eksperymentatora, na osi Y – liczba komórek PV policzona w analizie 1; czerwone kropki pokazują liczbę komórek dla pojedynczego zdjęcia; czarna linia jest linią regresji, $R^2 = 0,5966$, ($p < 0,0001$); B. Analiza korelacji liczby komórek wyrażających CAL; na osi X – liczba komórek CAL policzonych przez eksperymentatora, na osi Y – liczba komórek CAL policzona w analizie 1; zielone kropki pokazują liczbę komórek dla pojedynczego zdjęcia; czarna linia jest linią regresji, $R^2 = 0,5602$, ($p < 0,0001$).

Zauważono, że korelacja wyników analizy 2 z wynikami analizy manualnej jest znacznie silniejsza niż w przypadku analizy 1 (analiza 2: PV: $R^2 = 0,5966$, CAL: $R^2 = 0,5602$). Z tego powodu do dalszych analiz postanowiono wykorzystać skrypt liczący komórki wyrażające PV lub CAL poprzez automatyczne dostosowanie jasności oraz kontrastu do każdego ze zdjęć oddzielnie.

Następnym etapem mającym na celu ostateczną weryfikację prawidłowego działania skryptu użytego do analizy 2 było utworzenie drugiego, testowego zbioru zdjęć. W sposób analogiczny do tworzenia zbioru treningowego wybrano po 14 zwierząt spośród każdej tury barwienia (innych niż te zawarte w zbiorze treningowym). Następnie wybrano po 7 zdjęć mikroskopowych dwóch struktur: OFC oraz PFC. Zadbano o to, aby każde zdjęcie pochodziło od innego zwierzęcia. Porównano liczby komórek wyrażających PV lub CAL uzyskane na drodze analizy manualnej z wynikami wygenerowanymi z wykorzystaniem skryptu użytego w analizie 2 (automatyczne parametry jasności i kontrastu, analiza 2'). W celu weryfikacji poprawności skryptu na zbiorze testowym wykonano analizę korelacji (Rycina 6). Współczynnik korelacji między analizami wynosił: w przypadku PV: $R^2 = 0,7552$ ($p < 0,0001$); w przypadku CAL: $R^2 = 0,6341$ ($p < 0,0001$).



Rycina 6 - Analiza korelacji między liczbą komórek wyrażających PV oraz CAL uzyskanych drogą analizy wykonanej przez eksperymentatora a liczbą komórek wyrażających PV oraz CAL generowanych podczas analizy 2' zbior testowy).

A. Analiza korelacji liczby komórek wyrażających PV; na osi X – liczba komórek PV policzonych przez eksperymentatora, na osi Y – liczba komórek PV policzona w analizie 1; czerwone kropki pokazują liczbę komórek dla pojedynczego zdjęcia; czarna linia jest linią regresji, $R^2 = 0,7552$, ($p < 0,0001$); B. Analiza korelacji liczby komórek wyrażających CAL: na osi Y – liczba komórek CAL policzona w analizie 1; zielone kropki pokazują liczbę komórek dla pojedynczego zdjęcia; czarna linia jest linią regresji, $R^2 = 0,6341$, ($p < 0,0001$).

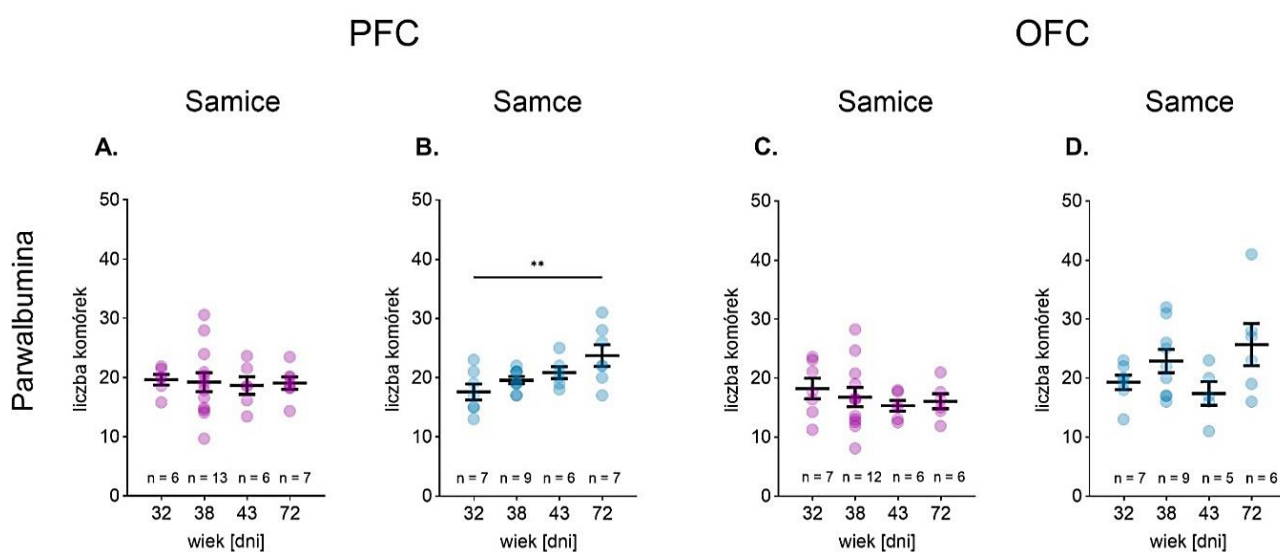
Wyniki analizy korelacji między liczbą komórek wyrażających PV lub CAL uzyskanych drogą analizy wykonanej przez eksperymentatora a liczbą komórek wyrażających PV lub CAL generowanych podczas analizy automatycznej 2' przeprowadzone na zbiorze testowym potwierdziły wystarczającą rzetelność skryptu. Na podstawie wykonanych analiz, ostateczne parametry do automatycznych obliczeń liczby komórek wyrażających PV lub CAL zostały przyjęte jako: PV – wielkość komórki: 25 - 700, punkt odcięcia: 148 - 255; CAL – wielkość komórki: 45 - 500, punkt odcięcia: 161 - 255.

4.2 Zmiany liczby komórek układu GABAergicznego zależne od wieku

W celu uzyskania informacji dotyczącej zmian liczby komórek wyrażających PV lub CAL u samic i samców myszy w czasie dojrzewania przeanalizowano łącznie 3324 zdjęcia. Analizowane zdjęcia pochodziły z dwóch struktur mózgowych: PFC oraz OFC. Średnia liczba zdjęć pochodzących z tej samej struktury u tej samej myszy wynosiła odpowiednio: PFC – 12,03 (SEM = 0.52); OFC – 5,56 (SEM = 0,55). Wszystkie zdjęcia przeanalizowano

przy użyciu skryptu liczącego komórki w Fiji. Wstępną obróbkę danych wykonano za pomocą skryptu w R. Następnie przeprowadzono analizę statystyczną w programie GraphPad Prism 10.2.3. Szczegółowy opis działania skryptów zamieszczony jest w rozdziale Materiały i metody.

U samic nie zaobserwowano związanych z wiekiem znamienych różnic w liczbie komórek PV ani w PFC jak i w OFC (Rycina 7A, C). U samców w PFC wykryto zmiany zachodzące stopniowo wraz z dojrzewaniem myszy (Rycina 7B). W 32 dniu życia średnia liczba komórek wyrażających PV była najniższa, w 72 dniu życia liczba komórek wyrażających PV była najwyższa. Między tymi punktami wiekowymi zaobserwowano znamiennej różnicę (ANOVA: $F_{3,25} = 4,235$, $p = 0,015$, test *post hoc* Tukey'a, grupa 32 vs grupa 72, $p = 0,0082$). W przypadku OFC u samców nie zaobserwowano znamienych różnic pomiędzy grupami wiekowymi (Rycina 7D). Szczegółowe wyniki analizy statystycznej znajdują się w aneksie w Tabeli 8 oraz w Tabeli 10.

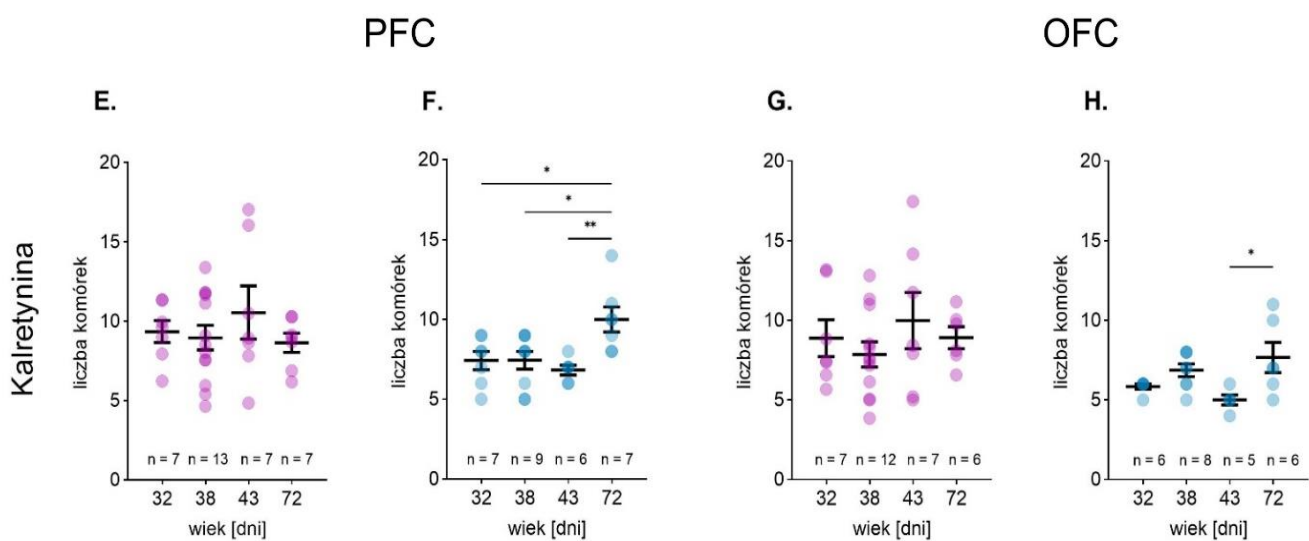


Rycina 7 - Wyniki analizy liczby komórek wyrażających PV u samców i samic myszy w okresie dojrzewania

Na wykresach zaznaczona jest średnia liczba komórek wyrażających PV dla każdej myszy, średnia liczba komórek zwierząt należących do tej samej grupy wiekowej oraz wartość SEM (słupki błędów). Na osi X przedstawiony jest średni wiek zwierząt biorących udział w badaniu w poszczególnych grupach wiekowych. Oś Y przedstawia liczbę komórek PV. Wartość „n” oznacza liczebność każdej z grup. Symbol „*” wskazuje na $p < 0,05$, „**” na $p < 0.01$ w teście Tukey'a. Punkt w kolorze różowym oznaczają liczbę komórek wyrażających PV u pojedynczej samicy, punkt o kolorze niebieskim – liczbę komórek wyrażających PV u pojedynczego samca.

W przypadku komórek wyrażających CAL u samic, podobnie jak w przypadku komórek wyrażających PV, nie zaobserwowano związanych z wiekiem znamienych różnic w liczbie komórek zarówno w PFC jak i w OFC (Rycina 8E,G). Natomiast u samców w PFC

wykryto wzrost liczby komórek wyrażających CAL związany z wiekiem. Liczba komórek wyrażających CAL była wyższa u zwierząt w 72 dniu życia niż we wszystkich pozostałych grupach wiekowych (Rycina 8F; ANOVA: $F_{3,25} = 5,287$, $p = 0,0058$, test *post hoc* Tukey'a, grupa 32 vs grupa 72, $p = 0,0296$, grupa 38 vs grupa 72, $p = 0,0205$, grupa 43 vs grupa 72, $p = 0,0082$). W OFC znamienna różnica występowała między 43 dniem życia a 72 dniem życia (Rycina 8, wykres H; ANOVA: $F_{3,21} = 4,145$, $p = 0,0187$, test *post hoc* Tukey'a, grupa 43 vs grupa 72, $p = 0,0194$). Szczegółowe wyniki analizy statystycznej znajdują się w aneksie w Tabeli 9 oraz Tabeli 11.



Rycina 8 - Wyniki analizy liczby komórek wyrażających CAL u samców i samic myszy w okresie dojrzewania.

Na wykresach zaznaczone jest średnia liczba komórek wyrażających CAL dla każdej myszy, średnia liczba komórek zwierząt należących do tej samej grupy wiekowej oraz wartość SEM (słupki błędów). Na osi X przedstawiony jest średni wiek zwierząt biorących udział w badaniu. Oś Y przedstawia liczbę komórek CAL. Wartość „n” oznacza liczebność każdej z grup. Symbol „*” wskazuje na $p < 0,05$, „**” na $p < 0,01$ w teście Tukey'a. Punkt w kolorze różowym oznaczają liczbę komórek wyrażających CAL u pojedynczej samicy, punkt o kolorze niebieskim – liczba komórek wyrażających CAL u pojedynczego samca.

Podsumowując, u samic nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian w liczbie komórek wyrażających PV lub CAL podczas dojrzewania ani w PFC, ani w OFC. Natomiast u samców w PFC wykryto stopniowy wzrost liczby komórek wyrażających PV, z najniższą liczbą w 32 dniu życia i najwyższą w 72 dniu życia. Zależność ta nie została zaobserwowana dla komórek wyrażających PV w OFC. W przypadku komórek wyrażających CAL, u samców zaobserwowano ich wzrost w dorosłości w każdej z badanych struktur.

5. Dyskusja i wnioski

Celem niniejszej pracy dyplomowej była analiza zmian w liczebności komórek układu GABAergicznego podczas dojrzewania u myszy obu płci. Wyniki badań przeprowadzone w ramach niniejszej pracy dyplomowej dostarczyły nam informacji na temat liczby komórek PV oraz CAL w OFC i PFC w 4 punktach czasowych obejmujących okres od wczesnego dojrzewania aż do dorosłości. Istotnie statystycznie zmiany zaobserwowano u samców. Liczba komórek wyrażających PV w PFC wzrastała stopniowo wraz z dojrzewaniem myszy. W przypadku komórek wyrażających CAL w obu badanych strukturach zaobserwowano ich wzrost w dorosłości. U samic nie zaobserwowano istotnych zmian w liczbie komórek w żadnej z badanych struktur mózgu.

W ramach niniejszej pracy dyplomowej u samców myszy wykryto zachodzący stopniowo wzrost liczby komórek wyrażających PV w PFC. Pokrywa się to z danymi literaturowymi pochodzącymi z badań przeprowadzonych zarówno na myszach (Du et al., 2018) jak i szczurach (Caballero et al., 2014). Fakt ten pozwala twierdzić, że rozwój komórek wyrażających PV u samców szczurów oraz myszy przebiega podobnie i jest porównywalny między gatunkami. Jednakże, nie zauważono znamienych różnic w liczbie komórek wyrażających PV u samic w żadnej z badanych struktur. Jest to wynik inny niż ten pochodzący z badań Du i współpracowników, którzy zaobserwowali wzrost liczby tych komórek w PFC (Du et al., 2018). Należy zauważyć, że w badaniach Du i współpracowników, w porównaniu do opisywanych w niniejszej pracy badań, wystąpiły istotne różnice metodologiczne, w tym odmienna grubość skrawków oraz metoda obrazowania. W naszych badaniach grubość skrawka wynosiła 50 μm gdzie u Du i współpracowników wynosiła 20 μm , a obrazy mikroskopowe poddane analizie w naszych badaniach były robione z użyciem 20-krotnego powiększenia gdzie w przypadku wcześniej cytowanych badań powiększenie było 10-krotne. Dodatkowo samice myszy badane przez wcześniej wspomniany zespół były w konkretnej fazie cyklu – proestrus, charakteryzującej się wysokim stężeniem 17 β -estradiolu (E2, Wet et al., 2011). W naszych badaniach nie wzięliśmy pod uwagę fazy cyklu badanych samic. Wiadomo, że na komórki wyrażające PV mogą wpływać estrogeny. Możliwe, że ta różnica między badaniami przeprowadzonymi w ramach niniejszej pracy dyplomowej a badaniami Du i współpracowników wpłynęła na różnice w wynikach dotyczących liczby komórek PV w konkretnych etapach dojrzewania płciowego u samic.

Dodatkowo zaobserwowany brak różnic w liczbie komórek wyrażających PV w OFC u samic stoi w sprzeczności do wyników uzyskanych przez Jeon i współpracowników (Jeon et al., 2023). Badania Jeona i współpracowników wskazały na wzrost liczby komórek wyrażających PV w lewej OFC podczas dojrzewania płciowego, w prawej OFC tak znaczących statystycznie zmian nie zauważono. Obserwowany był jedynie wzrost liczby komórek wyrażających PV między okresem dziecięcym a dorosłością. Opisane w niniejszej pracy badania nie zawierały rozróżnienia między stronami półkul mózgowych co może być przyczyną nie wykrycia przez nas znaczących zmian w liczebności wyżej wskazanych komórek. Dodatkowo, tutaj również wystąpiły różnice techniczne: w naszych badaniach grubość skrawka wynosiła 50 μm natomiast w badaniach kierowanych przez Jeon wynosiła 15 μm . Ponadto, w badaniach Jeon obszar ten był prawie 4-krotnie mniejszy niż w naszych badaniach (0,338 mm^2 vs. 0,09 mm^2). Możliwym jest, że ten fakt również przyczynił się do niezgodności w wynikach pomiędzy oboma badaniami.

W przypadku komórek wyrażających CAL u samic, podobnie jak w przypadku komórek wyrażających PV, nie zaobserwowano związanych z wiekiem znamiennych różnic w liczbie komórek ani w PFC ani w OFC. Obserwacja ta pokrywa się z danymi literaturowymi (Du et al., 2018). Natomiast u samców w PFC wykryto wzrost liczby komórek wyrażających CAL związany z wiekiem. Dane literaturowe informują jednak o spadku ekspresji CAL wraz z dojrzewaniem osobnika (Caballero et al., 2014; Du et al., 2018). Z drugiej strony wspominają również o wzroście gęstości samych komórek (Du et al., 2018). Możliwym jest, że wcześniej raportowany wzrost gęstości komórek wyrażających CAL w naszych badaniach znalazł odzwierciedlenie w wykrytej przez nas większej liczbie komórek wyrażających CAL w PFC oraz OFC u dorosłych samców w porównaniu do samców będących w okresie dojrzewania.

W przyszłości można by rozważyć przeprowadzenie podobnych badań z uwzględnieniem informacji o stronie mózgu. W ramach niniejszych badań nie oznaczano konkretnej półkuli mózgowej. Niemniej jednak, literatura wskazuje na możliwość istnienia różnic w liczbie komórek PV pomiędzy półkulami mózgu. Na etapie planowania badań praca wykazująca istotne różnice między półkulami nie była jeszcze opublikowana (Jeon et al., 2023). W pracy tej wykazano, że u samic myszy obserwowany jest wzrost ekspresji komórek PV na przestrzeni dojrzewania płciowego tylko w lewej OFC. Gdybyśmy planowali badania obecnie, dodatkowym zagadnieniem, które warto byłoby uwzględnić, byłaby analiza ewentualnych różnic w liczbie komórek wyrażających PV lub CAL pomiędzy półkulami mózgowymi na przestrzeni całego okresu dojrzewania.

Kolejnym kierunkiem badań, które mogą stanowić kontynuację niniejszej pracy, jest analiza rozwojowych zmian w liczbie komórek wyrażających SST. Praca Du i współpracowników dostarczyła istotnych danych w tym zakresie, wykazując znaczący wzrost ekspresji SST w PFC u myszy obu płci od 3 do 6 tygodnia życia (Du et al., 2018). Należy podkreślić, że autorzy wskazują również na istotne obniżenie ekspresji tego białka w okresie między 6 a 12 tygodniem życia myszy. Obecnie są to jedyne badania analizujące zmiany w ekspresji SST w okresie dojrzewania płciowego. Dotychczasowe obserwacje wskazują, że zmiany dotyczące komórek wyrażających SST występujące podczas adolescencji są dynamiczne. Pogłębiona analiza tych zmian pozwoli na lepsze poznanie, w jaki sposób mózg zmienia się podczas dojrzewania oraz przybliży odpowiedzi na pytania dotyczące neuronalnych mechanizmów leżących u podstaw zmian behawioralnych typowych dla tego okresu rozwojowego.

Ostatnią propozycją dotyczącą kierunku rozszerzenia badań przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy dyplomowej jest uwzględnienie fazy cyklu płciowego u samic myszy. Obecnie nie dysponujemy danymi dotyczącymi fazy cyklu, w której znajdowały się badane przez nas osobniki, co może stanowić istotny czynnik wpływający na interpretację uzyskanych wyników. Uwzględnienie tego aspektu mogłoby umożliwić dokładniejsze odniesienie naszych badań do wcześniej opublikowanych wyników (Du et al., 2018). Ponadto, istnieje możliwość, że zaobserwowalibyśmy zmiany w ekspresji PV u myszy w zależności od fazy cyklu płciowego, co mogłoby stanowić dodatkowy element analizy. Wprowadzenie takiej modyfikacji pozwoliłoby na bardziej precyzyjną interpretację wyników przeprowadzonych barwień oraz wyeliminowanie potencjalnie wpływającego na nie, niezidentyfikowanego wcześniej czynnika, jakim jest faza cyklu płciowego.

Dalsza eksploracja tematu zmian w układzie GABAergicznym podczas dojrzewania wydaje się uzasadniona. Wiadomo, że sam układ GABAergiczny podlega stałemu rozwojowi w trakcie dojrzewania. Niemniej jednak, istnieje niewiele badań poświęconych zmianom zachodzącym w tym okresie. Co więcej, dostępne prace często traktują okres dojrzewania jako jednolitą całość. Wiadomym jest, że podczas adolescencji obserwowane są często nieliniowe zmiany w zachowaniu gryzoni (Harda et al., 2023) i ludzi (Larson & Richards, 1991). Aby dokładniej zbadać możliwe mózgowo podłoże zmian behawioralnych obserwowanych w okresie dojrzewania, konieczne jest jak najdokładniejsze zrozumienie natury tych zmian. Poznanie tych mechanizmów może pozwolić na weryfikację prawidłowości

rozwoju osobnika już na etapie dojrzewania, a ewentualne nieprawidłowości mogłyby być korygowane za pomocą farmakoterapii lub innych, obecnie jeszcze nieznanymi metod.

Spis tabel

Tabela 1 - Wykaz zwierząt wykorzystanych do badań z podziałem na płeć.....	17
Tabela 2 - Spis przeciwciał użytych do barwienia immunofluorescencyjnego.....	18
Tabela 3 - Analiza wariancji wpływu tury barwienia.....	22
Tabela 4 - Średnie wartości ustawień dla zbioru treningowego (PV)	26
Tabela 5 - Średnie wartości ustawień dla zbioru treningowego (CAL).....	26
Tabela 6 - Parametry w analizie 1 (PV).....	27
Tabela 7 - Parametry w analizie 1 (CAL)	27
Tabela 8 - Wyniki analizy ANOVA (PV).....	44
Tabela 9 - Wyniki analizy ANOVA (CAL).....	44
Tabela 10 - Wyniki testu post-hoc Tukey'a dla samców (PV)	44
Tabela 11 - Wyniki testu post hoc Tukey'a dla samców (CAL).....	45
Tabela 12 - Wyniki analizy manualnej liczby komórek wyrażających PV zdjęć ze zbioru treningowego.....	46
Tabela 13 - Wyniki analizy manualnej liczby komórek wyrażających CAL zdjęć ze zbioru treningowego.....	47

Spis rycin

Rycina 1 - Przykładowy obszar obrazowania	20
Rycina 2 - Przykładowe zdjęcia poddane analizie liczby komórek wyrażających PV lub CAL pochodzące z PFC.....	24
Rycina 3 - Przykładowe zdjęcia poddane analizie liczby komórek wyrażających PV lub CAL pochodzące z OFC.	25
Rycina 4 - Analiza korelacji między liczbą komórek wyrażających PV lub CAL uzyskanych drogą analizy wykonanej przez eksperymentatora a liczbą komórek wyrażających PV lub CAL generowanych podczas analizy 1 (zbiór treningowy).....	28
Rycina 5 –Analiza korelacji między liczbą komórek wyrażających PV oraz CAL uzyskanych drogą analizy wykonanej przez eksperymentatora a liczbą komórek wyrażających PV oraz CAL generowanych podczas analizy 2 (zbiór treningowy).....	29
Rycina 6 - Analiza korelacji między liczbą komórek wyrażających PV oraz CAL uzyskanych drogą analizy wykonanej przez eksperymentatora a liczbą komórek wyrażających PV oraz CAL generowanych podczas analizy 2' (zbiór testowy).	30
Rycina 7 - Wyniki analizy liczby komórek wyrażających PV u samców i samic myszy w okresie dojrzewania	31
Rycina 8 - Wyniki analizy liczby komórek wyrażających CAL u samców i samic myszy w okresie dojrzewania.	32

Bibliografia

- Bassetti, D. (2022). Keeping the Balance: GABAB Receptors in the Developing Brain and Beyond. *Brain Sciences*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/brainsci12040419>
- Beierlein, M., Gibson, J. R., & Connors, B. W. (2003). Two Dynamically Distinct Inhibitory Networks in Layer 4 of the Neocortex. *Journal of Neurophysiology*, 90(5), 2987–3000. <https://doi.org/10.1152/jn.00283.2003>
- Belelli, D., Herd, M. B., Mitchell, E. A., Peden, D. R., Vardy, A. W., Gentet, L., & Lambert, J. J. (2006). *NEUROACTIVE STEROIDS AND INHIBITORY NEUROTRANSMISSION*: 138, 821–829. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.07.021>
- Bell, M. R. (2018). Comparing postnatal development of gonadal hormones and associated social behaviors in rats, mice, and humans. *Endocrinology*, 159(7), 2596–2613. <https://doi.org/10.1210/en.2018-00220>
- Ben-Ari, Y. (2002). Excitatory actions of GABA during development: The nature of the nurture. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(9), 728–739. <https://doi.org/10.1038/nrn920>
- Bicks, L. K., Yamamuro, K., Flanigan, M. E., Kim, J. M., Kato, D., Lucas, E. K., Koike, H., Peng, M. S., Brady, D. M., Chandrasekaran, S., Norman, K. J., Smith, M. R., Clem, R. L., Russo, S. J., Akbarian, S., & Morishita, H. (2020). Prefrontal parvalbumin interneurons require juvenile social experience to establish adult social behavior. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14740-z>
- Buzsáki, G., & Wang, X. J. (2012). Mechanisms of gamma oscillations. *Annual Review of Neuroscience*, 35, 203–225. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-062111-150444>
- Caballero, A., Flores-Barrera, E., Cass, D. K., & Tseng, K. Y. (2014). Differential regulation of parvalbumin and calretinin interneurons in the prefrontal cortex during adolescence. *Brain Structure and Function*, 219(1), 395–406. <https://doi.org/10.1007/s00429-013-0508-8>
- Candace, Y., Du, X., Buuse, M. Van Den, & Hill, R. A. (2014). ScienceDirect Sex differences in the adolescent developmental trajectory of parvalbumin interneurons in the hippocampus : A role for estradiol. *Psychoneuroendocrinology*, 45, 167–178. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2014.03.016>
- Caputi, A., Rozov, A., Blatow, M., & Monyer, H. (2009). Two calretinin-positive gabaergic cell types in layer 2/3 of the mouse neocortex provide different forms of inhibition. *Cerebral Cortex*, 19(6), 1345–1359. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhn175>
- Chebib, M., & Johnston, G. A. R. (1999). *Proceedings of the Australian Neuroscience Society Symposium GABA and Glycine Receptors : From Neurochemistry to Neural Networks THE ' ABC ' OF GABA RECEPTORS : A BRIEF REVIEW*. 937–940.
- Constantinidis, C., Williams, G. V., & Goldman-Rakic, P. S. (2002). A role for inhibition in shaping the temporal flow of information in prefrontal cortex. *Nature Neuroscience*, 5(2), 175–180. <https://doi.org/10.1038/nn799>

- Crone, E. A., & Dahl, R. E. (2012). Understanding adolescence as a period of social-affective engagement and goal flexibility. *Nature Reviews Neuroscience*, *13*(9), 636–650. <https://doi.org/10.1038/nrn3313>
- Cruikshank, S. J., Lewis, T. J., & Connors, B. W. (2007). Synaptic basis for intense thalamocortical activation of feedforward inhibitory cells in neocortex. *Nature Neuroscience*, *10*(4), 462–468. <https://doi.org/10.1038/nn1861>
- Du, X., Serena, K., Hwang, W., Grech, A. M., Wu, Y. W. C., Schroeder, A., & Hill, R. A. (2018). *Molecular and Cellular Neuroscience Prefrontal cortical parvalbumin and somatostatin expression and cell density increase during adolescence and are modified by BDNF and sex*. *88*(January), 177–188. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2018.02.001>
- Džaja, D., Hladnik, A., & Bi, I. (2014). *Neocortical calretinin neurons in primates : increase in proportion and microcircuitry structure*. *8*(September), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00103>
- Emsen, P. C. (2007). GABAB receptors: structure and function. *Progress in Brain Research*, *160*, 43–57. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(06\)60004-6](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(06)60004-6)
- Fagiolini, M., Fritschy, J., & Lo, K. (2008). Specific GABA A Circuits for. *Science*, *1681*(2004), 10–13.
- Fanselow, E. E., Richardson, K. A., & Connors, B. W. (2008). Selective, state-dependent activation of somatostatin-expressing inhibitory interneurons in mouse neocortex. *Journal of Neurophysiology*, *100*(5), 2640–2652. <https://doi.org/10.1152/jn.90691.2008>
- Farrant, M., & Kaila, K. (2007). The cellular, molecular and ionic basis of GABAA receptor signalling. *Progress in Brain Research*, *160*, 59–87. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(06\)60005-8](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(06)60005-8)
- Foulkes, L., & Blakemore, S. J. (2016). Is there heightened sensitivity to social reward in adolescence? *Current Opinion in Neurobiology*, *40*, 81–85. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2016.06.016>
- Gabernet, L., Jadhav, S. P., Feldman, D. E., Carandini, M., & Scanziani, M. (2005). Somatosensory integration controlled by dynamic thalamocortical feed-forward inhibition. *Neuron*, *48*(2), 315–327. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.09.022>
- Ghit, A., Assal, D., Al-Shami, A. S., & Hussein, D. E. E. (2021). GABAA receptors: structure, function, pharmacology, and related disorders. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, *19*(1), 123. <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00224-0>
- Glickfeld, L. L., Roberts, J. D., Somogyi, P., & Scanziani, M. (2009). Interneurons hyperpolarize pyramidal cells along their entire somatodendritic axis. *Nature Neuroscience*, *12*(1), 21–23. <https://doi.org/10.1038/nn.2230>
- Gonchar, Y., & Burkhalter, A. (1997). *Three Distinct Families of GABAergic Neurons in Rat Visual Cortex*. 347–358.
- Gonzalez-Burgos, G., & Lewis, D. A. (2008). GABA neurons and the mechanisms of network oscillations: Implications for understanding cortical dysfunction in schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, *34*(5), 944–

961. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbn070>

Gulyás, A. I., Hájos, N., & Freund, T. F. (1996). Interneurons containing calretinin are specialized to control other interneurons in the rat hippocampus. *Journal of Neuroscience*, *16*(10), 3397–3411.

<https://doi.org/10.1523/jneurosci.16-10-03397.1996>

Haider, B., & McCormick, D. A. (2009). Rapid Neocortical Dynamics: Cellular and Network Mechanisms.

Neuron, *62*(2), 171–189. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.04.008>

Harda, Z., Klimczak, M., Misiołek, K., Chrószcz, M., & Szumiec, Ł. (2023). *Mu-opioid receptor-dependent changes in social reward across adolescence in mice Results Rewarding effects of interactions with siblings across adolescence*. 1–22.

Hasenstaub, A., Shu, Y., Haider, B., Kraushaar, U., Duque, A., & McCormick, D. A. (2005). Inhibitory postsynaptic potentials carry synchronized frequency information in active cortical networks. *Neuron*,

47(3), 423–435. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.06.016>

Heldring, N., Pike, A., Andersson, S., Matthews, J., Cheng, G., Hartman, J., Tujague, M., Ström, A., Treuter, E., Warner, M., & Gustafsson, J. Å. (2007). Estrogen receptors: How do they signal and what are their targets. *Physiological Reviews*, *87*(3), 905–931. <https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2006>

<https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2006>

Hevers, W., & Lüddens, H. (1998). The diversity of GABA(A) receptors: Pharmacological and electrophysiological properties of GABA(A) channel subtypes. *Molecular Neurobiology*, *18*(1), 35–86.

<https://doi.org/10.1007/BF02741459>

Jeon, Y. S., Jeong, D., Kweon, H., Kim, J. H., Kim, C. Y., Oh, Y., Lee, Y. H., Kim, C. H., Kim, S. G., Jeong, J. W., Kim, E., & Lee, S. H. (2023). Adolescent Parvalbumin Expression in the Left Orbitofrontal Cortex Shapes Sociability in Female Mice. *Journal of Neuroscience*, *43*(9), 1555–1571.

<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0918-22.2023>

Kaupmann, K., Malitschek, B., Heid, J., Froestl, W., Beck, P., Mosbacher, J., Bischoff, S., Kulik, A., Shigemoto, R., Karschin, A., & Bettler, B. (1998). *-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes*. *60*, 683–687.

60, 683–687.

Kawaguchi, Y., & Kubota, Y. (1997). *GABAergic Cell Subtypes and their Synaptic Connections in Rat Frontal Cortex*. 476–486.

Larson, R., & Richards, M. H. (1991). Daily Companionship in Late Childhood and Early Adolescence:

Changing Developmental Contexts. *Child Development*, *62*(2), 284–300. <https://doi.org/10.1111/j.1467-8624.1991.tb01531.x>

Lewis, D. A., Hashimoto, T., & Volk, D. W. (2005). Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. *Nature Reviews Neuroscience*, *6*(4), 312–324. <https://doi.org/10.1038/nrn1648>

Lin, W. C., & Wilbrecht, L. (2021). *Version of Record*:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352250X21002499>. 1–14.

- Lisman, J. E., Coyle, J. T., Green, R. W., Javitt, D. C., Benes, F. M., Heckers, S., & Grace, A. A. (2008). Circuit-based framework for understanding neurotransmitter and risk gene interactions in schizophrenia. *Trends in Neurosciences*, *31*(5), 234–242. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.02.005>
- Luo, L. (2020). *Principles of neurobiology*. Garland Science.
- Markram, H., Toledo-Rodriguez, M., Wang, Y., Gupta, A., Silberberg, G., & Wu, C. (2004). Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nature Reviews Neuroscience*, *5*(10), 793–807. <https://doi.org/10.1038/nrn1519>
- Misiołek, K., Klimczak, M., Chrószcz, M., Szumiec, Ł., Bryksa, A., Przyborowicz, K., Rodriguez Parkitna, J., & Harda, Z. (2023). Prosocial behavior, social reward and affective state discrimination in adult male and female mice. *Scientific Reports*, *13*(1), 1–28. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-32682-6>
- Mody, I., & Pearce, R. A. (2004). Diversity of inhibitory neurotransmission through GABA A receptors. *Trends in Neurosciences*, *27*(9), 569–575. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.07.002>
- Paus, T., Keshavan, M., & Giedd, J. N. (2008). Why do many psychiatric disorders emerge during adolescence? *Nature Reviews Neuroscience*, *9*(12), 947–957. <https://doi.org/10.1038/nrn2513>
- Paxinos, G., & Franklin, K. B. J. (2001). The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, 2nd edition. In *Academic Press* (p. 360 p.).
- Piekarski, D. J., Johnson, C. M., Boivin, J. R., Thomas, A. W., Lin, W. C., Delevich, K., Galarce, E. M., & Wilbrecht, L. (2017). Does puberty mark a transition in sensitive periods for plasticity in the associative neocortex? *Brain Research*, *1654*, 123–144. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.08.042>
- Pouille, F., & Scanziani, M. (2001). Enforcement of temporal fidelity in pyramidal cells by somatic feed-forward inhibition. *Science*, *293*(5532), 1159–1163. <https://doi.org/10.1126/science.1060342>
- Pouille, Frédéric, & Scanziani, M. (2004). Routing of spike series by dynamic circuits in the hippocampus. *Nature*, *429*(6993), 717–723. <https://doi.org/10.1038/nature02615>
- Qi, Y., Cheng, H., Wang, Y., & Chen, Z. (2022). Revealing the Precise Role of Calretinin Neurons in Epilepsy: We Are on the Way. *Neuroscience Bulletin*, *38*(2), 209–222. <https://doi.org/10.1007/s12264-021-00753-1>
- Schindelin, J., Arganda-carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2019). *Fiji : an open-source platform for biological-image analysis*. *9*(7). <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Sebastian, C., Burnett, S., & Blakemore, S. J. (2008). Development of the self-concept during adolescence. *Trends in Cognitive Sciences*, *12*(11), 441–446. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2008.07.008>
- Silberberg, G., & Markram, H. (2007). Disynaptic Inhibition between Neocortical Pyramidal Cells Mediated by Martinotti Cells. *Neuron*, *53*(5), 735–746. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.02.012>
- Simpson, E. R., Mahendroo, M. S., Means, G. D., Kilgore, M. W., Hinshelwood, M. M., Graham-Lorence, S.,

- Amarneh, B., Ito, Y., Fisher, C. R., Michael, M. D., Mendelson, C. R., & Bulun, S. E. (1994). Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocrine Reviews*, *15*(3), 342–355. <https://doi.org/10.1210/er.15.3.342>
- Soghomonian, J. J., & Martin, D. L. (1998). Two isoforms of glutamate decarboxylase: Why? *Trends in Pharmacological Sciences*, *19*(12), 500–505. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(98\)01270-X](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(98)01270-X)
- Sohal, V. S., Zhang, F., Yizhar, O., & Deisseroth, K. (2009). Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. *Nature*, *459*(7247), 698–702. <https://doi.org/10.1038/nature07991>
- Spear, L. P. (2000). <2000 - Spear - Neurosci Biobehav Rev.pdf>. In *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* (Vol. 24, Issue 4). [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0149763400000142%0Apapers3://publication/doi/10.1016/S0149-7634\(00\)00014-2](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0149763400000142%0Apapers3://publication/doi/10.1016/S0149-7634(00)00014-2)
- Swadlow, H. A. (2003). Fast-spike interneurons and feedforward inhibition in awake sensory neocortex. *Cerebral Cortex*, *13*(1), 25–32. <https://doi.org/10.1093/cercor/13.1.25>
- Uematsu, M., Hirai, Y., Karube, F., Ebihara, S., Kato, M., Abe, K., Obata, K., Yoshida, S., Hirabayashi, M., Yanagawa, Y., & Kawaguchi, Y. (2008). Quantitative chemical composition of cortical GABAergic neurons revealed in transgenic venus-expressing rats. *Cerebral Cortex*, *18*(2), 315–330. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhm056>
- Wet, M., Miko, N., Ni, W., Anto, A., & Sta, E. W. A. (2011). *Wybrane aspekty regulacji neurohormonalnej fazy lutealnej u suk.* *67*(5), 295–298.
- Whittington, M. A., & Traub, R. D. (2003). Interneuron Diversity series: Inhibitory interneurons and network oscillations in vitro. *Trends in Neurosciences*, *26*(12), 676–682. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2003.09.016>
- Xu, X., Roby, K. D., & Callaway, E. M. (2010). Immunochemical characterization of inhibitory mouse cortical neurons: Three chemically distinct classes of inhibitory cells. *Journal of Comparative Neurology*, *518*(3), 389–404. <https://doi.org/10.1002/cne.22229>
- Zhang, L., Chang, Y. H., Feldman, A. N., Ma, W., Lahjouji, F., & Barker, J. L. (1999). *The expression of GABA A receptor $\alpha 2$ subunit is upregulated by testosterone in rat cerebral cortex.* *265*, 25–28.

Aneks

Tabela 8 - Wyniki analizy ANOVA (PV)

Parwalbumina				
Płeć	Struktura	F	P	Liczba outlierów
Samice	PFC	0,05198	0,984	2
Samce	PFC	4,235	0,015¹	0
Samice	OFC	0,4885	0,6932	1
Samce	OFC	2,24	0,1107	0

¹Pogrubione wartości w tabeli są istotne statystycznie ($p < 0,05$).

Tabela 9 - Wyniki analizy ANOVA (CAL)

Kalretynina				
Płeć	Struktura	F	P	Liczba outlierów
Samice	PFC	0,6252	0,6043	0
Samce	PFC	5,287	0,0058¹	0
Samice	OFC	0,6765	0,5737	0
Samce	OFC	4,145	0,0187	2

¹Pogrubione wartości w tabeli są istotne statystycznie ($p < 0,05$).

Tabela 10 - Wyniki testu post-hoc Tukey'a dla samców (PV)

Parwalbumina		
Porównanie	Struktura	P
32 vs 38	PFC	0,6419
32 vs 43	PFC	0,3137
32 vs 72	PFC	0,0099¹
38 vs 43	PFC	0,8844
38 vs 72	PFC	0,0874
43 vs 72	PFC	0,4198

¹Pogrubione wartości w tabeli są istotne statystycznie ($p < 0,05$).

Tabela 11 - Wyniki testu post hoc Tukey'a dla samców (CAL)

Kalretynina		
Porównanie	Struktura	P
32 vs 38	PFC	>0,9999
32 vs 43	PFC	0,9093
32 vs 72	PFC	0,0296¹
38 vs 43	PFC	0,888
38 vs 72	PFC	0,0205
43 vs 72	PFC	0,0082
32 vs 38	OFC	0,5045
32 vs 43	OFC	0,7458
32 vs 72	OFC	0,1233
38 vs 43	OFC	0,1054
38 vs 72	OFC	0,708
43 vs 72	OFC	0,0194

¹Pogrubione wartości w tabeli są istotne statystycznie ($p < 0,05$).

Tabela 12 - Wyniki analizy manualnej liczby komórek wyrażających PV zdjęć ze zbioru treningowego

Tura barwienia	Identyfikator myszy	Numer skrawka	Struktura mózgu	Strona	Parwalbumina					
					Jasność	Kontrast	Punkt odcięcia X	Punkt odcięcia Y	Rozmiar komórki	Liczba komórek PV
1	F111	1	PFC	L	16	78	108	225	10-500	26
1	F222	2	PFC	R	63	204	111	255	10-500	18
1	F421	3	PFC	L	13	73	109	255	10-500	24
1	F311	1	PFC	L	16	78	111	255	10-500	31
1	F631	2	PFC	R	21	73	118	255	30-500	37
1	F641	3	PFC	L	22	103	107	255	10-500	29
1	F431	1	PFC	L	16	65	123	255	15-500	18
1	F421	2	OFC	L	16	78	114	255	10-500	40
1	F221	2	OFC	R	18	101	124	255	20-500	32
1	F111	1	OFC	L	24	72	149	255	20-700	34
1	F431	2	OFC	L	13	78	118	255	10-500	3
1	F521	5	OFC	R	18	57	126	255	10-500	29
1	F631	1	OFC	L	21	107	109	255	20-500	22
1	F713	3	OFC	R	29	112	123	255	10-500	41
2	M231	3	PFC	L	13	117	111	255	10-500	40
2	M241	1	PFC	R	16	78	132	255	10-500	34
2	M521	2	PFC	L	26	73	128	255	20-500	32
2	M512	3	PFC	L	31	167	161	255	20-500	23
2	M231	1	PFC	R	21	75	112	255	10-500	25
2	M421	2	PFC	R	26	148	115	255	10-500	26
2	M311	3	PFC	L	44	156	120	255	10-500	23
2	M511	6	OFC	L	26	86	155	255	30-500	37
2	M432	5	OFC	R	37	146	147	255	20-500	31
2	M241	5	OFC	R	52	106	220	255	20-500	16
2	M231	1	OFC	R	18	62	156	255	10-500	16
2	M641	2	OFC	R	32	112	128	255	20-500	26
2	M711	1	OFC	R	18	88	99	255	10-500	20
2	M911	1	OFC	L	20	33	217	255	10-500	12
3	F113	2	PFC	L	16	65	123	255	10-500	20
3	F1211	3	PFC	R	96	119	255	255	20-500	47
3	F1411	1	PFC	L	13	156	103	255	10-500	52
3	M111	2	PFC	L	37	156	137	255	10-500	52
3	M232	3	PFC	R	55	148	138	255	10-500	12
3	M1513	1	PFC	L	62	138	168	255	20-500	25
3	M522	3	PFC	R	31	174	135	255	10-500	32
3	F2012	4	OFC	L	31	185	132	255	10-500	17
3	F223	1	OFC	L	23	103	197	255	10-700	44
3	F422	2	OFC	R	102	124	255	255	30-500	24
3	F312	3	OFC	R	29	93	206	255	20-500	40
3	M912	3	OFC	R	94	96	255	255	20-500	74
3	M842	4	OFC	L	65	67	255	255	20-500	52
3	M712	3	OFC	R	35	72	196	255	50-500	20

Tabela 13 - Wyniki analizy manualnej liczby komórek wyrażających CAL zdjęć ze zbioru treningowego

Tura barwienia	Identyfikator myszy	Numer skrawka	Struktura mózgu	Strona	Kalretynina					
					Jasność	Kontrast	Punkt odcięcia X	Punkt odcięcia Y	Rozmiar komórki	Liczba komórek CAL
1	F111	1	PFC	L	59	196	128	255	20-500	31
1	F222	2	PFC	R	101	141	128	255	20-500	3
1	F421	3	PFC	L	36	120	128	255	20-500	16
1	F311	1	PFC	L	26	133	131	255	20-500	14
1	F631	2	PFC	R	42	169	112	255	15-500	14
1	F641	3	PFC	L	57	174	123	255	15-500	21
1	F431	1	PFC	L	47	101	123	255	20-500	10
1	F421	2	OFC	L	48	96	128	255	10-500	20
1	F221	2	OFC	R	36	143	117	255	15-500	11
1	F111	1	OFC	L	57	134	149	255	20-700	22
1	F431	2	OFC	L	63	117	124	255	20-500	11
1	F521	5	OFC	R	23	133	105	255	20-500	13
1	F631	1	OFC	L	49	160	111	255	10-300	17
1	F713	3	OFC	R	39	125	120	255	10-500	7
2	M231	3	PFC	L	37	133	126	255	10-500	15
2	M241	1	PFC	R	23	104	105	255	10-500	16
2	M521	2	PFC	L	23	107	103	255	15-500	13
2	M512	3	PFC	L	29	99	118	255	20-500	4
2	M231	1	PFC	R	26	109	79	255	10-500	13
2	M421	2	PFC	R	16	76	147	255	20-500	46
2	M311	3	PFC	L	37	122	115	255	10-500	9
2	M511	6	OFC	L	16	120	109	255	20-500	11
2	M432	5	OFC	R	38	88	124	255	20-500	5
2	M241	5	OFC	R	23	81	105	255	10-500	14
2	M231	1	OFC	R	24	135	83	255	10-500	11
2	M641	2	OFC	R	24	101	83	255	20-500	1
2	M711	1	OFC	R	31	86	120	255	20-500	18
2	M911	1	OFC	L	16	81	126	255	20-500	3
3	F113	2	PFC	L	23	83	161	255	20-500	0
3	F1211	3	PFC	R	127	186	196	255	20-500	17
3	F1411	1	PFC	L	29	143	121	255	10-500	20
3	M111	2	PFC	L	61	141	134	255	20-500	6
3	M232	3	PFC	R	18	159	112	255	10-500	12
3	M1513	1	PFC	L	70	138	181	255	20-500	2
3	M522	3	PFC	R	23	146	105	255	20-500	8
3	F2012	4	OFC	L	57	152	155	255	20-500	12
3	F223	1	OFC	L	13	138	112	255	20-500	1
3	F422	2	OFC	R	84	111	165	255	20-700	16
3	F312	3	OFC	R	47	62	164	255	20-500	8
3	M912	3	OFC	R	83	85	255	255	20-500	9
3	M842	4	OFC	L	47	54	255	255	20-500	8
3	M712	3	OFC	R	44	55	234	255	20-500	6