

**Klaudia Nowicka**

**Rozkład białka c-Fos w całym mózgu podczas uczenia  
apetytywnego**

Praca doktorska  
wykonana w Pracowni Neurobiologii  
Instytutu Biologii Doświadczalnej  
im. M. Nenckiego PAN

**PROMOTOR:**

**Prof. dr hab. Leszek Kaczmarek**

**Promotor pomocniczy:**

**Dr Marzena Stefaniuk**

Warszawa, wrzesień 2022

*Pragnę złożyć serdeczne podziękowania **prof. dr. hab. Leszkowi Kaczmarkowi** za podarowaną mi szansę pracy i rozwoju w Pracowni Neurobiologii. Jestem niezmiernie wdzięczna za wskazanie drogi, dzielenie się wiedzą i doświadczeniem, za cenne uwagi, zaufanie i niegasnący optymizm.*

*Nieskończone wyrazy wdzięczności kieruję do **dr Marzeny Stefaniuk**, za poświęcony czas, przekazaną wiedzę i pomoc przy tworzeniu niniejszej pracy. Dziękuję, za bycie przewodniczką, wsparciem, inspiracją.*

*Dziękuję wszystkim **Koleżankom i Kolegom** z Pracowni Neurobiologii za okazaną życzliwość i przyjazną atmosferę pracy.*

## Spis treści

<b>Wykaz skrótów</b> .....	6
<b>Streszczenie</b> .....	8
<b>Summary</b> .....	10
<b>1. Wstęp</b> .....	12
1.1 Bodźce apetytywne i awersyjne kierują zachowaniem zwierząt.....	12
1.2 Molekularne podłoże procesu uczenia się.....	14
1.3 Ekspresja <i>c-fos</i> w neuronach .....	15
1.4 Białko c-Fos jako marker plastyczności synaptycznej.....	17
1.5 Mapowanie aktywności mózgu za pomocą mikroskopii opartej na arkuszu światła .....	19
<b>2. Cele pracy</b> .....	25
<b>3. Materiały i metody</b> .....	26
3.1 Zwierzęta wykorzystane w doświadczeniach .....	26
3.2 Badania behawioralne .....	27
3.2.1 System klatek IntelliCage.....	27
3.2.2 Trening preferencji miejsca w klatce IntelliCage .....	29
3.2.3 Trening unikania miejsca w klatce IntelliCage .....	30
3.2.4 Trening apetytywny w klatce domowej - pomiary pobudliwości neuronalnej .....	32
3.3 Doświadczenia laboratoryjne .....	33
3.3.1 Przygotowanie mózgów do znakowania immunofluorescencyjnego .....	33
3.3.2 Przygotowanie skrawków mózgów .....	33
3.3.3 Immunodetekcja białka c-Fos w skrawkach mózgu .....	34
3.3.4 Obrazowanie w mikroskopie konfokalnym .....	35
3.3.5 Przygotowanie mózgów do oczyszczania optycznego metodą iDISCO+.....	35
3.3.6 Immunodetekcja c-Fos w półkulach mózgowych.....	36
3.3.6 Oczyszczanie optyczne półkul mózgowych.....	37

3.3.7	Obrazowanie mózgow w mikroskopie opartym na arkuszu światła .....	37
3.3.8	Analiza obrazów uzyskanych w mikroskopie LSM .....	38
3.3.9	Badanie występowania białka c-Fos w komórkach SST, PV oraz VIP .....	41
3.3.10	Badanie pobudliwości neuronów SST+ środkowego ciała migdałowatego metodą <i>whole-cell patch clamp</i> .....	41
3.3.11	Przygotowanie przyżyciowych skrawków mózgow .....	42
4.	<b>Wyniki</b> .....	44
4.1	Trening apetytywny w klatce IntelliCage .....	44
4.3	Mapowanie ekspresji c-Fos wywołanej treningiem apetytywnym .....	47
4.4	Ocena liczby komórek wykazujących ekspresję białka c-Fos w mózgow myszy poddanych treningowi apetytywnemu .....	50
4.5	Analiza połączeń neuronalnych występujących pomiędzy strukturami aktywowanymi treningiem apetytywnym .....	57
4.6	Udział części ciała migdałowatego w uczeniu apetytywnym i awersyjnym .....	61
4.6.1	Trening awersyjny w klatce IntelliCage .....	61
4.6.2	Ekspresja c-Fos w jądrach ciała migdałowatego po treningu apetytywnym i awersyjnym 65	
4.7	Udział poszczególnych części jądra środkowego ciała migdałowatego w uczeniu apetytywnym .....	68
4.8	Identyfikacja typów neuronów środkowego jądra ciała migdałowatego wykazujących ekspresję białka c-Fos na skutek treningu apetytywnego .....	70
4.9	Charakterystyka elektrofizjologiczna neuronów somatostatynowych CeA .....	74
4.10	Wpływ uczenia apetytywnego na właściwości elektrofizjologiczne komórek somatostatynowych w CeL i CeM .....	77
4.11	Wpływ uczenia apetytywnego na pobudliwość własną i parametry błony neuronów somatostatynowych w CeL i CeM .....	79
5.	<b>Dyskusja</b> .....	84
5.1	Uczenie apetytywne powoduje zwiększoną ekspresję c-Fos w wielu strukturach mózgu. 84	



5.2	Udział środkowego jądra ciała migdałowatego w obwodach neuronalnych kontrolujących reakcje apetytywne .....	90
5.3	CeA jako kluczowa struktura w uczeniu apetytywnym a nie awersyjnym.....	92
5.4	Neurony SST+ CeA wykazują ekspresję białka c-Fos podczas uczenia apetytywnego...	97
5.5	CeA zawiera odrębne podtypy neuronów SST+.....	99
5.6	Uczenie apetytywne powoduje wzrost pobudliwości neuronów SST+ w CeA.....	100
6.	<b>Podsumowanie i wnioski</b> .....	104
7.	<b>Spis rycin</b> .....	105
8.	<b>Spis Piśmiennictwa</b> .....	107
9.	<b>Spis publikacji własnych</b> .....	130
10.	<b>Źródło finansowania</b> .....	130
11.	<b>Załączniki</b> .....	131

## Wykaz skrótów

**ACSF** (ang. *artificial cerebrospinal fluid*) – sztuczny płyn mózgowo-rdzeniowy

**Ai14** – myszy niosące gen kodujący białko czerwonej fluorescencji tdTomato

**AP-1** (ang. *activator protein 1*) – czynnik transkrypcyjny

**BLA** (ang. *basolateral amygdala*) – jądro podstawno-boczne ciała migdałowego

**BSA** (ang. *bovine serum albumin*) – surowicza albumina wołowa

**CeA** (ang. *central amygdala*) – jądro środkowe ciała migdałowego

**CeL** (ang. *central amygdala, lateral part*) – boczna część jądra środkowego ciała migdałowego

**CeM** (ang. *central amygdala, medial part*) – część przyśrodkowa jądra środkowego ciała migdałowego

**c-Fos** – białko c-Fos

*c-fos* – gen kodujący białko c-Fos

**CRE** (ang. *cyclic AMP responsive element*) – element odpowiedzi na cykliczny AMP, sekwencja regulatorowa DNA, do której przyłącza się białko CREB

**DAPI** – 4',6-diamidyno-2-fenylindol

**DCM** – dichlorometan

**fMRI** (ang. *functional magnetic resonance imaging*) – funkcjonalny rezonans magnetyczny

**IEGs** (ang. *immediate early genes*) – geny wczesnej odpowiedzi

**LSFM** (ang. *light sheet fluorescence microscopy*) – mikroskop oparty na arkuszu światła

**MMP-9** (ang. *matrix metalloproteinase 9*) – metaloproteinaza macierzowa 9

**mRNA** (ang. *messenger RNA*) – matrycowy RNA

**NA** (ang. *numerical aperture*) – apertura numeryczna

**OUN** – ośrodkowy układ nerwowy

**PFA** – paraformaldehyd

**PBS** (ang. *phosphate buffered saline*) – zbuforowany roztwór soli fizjologicznej

**PV** – parwalbumina

**RI** (ang. *refractive index*) – współczynnik załamania światła

**shRNA** (ang. *short hairpin RNA*) – krótki interferujący RNA o strukturze spinki do włosów

**SST** – somatostatyna

**TIMP-1** (ang. *TIMP metalloproteinase inhibitor 1*) – inhibitor metaloproteinaz macierzowych 1

**tdTomato** – białko czerwonej fluorescencji

**WD** (ang. *working distance*) – odległość robocza obiektywu

**VIP** – wazoaktywny peptyd jelitowy

## Streszczenie

Uczenie się to zdolność organizmu do zmiany swojego zachowania pod wpływem przeżytych doświadczeń. Umiejętność ta pozwala na przystosowanie do nieustannie zmieniających się warunków środowiska i, w rezultacie, do adekwatnej reakcji behawioralnej w zależności od charakteru pojawiającego się bodźca. Wyróżnia się bodźce pozytywne (apetytywne) oraz negatywne (awersyjne). Bodziec apetytywny wywołuje reakcje zmierzające do osiągnięcia nagrody, natomiast działanie bodźca awersyjnego prowadzi do jego unikania. Uczenie się zachodzi dzięki plastyczności synaptycznej, czyli zdolności mózgu do zmiany siły połączeń między określonymi neuronami. Proces ten jest kluczowy dla kształtowania się zachowań apetytywnych i awersyjnych i tym samym przeżycia. Z drugiej strony zaburzenia biologiczne w procesach uczenia mogą prowadzić do rozwoju niektórych chorób psychicznych, takich jak uzależnienia. Dlatego poznanie mechanizmów neuronalnych uczestniczących w plastyczności synaptycznej związane z uczeniem apetytywnym i awersyjnym jest niezwykle ważne.

Dotychczas znacznie lepiej scharakteryzowano zmiany neuronalne leżące u podstaw zachowań awersyjnych, natomiast te związane z zachowaniem apetytywnym pozostają gorzej poznane. Dlatego też celem niniejszej pracy było zmapowanie aktywności neuronalnej prowadzącej do powstania zmian plastycznych w mózgu podczas uczenia apetytywnego. Wykorzystano model myszy, w którym uczenie apetytywne było oparte na wykształceniu preferencji miejsca do 10% roztworu sacharozy. Jako marker aktywacji neuronalnej towarzyszącej zmianom plastycznym wykorzystano białko c-Fos, którego ekspresję obrazowano w mikroskopie opartym na arkuszu światła. Pozwoliło to na stworzenie globalnej mapy mózgu ukazującej zwiększoną ekspresję c-Fos w około 170 strukturach mózgu. Następnie przeprowadzono analizę *in silico* projekcji neuronalnych, pomiędzy najaktywniejszymi po treningu strukturami mózgu. Wykazano, że najwięcej połączeń neuronalnych z innymi aktywowanymi strukturami posiada jądro środkowe ciała migdałowatego (CeA).

Następnie zidentyfikowano typy neuronów, w których dochodziło do ekspresji c-Fos w odpowiedzi na uczenie apetytywne. Ponieważ CeA w większości składa się z neuronów hamujących, doświadczenia prowadzono na 3 populacjach neuronów: VIP+, PV+ i SST+. Wykazano, że podczas uczenia się zdarzeń apetytywnych c-Fos ulega ekspresji głównie w neuronach SST+ i w niewielkim stopniu w VIP+ i PV+.

Opierając się na uzyskanych wynikach, w ostatniej części badań przeprowadzono charakterystykę elektrofizjologiczną neuronów SST+ w CeA. Wykazano, że w zależności od części CeA neurony SST+ dzielą się na dwie podgrupy generujące inne wzory potencjałów czynnościowych. Ponadto wykazano, że pod wpływem uczenia apetytywnego zwiększa się wewnętrzna pobudliwość neuronów SST+, zlokalizowanych w CeA.

Wyniki uzyskane w ramach niniejszej pracy pokazują, że uczenie apetytywne prowadzi do globalnej aktywacji wielu struktur mózgu. Ponadto stwierdzono, że CeA jest kluczowe dla uczenia się zdarzeń pozytywnych, poprzez aktywację neuronów SST+.

## Summary

Learning is the ability of organisms to change their behavior as a result of past experience. Learning enables adaptation to constantly changing environment, and thus proper response to positive (appetitive) and negative (aversive) stimuli. An appetitive stimulus triggers motivational responses aimed at approaching a reward, an aversive on the other hand induces withdrawal (avoidance and/or escape). Learning occurs through synaptic plasticity which is the brain's ability to alter the strength of connections between neurons. On cellular level synaptic plasticity is related to neuronal activity that drives functional and structural changes within synapses. As a consequence a subject can retain past experiences in its memory and adapt its behavior to similar situations in the future. Thus, synaptic plasticity is crucial for the development of appetitive and aversive behavior and organism survival. On the other hand, these mechanisms are also involved in the development of mental illnesses. Therefore, understanding the neuronal mechanisms involved in synaptic plasticity is crucial.

In comparison to the neuronal changes underlying aversive behavior those associated with appetitive learning have been poorly characterized. Therefore, the aim of the present study was to map neuronal activity in the brain occurring during appetitive learning. For this purpose, we used a mouse model in which appetitive learning was based on place preference for a 10% sucrose. The c-Fos protein was used as a marker of neuronal activation that is related to plasticity, and its expression was imaged by light-sheet fluorescent microscopy (LSFM). This approach allowed creating a global map showing the increased c-Fos expression in nearly 170 brain structures. Next, *in silico* analysis of neuronal projections between the most activated brain regions were conducted. It was shown that there is a large number of connections between the central nucleus of the amygdala (CeA) and several other structures that were activated during the training.

Next, the types of neurons in which c-Fos expression occurred in response to appetitive learning were identified. Since CeA mostly consists of inhibitory neurons, experiments were conducted on 3 populations of neurons: VIP+, PV+ and SST+. It was shown that during learning of appetitive events, c-Fos is expressed mainly in SST+ neurons and to a small extent in VIP+ and PV+.

The last part of the study involved electrophysiological characterization of SST+ neurons in CeA. It was shown that depending on the CeA part, SST+ neurons are divided into two groups that generate a different type of discharge. Furthermore, it was shown that learning positive events results in the increased excitability of SST+ neurons in the CeA.

The present study shows that appetitive learning leads to global activation of many brain structures. Moreover, it was found that CeA is crucial for the appetitive learning by the activation of SST+ neurons.

## 1. Wstęp

### 1.1 Bodźce apetytywne i awersyjne kierują zachowaniem zwierząt

Przetrwanie organizmu w środowisku jest uzależnione od jego zdolności do rozróżniania czynników korzystnych od niekorzystnych dla życia. Umiejętność ta może być dziedziczona lub może zachodzić w wyniku zapamiętywania przebytych doświadczeń i konsekwencji podjętych wobec nich działań (Bradie, 1986; Slijepcevic, 2021). Proces ten, nazywany uczeniem, pozwala na odpowiednie dostosowanie zachowania osobnika podczas wystąpienia podobnych zdarzeń w przyszłości (Morris i in., 2006). W zależności od charakteru bodźca ludzie i zwierzęta mogą przejawiać wobec niego zachowania asocjacyjne (apetytywne) lub awersyjne (Schultz, 1998). Zachowania apetytywne nacechowane są działaniem motywacyjnym w kierunku bodźca. Zaliczamy do nich kluczowe dla przeżycia i przetrwania gatunku procesy, takie jak pozyskiwanie pokarmu, czy rozmnażanie (Barberini i in., 2012; Seymour i in., 2007). Zachowania awersyjne z kolei pojawiają się w przypadku zagrożenia i zmierzają do jego uniknięcia (Andreatta i Pauli, 2015). W ciągu całego życia zwierzęta doświadczają szerokiego spektrum bodźców pozytywnych i negatywnych, które uruchamiają adaptacyjne reakcje behawioralne. Uważa się, że niektóre z tych reakcji takie, jak np. stroszenie sierści są wrodzone, natomiast pozostałe, które występują pod postacią odruchów warunkowych, są reakcjami nabytymi (Xiao i in., 2022). Przykładem warunkowania prowadzącego do wytworzenia reakcji nabytych jest warunkowanie klasyczne szeroko opisane przez Iwana Pawłowa. Polega ono na skojarzeniu bodźca neutralnego (bodziec warunkowy), na przykład dźwięku lub światła, z bodźcem bezwarunkowym, takim jak na przykład jedzenie. Po wytworzeniu odpowiedniej asocjacji między nimi zwierzę nabywa zdolności do przewidywania nadchodzącego posiłku poprzez skojarzenie bodźca neutralnego z bodźcem bezwarunkowym. W tym przykładzie, u psów zaczyna wydzielać się ślina po usłyszeniu dzwonka, a reakcja ta nazywana jest odruchem warunkowym (Pavlov, 1927).

Innym przykładem reakcji nabytych jest warunkowanie instrumentalne, odkryte i opisane po raz pierwszy przez Jerzego Konorskiego (Konorski, 1948). Uznaje się, że jest to forma uczenia, która polega na wykształceniu przez osobnika relacji pomiędzy danym zachowaniem a następującą po nim konsekwencją. Istotą tego typu warunkowania jest to,



że poprzez zastosowanie bodźców wzmacniających (nagród) oraz bodźców karzących możliwy jest wpływ na prawdopodobieństwo wystąpienia danego zachowania (Skup, 2020).

W przeciwieństwie do reakcji wrodzonych, do ukształtowania się reakcji nabytych dochodzi w wyniku doświadczeń osobniczych. Z neurobiologicznego punktu widzenia doświadczenia osobnicze wpływają na tzw. plastyczność synaptyczną. *Plastycznością synaptyczną* nazywa się zdolność mózgu do wzmocnienia lub osłabienia siły określonych połączeń neuronalnych, zachodzącą pod wpływem przeżytych doświadczeń (Konorski, 1948). Tym samym, zjawisko to jest także niezbędne do kształtowania się zachowań apetytywnych i awersyjnych (Frost i in., 1988; Martin i in., 2000). Z drugiej strony na skutek różnych czynników fizjologicznych i środowiskowych może dojść do ukształtowania się patologicznych form powyższych zachowań. Uważa się, że zakłócenie mechanizmów leżących u podstaw adaptacji do pozytywnych lub negatywnych bodźców środowiskowych może odgrywać kluczową rolę w rozwoju wielu chorób psychicznych (Nord i in., 2018). W piśmiennictwie można znaleźć przykłady występowania zachowań awersyjnych, które prowadzą do stanów lękowych oraz depresji (Eshel i Roiser, 2010; Robinson i in., 2012; Schneider i in., 2004; van der Schaaf i in., 2022). Z kolei niedawno wykazano, że zaburzenia mechanizmów apetytywnych mogą prowadzić do tzw. anhedoni, czyli braku odczuwania przyjemności i w konsekwencji do rozwoju związanej z nią depresji (Liang i Wu, 2022; Rizvi i in., 2017).

Kolejnym przykładem tego, że sygnały środowiskowe nie zawsze wyzwalają zachowania adaptacyjne jest rozwój uzależnień. Uważa się, że uzależnienie od niektórych substancji psychoaktywnych jest patologiczną formą odruchów apetytywnych. Psychoaktywne środki uzależniające poprzez poprawę samopoczucia i wywoływanie stanu euforii oraz jednoczesną redukcję lęku mogą działać podobnie do wzmocnienia apetytywnego (Kostowski, 2006). Jednakże proces przejścia z kontrolowanego przyjmowania substancji uzależniających w stan niekontrolowanego uzależnienia wciąż pozostaje niewyjaśniony. Jedną z hipotez zaproponowanych przez Robinsona i Berridge'a jest twierdzenie, że wraz z używaniem danego środka uzależniającego pragnienie skojarzonej z nim nagrody staje się coraz bardziej silne, a następnie zaczyna stopniowo przejmować kontrolę i dominować nad zachowaniami apetytywnymi (Robinson i Berridge, 1993). Uważa się, że ten sam mechanizm, który motywuje nas do poszukiwania wody pośredniczy w mechanizmie niekontrolowanego poszukiwania i dążenia do zdobycia narkotyku u osób, które wychodzą z uzależnienia (O'Brien i in., 1998). Dlatego, w związku z rosnącym problemem uzależnień występującym w większości społeczeństw oraz coraz częstszym występowaniem zaburzeń depresyjnych,

ważne jest rozpoznanie mechanizmów neuronalnych uczestniczących w przetwarzaniu emocji apetytywnych. W przyszłości może się ono przyczynić do opracowania nowych metod terapii leczenia niektórych zaburzeń neuropsychiatrycznych (Martin-Soelch i in., 2007). Dotychczas znacznie lepiej poznano mechanizmy neuronalne kierujące rozpoznawaniem zdarzeń awersyjnych niż apetytywnych. Prawdopodobnie jest to spowodowane złożonością paradygmatu apetytywnego, który w przeciwieństwie do awersyjnego, dla lepszego zrozumienia wymaga przeprowadzenia bardziej skomplikowanych badań.

## 1.2 Molekularne podłoże procesu uczenia się

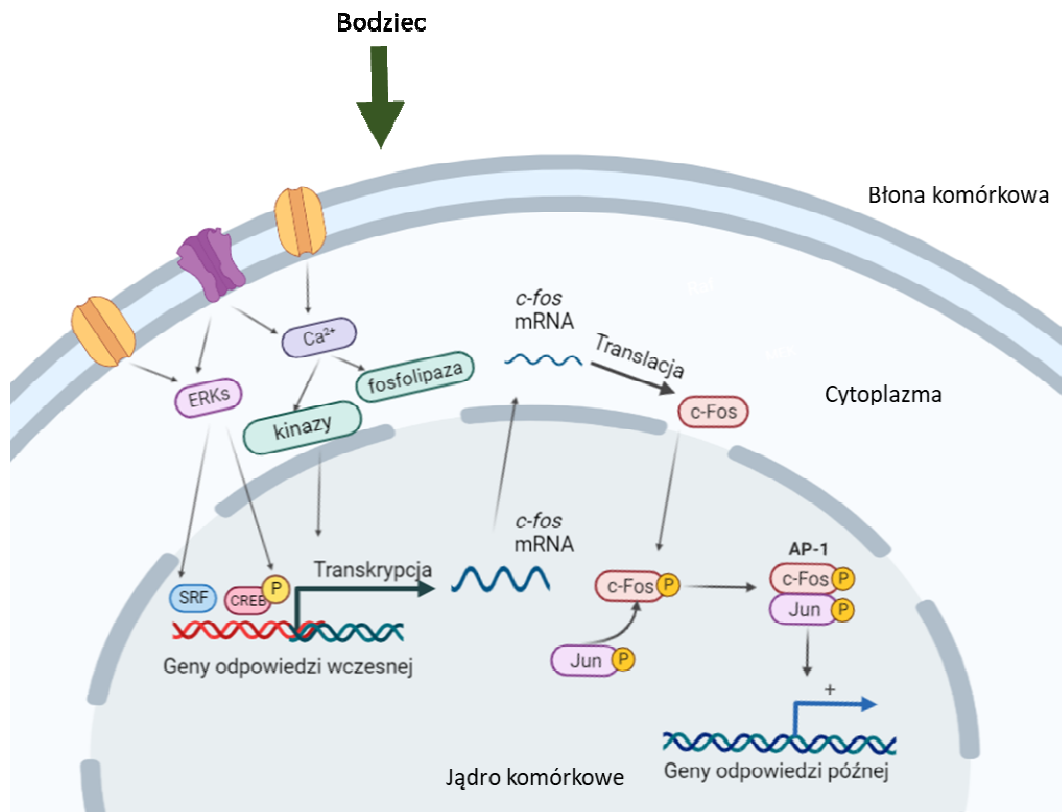
Poznanie zmian neuroplastycznych wywołanych ekspozycją organizmu na bodziec apetytywny lub awersyjny jest niezbędne dla zrozumienia neuronalnych podstaw uczenia się i powstawania śladów pamięci, a tym samym stojących za rozwojem m.in. takich schorzeń, jak depresja, czy też uzależnienia. (Morgan i Curran, 1995). Procesy te mogą być analizowane na wielu poziomach. Najbardziej interesujące, z punktu znalezienia nowych celów terapii farmakologicznych chorób neuropsychicznych, jest poznanie mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za plastyczność synaptyczną. Mechanizmy te zostają aktywowane pojawieniem się bodźca apetytywnego lub awersyjnego i w efekcie prowadzą do zmiany siły połączeń określonych synaps. W wyniku tego procesu bodziec zostaje zapamiętany w kontekście asocjacyjnym lub awersyjnym, w zależności od charakteru jego działania. W przypadku ponownego pojawienia się tego samego bodźca zwierzę wykona określoną reakcję behawioralną opierając się na swoim doświadczeniu. Jedną z pierwszych zmian molekularnych umożliwiających zachodzenie plastyczności synaptycznej jest aktywacja tzw. genów odpowiedzi wczesnej (ang. *immediate early genes*, IEGs) (Gallo i in., 2018). Ich ekspresja przebiega bez uprzedniej syntezy nowych białek i dlatego też zachodzi natychmiastowo po pojawieniu się bodźca (Kaczmarek & Chaudhuri, 1997). Do tej grupy należy około kilkadziesiąt genów kodujących białka będące czynnikami transkrypcyjnymi, które kontrolują kluczowe procesy komórkowe, takie jak cykl komórkowy (Bading i in., 1995). Tym samym ich aktywność musi być ściśle regulowana. Odkrycie, że niektóre czynniki transkrypcyjne ulegają ekspresji pod wpływem uczenia się miało fundamentalne znaczenie dla współczesnej neurobiologii molekularnej. Jednym z najlepiej zbadanych IEGs, którego ekspresja towarzyszy powstawaniu zmian neuroplastycznych podczas uczenia jest *c-fos*. Uważa się, że jego ekspresja jest jednym z pierwszych zdarzeń molekularnych,

do których dochodzi w odpowiedzi na działanie zarówno bodźców apetytywnych, jak i awersyjnych (Curran i Morgan 1987; Jaworski, Kalita, i Knapska 2018; Kaczmarek 1993, 2018).

### 1.3 Ekspresja *c-fos* w neuronach

Białko c-Fos uczestniczy w regulacji cyklu komórkowego i procesie różnicowania komórek, a zaburzenia w jego ekspresji mogą prowadzić do nowotworzenia (Bakin i Curran, 1999; Hu i in., 1994; Kaczmarek i Kamińska, 1989). Gen kodujący białko c-Fos po raz pierwszy został opisany jako homolog wirusowego *v-fos* wywołującego mięsaka kości (Curran i Teich, 1982). Podobnie jak inne białka z rodziny FOS (Fra-1, Fra-2, FosB), białko c-Fos może tworzyć heterodimery z białkami z rodziny JUN (c-Jun, JunB, JunD). Kompleksy c-Fos z JUN funkcjonują razem jako czynnik transkrypcyjny AP-1 (ang. *transcription factor activator protein 1*) (Ryc.1).

Nowopowstały dimer jest zdolny do wiązania się z promotorami lub sekwencjami wzmacniającymi (ang. *enhancers*) niektórych genów i w dalszej konsekwencji do indukowania ekspresji kodowanych przez nie białek (Morgan i Curran, 1991). Warto zauważyć, że jako składnik kompleksu AP-1, c-Fos uważany jest za jeden z najważniejszych czynników molekularnych pozwalający na transdukcję krótkotrwałych bodźców w długotrwałe zmiany neuronalne (Saffen i in., 1988).



**Rycina 1. Schemat przedstawiający wewnętrzne szlaki komórkowe prowadzące do ekspresji *c-fos* oraz indukcji czynnika transkrypcyjnego AP-1, którego częścią jest białko *c-Fos*.** Pobudzenie komórki skutkuje napływem jonów wapnia ( $\text{Ca}^{2+}$ ) przez błonę komórkową do jej wnętrza. Jony  $\text{Ca}^{2+}$  powodują aktywację kinaz, co prowadzi do uruchomienia czynników transkrypcyjnych, takich jak CREB, SRF i in. (Kuzniewska i in., 2013). W konsekwencji tego w jądrze komórkowym następuje transkrypcja genów odpowiedzi wczesnej, w tym genu *c-fos*. Po procesie transkrypcji *c-fos* mRNA transportowany jest do cytoplazmy, gdzie następuje jego translacja. Powstałe białko *c-Fos* powraca do jądra komórkowego, gdzie wraz z białkami rodziny Jun tworzy kompleks AP-1. Kompleks AP-1 odpowiada zaś za regulację transkrypcji genów docelowych (genów odpowiedzi późnej) (zmodyfikowane, za: Chaudhuri i in., 2000)

Ekspresja *c-fos* w komórkach będących w stanie ustalonym utrzymywana jest na stałym poziomie. Do gwałtownego zwiększenia poziomu ekspresji tego białka dochodzi w odpowiedzi na różnorodne czynniki pobudzające (Kaczmarek i Kamińska, 1989). Stwierdzono, że mRNA *c-fos* pojawia się już po około 15 minutach od stymulacji komórki, osiągając poziom maksymalny między 30 a 60 minutą (Curran i Franza, 1988; Kaczmarek i in., 1988). Z dostępnych badań wynika, że po upływie około 6 godzin od stymulacji następuje spadek poziomu mRNA *c-fos* do poziomu uniemożliwiającego jego dalszą detekcję (Nikolaev i in., 1991). W przypadku białka zaobserwowano, że maksymalny poziom *c-Fos* ustala się w czasie od 90 do 120 minut od stymulacji, a po kolejnych 6 godzinach powraca do poziomu wyjściowego (Curran i Morgan, 1987; Zittel i in., 1999).

Badania dotyczące ekspresji c-Fos w neuronach rozpoczęły się pod koniec lat 80-tych, kiedy to po podaniu metrazolu (środek wywołujący drgawki) zaobserwowano specyficzną indukcję mRNA *c-fos* w populacji neuronów *in vivo* (Morgan i in., 1987). Podobnie, zwiększoną ekspresję mRNA *c-fos* zaobserwowano w neuronach zakrętu zębatego szczurów w wyniku elektrycznego roznieciania drgawek (Dragunow i Robertson, 1987). Co więcej indukcję *c-fos* zidentyfikowano w neuronach rdzenia kręgowego po przeprowadzeniu stymulacji sensorycznej (Hunt i in., 1988). Ponadto, wykazano, że wykonanie iniekcji glutaminianu w okolice hipokampa mózgu szczura prowadzi do wyraźnego wzrostu poziomu mRNA *c-fos* w tym obszarze (Kaczmarek i in., 1988). Zaobserwowano również, że obwodowe podanie NMDA skutkuje wzrostem poziomu mRNA *c-fos* w niektórych obszarach mózgu szczura (Morgan i Linnoila, 1991). W innym doświadczeniu podanie myszom i szczurom kainianu, będącego agonistą receptorów dla glutaminianu, również miało wpływ na ekspresję *c-fos*. Zaobserwowano, że kainian znacząco nasilał ekspresję *c-fos* w mózгах badanych zwierząt (Morgan i Curran 1991; Sonnenberg i in. 1989). W konsekwencji dalszych badań zaobserwowano, że poziom mRNA oraz białka c-Fos wzrasta również na skutek treningu behawioralnego (Kaczmarek, 1993). Warto zaznaczyć, że wzmożoną ekspresję c-Fos odnotowano w różnych strukturach mózgu badanych zwierząt (zarówno myszy i szczurów) w wyniku zastosowania treningu rozróżniania bodźców wzrokowych (Lukasiuk i in., 1999), węchowych (Hess i in., 1995; Salcedo i in., 2005) i słuchowych (Carretta i in., 1999; De Hoz i in., 2018). Ponadto, w toku dalszych badań zaobserwowano, że wzrost mRNA i białka c-Fos zachodził po treningu polegającym na rozróżnianiu bodźców przestrzennych w labiryncie Y (Baudonnat i in., 2011) oraz uczeniu apetytywnym (Knapska i in., 2006; Ramirez i in., 2015). Tym samym, wyniki powyższych badań wskazują na istotny związek między ekspresją c-Fos, a plastycznością synaptyczną wywołaną działaniem różnorodnych bodźców oraz procesami uczenia się.

#### **1.4 Białko c-Fos jako marker plastyczności synaptycznej**

Białko c-Fos jest zwykle wykorzystywane jako marker aktywności neuronalnej. (Bullitt, 1990; Morgan i in., 1987). Uważa się także, że c-Fos ulega ekspresji podczas uczenia się i formowania śladów pamięciowych (Kaczmarek, 1993). Wskazują na to wyniki badań uzyskane podczas treningu nabywania tzw. dwukierunkowej reakcji unikania z zastosowaniem bodźca bólowego. W jego wyniku dochodziło do zmian poziomu *c-fos*

podczas kolejnych sesji treningowych. Co istotne, największy poziom mRNA *c-fos* w hipokampie szczura zaobserwowano po przeprowadzeniu pierwszej sesji treningu unikania miejsca. Jednocześnie nie zauważono wzrostu poziomu aktywności tego genu w kolejnych sesjach, podczas których zwierzę wykonywało nauczone czynności (Nikolaev i in., 1992a; Nikolaev i in., 1992b). Należy zaznaczyć, że nawet niewielka zmiana warunków (np. dodanie bodźca słuchowego) występujących podczas wykonywania wyuczonego zadania powodowała wznowienie ekspresji białka c-Fos w tych samych obszarach mózgu, które były aktywne podczas uczenia się (Nikolaev i in., 1992). Na tej podstawie wysunięto wnioski, że ekspresja *c-fos* następuje w trakcie uczenia oraz zasugerowano, że jest ona związana z pojawieniem się elementu nowości danej sytuacji (Grimm & Tischmeyer, 1997).

Kolejnym znaczącym odkryciem było wykazanie zależności pomiędzy efektywnością treningu, a poziomem c-Fos. Mianowicie zwierzęta, które wykonywały wyznaczone zadania treningu z większą efektywnością, charakteryzowały się wyższym poziomem c-Fos w porównaniu do tych, które wykonały zadania z gorszym rezultatem (Martinez i in., 2013). W innych badaniach wykazano, że wyciszenie ekspresji *c-fos* w korze słuchowej myszy przez zastosowanie krótkich fragmentów RNA (shRNA, ang. *short hairpin RNA*) doprowadziło do zaburzenia uczenia się rozróżniania dźwięków. Ponadto zmierzone parametry elektrofizjologiczne świadczyły o wystąpieniu zaburzeń w plastyczności badanych neuronów. Warto zaznaczyć, że zwierzęta te nie miały problemów z poprawnym uczeniem się czynności niepowiązanych z bodźcami słuchowymi, takimi jak unikanie miejsca (De Hoz i in., 2018).

O udziale c-Fos w plastyczności neuronalnej świadczą również wyniki badań nad AP-1. Kompleks AP-1 uczestniczy m.in. w regulacji ekspresji genów kodujących zewnątrzkomórkową proteinazę macierzową MMP-9 (ang. *matrix metalloproteinase 9*) oraz jej inhibitora TIMP-1 (ang. *tissue inhibitor of metalloproteinases 1*) (Rivera i in., 2010; Szklarczyk i in., 2002). Należy podkreślić, że oba wymienione białka odpowiedzialne są za zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych, będących głównym miejscem zachodzenia zmian neuroplastycznych w neuronach (Ganguly i in., 2013; Magnowska i in., 2016; Michaluk i in., 2011; Wang i in., 2008). W warunkowanej reakcji strachu zachodzącej podczas uczenia się, AP-1 może funkcjonować jako pozytywny regulator ekspresji MMP-9 w mózgu (Ganguly i in. 2013). Co więcej, udział c-Fos i MMP-9, w zależnej od doświadczenia plastyczności neuronalnej, zaobserwowano w korze baryłkowej u dorosłych myszy (Kaliszewska i in., 2012). Pokazano, że ekspresja *c-fos* zachodzi w neuronach odpowiedzialnych za powstawanie tzw. *engramów* (śladów pamięciowych). Termin *engram* został wprowadzony przez R. Semona w 1904 roku i odnosi się do trwałych

zmian struktury mózgu, które zachodzą w odpowiedzi na dany bodziec lub doświadczenie (Semon, 1921). Engram przechodzi w stan uspienia, ale może być powtórnie aktywowany poprzez ponowną prezentację bodźca lub w trakcie doświadczenia podobnych zdarzeń (Josselyn i in., 2017). Podczas badań nad IEGs, w tym c-Fos (Flavell i Greenberg, 2008), kilka grup badaczy odkryło, że w ciele migdałowatym (Reijmers i in., 2007), hipokampie (Deng i in., 2013; Tayler i in., 2013) i korze przedczołowej (Zelikowsky i in., 2014), wybrane populacje komórek aktywne podczas nabywania pamięci strachu były preferencyjnie reaktywowane po przywołaniu tego wspomnienia. Wskazuje to na związek ekspresji c-Fos z reorganizacją sieci neuronowych, oraz tworzeniem się połączeń synaptycznych kontrolujących proces zapamiętywania (Gore i in., 2015; Ramirez i in., 2015). Wobec powyższych, mapowanie obecności c-Fos może być cennym narzędziem pozwalającym na identyfikację populacji neuronów uczestniczących w procesach uczenia się i zapamiętywania. Niewątpliwą zaletą wykorzystania c-Fos jako markera plastyczności są wyraźne i łatwe do określenia zmiany w jego aktywności będące wynikiem stymulacji określonymi bodźcami.

## **1.5 Mapowanie aktywności mózgu za pomocą mikroskopii opartej na arkuszu światła**

W ostatniej dekadzie panowało przekonanie, że pojedyncze populacje neuronów kontrolują wybrane procesy poznawcze i kontrolują wystąpienie określonego zachowania (Ruff i Cohen, 2013). Obecnie uważa się, że większość złożonych zachowań jest wynikiem interakcji między odległymi obszarami mózgu, które razem tworzą sieci strukturalno-funkcjonalne (Markicevic i in., 2021). Komunikacja w ich obrębie zachodzi poprzez gęste połączenia synaptyczne, którym towarzyszą komórki glikowe i naczynia krwionośne (Keller i Ahrens, 2015). Bodźce docierające ze świata zewnętrznego i narządów wewnętrznych nieustannie wpływają na aktywność neuronów w różnych regionach mózgu, co prowadzi do wystąpienia określonych reakcji fizjologicznych i behawioralnych. Tym samym, jednym z najważniejszych celów neurobiologii behawioralnej jest zbadanie korelacji pomiędzy aktywnością określonych struktur mózgu, a wystąpieniem danego zachowania. Przeszkodą do jego osiągnięcia jest konieczność obrazowania całej struktury mózgu, gdyż nawet najprostsze zachowania mogą wynikać z interakcji między odległymi od siebie obszarami.

W ostatnich latach nastąpił wyraźny rozwój metod obrazowania, który przyczynił się do znacznie lepszego zrozumienia budowy i funkcji szlaków nerwowych. Jedną z podstawowych technik wykorzystywanych do badań nad aktywnością całego mózgu jest funkcjonalne obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego (fMRI, ang. *functional magnetic resonance imaging*). W badaniach z wykorzystaniem fMRI obrazuje się obszary mózgu, w których dochodzi do zwiększenia zapotrzebowania na tlen. Zwiększone zapotrzebowanie na ten pierwiastek występuje w aktywnych neuronach. Za pomocą tej metody możliwa jest identyfikacja obszarów mózgu aktywowanych konkretnymi zadaniami. Przykładowo, dzięki wykorzystaniu fMRI zidentyfikowano regiony ludzkiego mózgu zaangażowane m.in. w formowanie wspomnień, podejmowanie decyzji, czy stany emocjonalne (Whitten, 2012). Pomimo uzyskania bardzo cennych informacji na temat relacji mózg-zachowanie, zbadanie procesów leżących u podstaw uczenia się i pamięci wymaga przeprowadzania doświadczeń w ściśle kontrolowanych warunkach, z wykorzystaniem modeli zwierzęcych (Markicevic i in., 2021).

Badania z użyciem fMRI przyniosły wiele informacji na temat aktywacji regionów mózgu w odpowiedzi na bodźce wzrokowe (Bailey i in., 2013; Lau, Zhang, i in., 2011; Lau, Zhou, i in., 2011), węchowe (Murphy, Nau, i in., 2016; Murphy, Poplawsky, i in., 2016) oraz słuchowe (Cheung i in., 2012). U szczurów, fMRI jest również szeroko stosowany w badaniach nad udarem (Canazza i in., 2014), padaczką (Blumenfeld, 2007), niedokrwieniem (Chan i in., 2010) i plastycznością (Lau i in., 2015). Z użyciem tej metody wykazano u nich aktywację ciała migdałowatego i podwzgórza podczas przetwarzania bodźców warunkowanych strachem (Brydges i in., 2013). Ostatnie osiągnięcia w zakresie fMRI o wysokiej rozdzielczości przestrzennej pozwalają na nieinwazyjne pomiary *in vivo* z dokładnością do 1 mm. Dzięki temu można u ludzi zidentyfikować obszary mózgu modulowane przez uwagę, nastrój czy pamięć czyli czynniki, które trudno zbadać na modelach zwierzęcych (Lawrence i in., 2019).

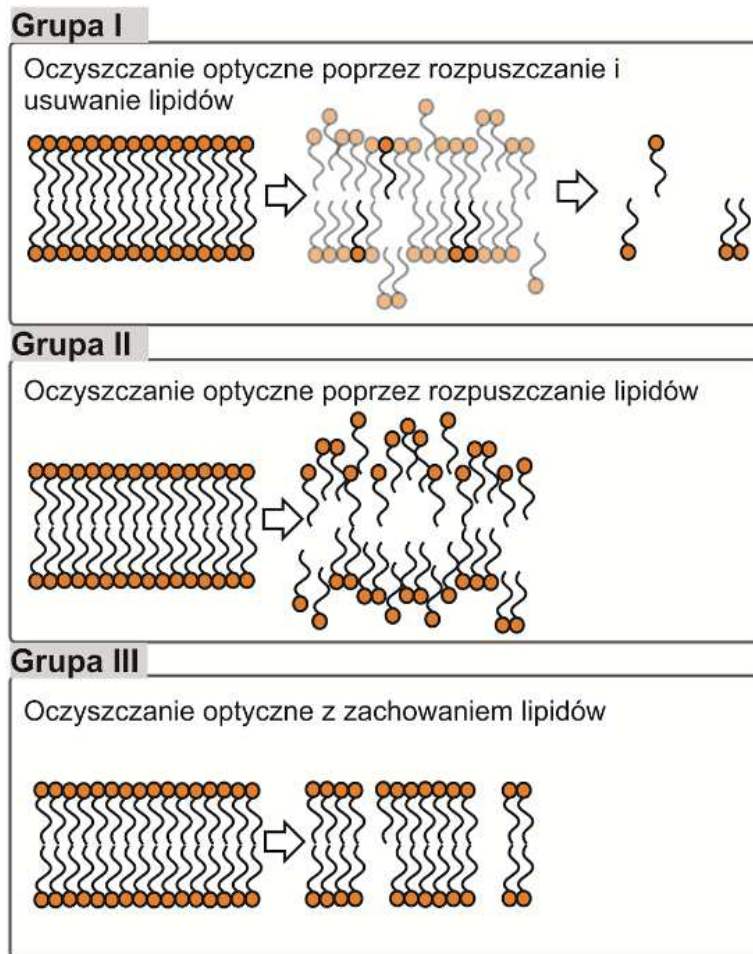
Wykorzystanie fMRI w badaniach neurobiologicznych jednocześnie niesie ze sobą wiele ograniczeń. W szczególności, ograniczenia rozdzielczości uzyskiwanego obrazu nie pozwalają na badanie aktywności neuronalnej na poziomie komórkowym (Logothetis 2008 ; Turner 2016). Częściowym rozwiązaniem tego problemu jest zastosowanie klasycznej mikroskopii optycznej dzięki której można uzyskać obrazy z dokładnością do jednej komórki. W bardziej zaawansowanej mikroskopii konfokalnej i dwufotonowej maksymalna głębokość obrazowania preparatu wynosi odpowiednio kilkaset mikrometrów i jeden milimetr (Helmchen i Denk, 2005). Jednakże, w związku ze skomplikowaną architekturą mózgu,



mikroskopia świetlna, konfokalna i dwufotonowa nie są w stanie dostarczyć pełnej informacji związanej z jego aktywnością. Dostępne techniki mikroskopowe stosowane są zwykle do obrazowania wypreparowanej tkanki przez co nie można obrazować aktywności mózgu pod wpływem zachodzenia zdarzeń w czasie rzeczywistym. Dlatego aby lepiej poznać te zjawiska potrzeba metody obrazowania całego mózgu w rozdzielczości wystarczającej do uchwycenia aktywności pojedynczych komórek oraz całych projekcji.

Opracowanie nowoczesnych narzędzi do zautomatyzowanego obrazowania całych mózgów, połączonych z optycznym oczyszczaniem tkanek oraz z metodami obliczeniowymi do przetwarzania dużych ilości uzyskanych danych, umożliwiło prowadzenie badań neuroanatomicznych z wykorzystaniem modeli zwierzęcych na niespotykaną dotąd skalę. Głównym celem procesu optycznego oczyszczania jest uzyskanie przezroczystej tkanki, charakteryzującej się odpowiednim współczynnikiem załamania światła. Przezroczystość preparatu można uzyskać poprzez chemiczne usunięcie z tkanki czynników rozpraszających światło, takich jak lipidy oraz barwniki endogenne (Silvestri i in., 2016).

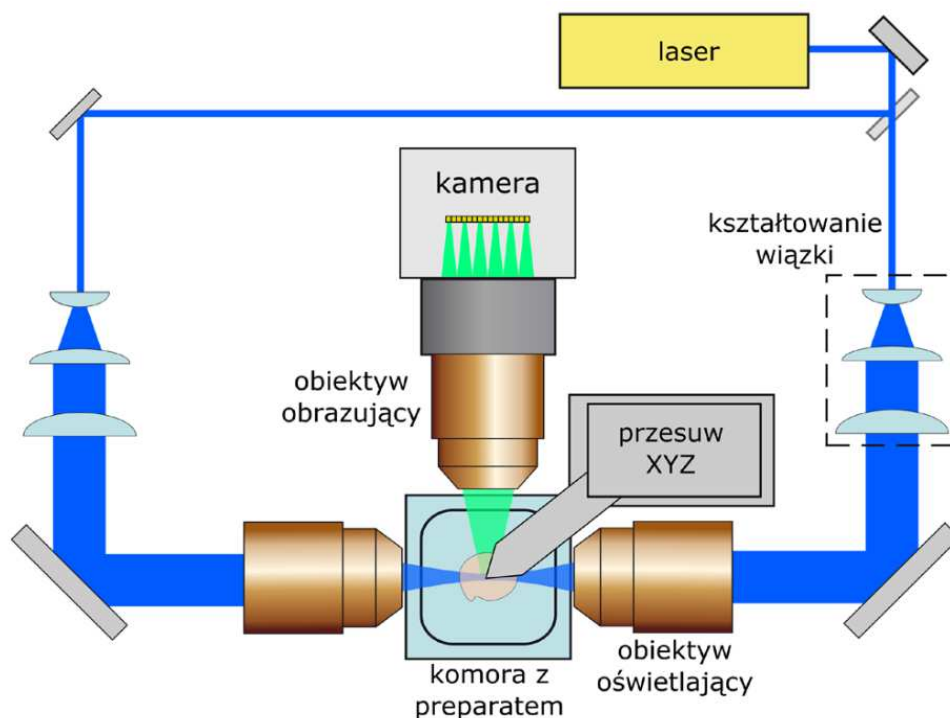
Metody oczyszczania optycznego można podzielić na trzy grupy różniące się sposobem oddziaływania na błony lipidowe, które w głównej mierze obniżają jakość obrazowania powodując rozpraszanie światła w preparacie (Ryc. 2). W grupie pierwszej przezroczystość tkanki uzyskiwana jest poprzez rozpuszczenie i usunięcie lipidów. Druga grupa technik oczyszczania opiera się na usuwaniu wody z tkanki i zakłóceniu integralności błon lipidowych. Trzecia z kolei wykorzystuje oczyszczanie preparatu przebiegające z zachowaniem błon lipidowych. Wybór odpowiedniej metody zależy od właściwości tkanki, takich jak objętość, zabarwienie, zawartość lipidów, poddawanej procedurze oczyszczania (Renier i in., 2014, 2016).



**Rycina 2. Podział metod oczyszczania optycznego tkanek.** Metody oczyszczania optycznego dzielimy na trzy grupy różniące się sposobem oddziaływania na błony lipidowe: Grupa I – błony lipidowe są rozpuszczane a lipidy wypłukane z tkanki, Grupa II – lipidy ulegają rozpuszczeniu co skutkuje zakłóceniem integralności błon, Grupa III – lipidy pozostają zachowane, podczas oczyszczania zachodzi permeabilizacja błon komórkowych (za: Pawłowska, 2017).

Obecnie najszybszą metodą obrazowania całych struktur anatomicznych przy zachowaniu wysokiej rozdzielczości obrazu jest mikroskopia oparta na arkuszu światła (LSFM, ang. *light sheet fluorescence microscopy*) (Albert-Smet i in., 2019; Huisken i in., 2004). Podejście to po raz pierwszy zostało zaproponowane ponad 100 lat temu (Siedentopf i Zsigmondy, 1903), jednakże wykorzystanie jego potencjału możliwe było dopiero w ostatnim dziesięcioleciu dzięki nowoczesnym kamerom, udoskonalonym laserom oraz znacznemu rozwojowi metod oczyszczania tkanek (Keller i Ahrens, 2015). Największą zaletą mikroskopii LSFM jest to, że pozwala ona na wydajne i szybkie obrazowanie preparatów w wymiarze 3D i 4D. Aby otrzymać obraz o wysokiej rozdzielczości należy uzyskać

optyczne przekroje tkanki. Dzięki zastosowaniu optycznego podziału preparatu, powstający obraz tworzony jest z pojedynczej warstwy tkanki. Uzyskanie takiego efektu możliwe jest dzięki użyciu dwóch rodzajów obiektywów, oświetlającego oraz zbierającego fluorescencję (Ryc. 3). Niezwykle istotnym elementem układu optycznego jest odpowiednie ustawienie obiektywów, które są usytuowane tak aby ich osie optyczne tworzyły kąt prosty. Ponadto, przed obiektywem oświetlającym zamieszczona jest soczewka cylindryczna, odpowiedzialna za kształtowanie wiązki światła. Zastosowanie soczewki cylindrycznej powoduje, że wiązka lasera formowana jest w postaci arkusza, oświetlając jedynie pojedynczą płaszczyznę próbki (Pawłowska i in., 2019). Mikroskopia LSMF przejawia znaczne korzyści w porównaniu z tradycyjnym skanowaniem punktowym, przede wszystkim pod względem wydajności świetlnej, niskiej fototoksyczności i wysokiej prędkości obrazowania wolumetrycznego (Engelbrecht i Stelzer, 2006).



**Rycina 3. Schemat budowy mikroskopu opartego na arkuszu światła LSMF.** Wzbudająca wiązka lasera dzielona jest na dwie części, aby umożliwić dwustronne oświetlenie preparatu. Następnie wiązka jest rozszerzana za pomocą teleskopu i formowana w arkusz świetlny dzięki soczewce cylindrycznej. Preparat zanurza się w komorze wypełnionej cieczą o dopasowanym współczynniku RI. Oświetlona płaszczyzna preparatu obrazowana jest na kamerze o wysokiej rozdzielczości z obiektywem detekcyjnym umieszczonym prostopadłe do osi oświetlenia. Ruchomy stolik, przesuwa preparat w celu zobrazowania całej objętości preparatu i uzyskania obrazu 3D (za: Pawłowska, 2017).

Obrazowanie całych organów w LSM jest możliwe po uprzednim oczyszczeniu optycznym tkanki (Richardson i Lichtman 2015). W niniejszych badaniach posłużono się techniką iDISCO+ (Renier i in., 2014), zakwalifikowaną do drugiej grupy opisywanych wyżej metod oczyszczania optycznego. Zdecydowano się na użycie tej metody ze względu na możliwość równoczesnego znakowania immunofluorescencyjnego c-Fos w neuronach, które uległy aktywacji w wyniku treningu behawioralnego. Pozwoliło to na zmapowanie aktywowanych populacji neuronów, a także pojedynczych komórek znajdujących się od siebie w dużej odległości. Przykłady zastosowania kombinacji wyżej wymienionych technik można również odnaleźć w piśmiennictwie. Mapowanie aktywowanych procesem uczenia się neuronów za pomocą detekcji ekspresji białek kodowanych przez geny wczesnej odpowiedzi, takich jak c-Fos, połączonej z obrazowaniem całego mózgu w mikroskopie LSM zostało dotychczas zastosowane w kilku badaniach. Przykładowo LSM wykorzystano do zobrazowania aktywności wielu obszarów mózgu podczas warunkowania strachu (Bonapersona i in., 2022, Roy i in., 2022), stymulacji wibrys (Renier i in., 2016), a także w trakcie przyjmowania kokainy (Kimbrough i in., 2021). W związku z powyższym w niniejszych badaniach wykorzystano opisane powyżej mapowanie białka c-Fos w całym mózgu w procesie uczenia się zdarzeń pozytywnych zwierząt poddanych treningowi preferencji miejsca.

## **2. Cele pracy**

Głównym celem niniejszej pracy było zmapowanie za pomocą znakowania c-Fos obszarów mózgu, w których dochodzi do zainicjowania procesu plastyczności synaptycznej wywołanej uczeniem apetytywnym.

Szczegółowe cele badawcze obejmowały następujące zagadnienia:

1. Stworzenie globalnej mapy struktur mózgowych wykazujących ekspresję białka c-Fos podczas treningu apetytywnego.
2. Wytypowanie kluczowych struktur zaangażowanych w proces uczenia apetytywnego.
3. Identyfikacja poszczególnych typów neuronów wykazujących ekspresję białka c-Fos w odpowiedzi na uczenie apetytywne.
4. Charakterystyka fizjologicznych cech wyselekcjonowanych typów neuronów oraz zachodzących w nich zmian pobudliwości podczas uczenia apetytywnego.

### 3. Materiały i metody

#### 3.1 Zwierzęta wykorzystane w doświadczeniach

W niniejszej pracy przeprowadzono badania z wykorzystaniem myszy (*Mus musculus*). Wszystkie doświadczenia behawioralne były przeprowadzone zgodnie z obowiązującą Dyrektywą Parlamentu Europejskiego i Rady Unii Europejskiej 2010/63/UE ustanowionej dnia 22 września 2010 r. w kwestii ochrony zwierząt wykorzystywanych do badań naukowych oraz za zgodą I Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie (numer zgody LKE 128/2016). Zwierzęta, które zostały wykorzystane do przeprowadzenia doświadczeń pochodziły z The Jackson Laboratory w USA, jak również z hodowli znajdującej się w Zwierzętarni Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego w Warszawie oraz z Centrum Medycyny Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

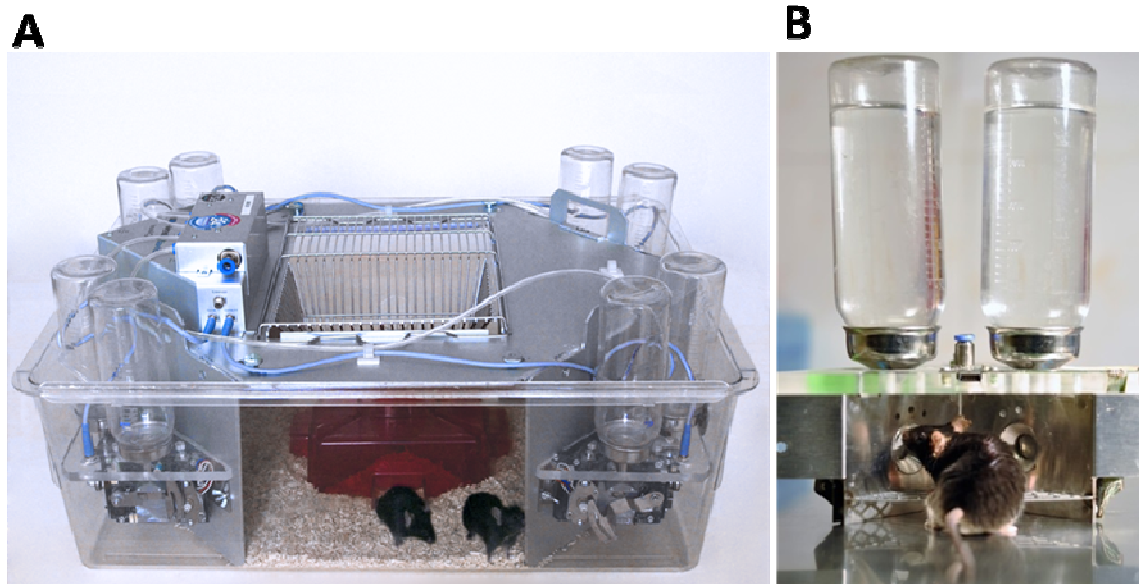
Wszystkie eksperymenty przeprowadzane były z wykorzystaniem myszy w wieku od 8 do 12 tygodni. Przed rozpoczęciem procedur behawioralnych myszy hodowane były w klatkach domowych, po pięć osobników na klatkę, z dostępem do wody i paszy bez ograniczeń, w warunkach doby częściowo odwróconej, w cyklu 12 godzin światła/12 godzin ciemności. Zwierzęta miały zapewnioną odpowiednią temperaturę otoczenia (20-22°C) oraz kontrolowaną wilgotność powietrza (40-50%). Część eksperymentów przeprowadzana była z wykorzystaniem myszy szczepu dzikiego C57BL6 pochodzącego z Zwierzętarni Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego w Warszawie oraz z Centrum Medycyny Doświadczalnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. W innych doświadczeniach behawioralnych zastosowano trzy linie myszy transgeniczných dostarczone przez The Jackson Laboratory: SST-Cre, VIP-Cre oraz PV-Cre (numery katalogowe szczepów: odpowiednio 013044, 010908 oraz 008069) (Taniguchi i in., 2011). Zwierzęta te posiadają sekwencję genu rekombinazy Cre pod promotorem genu kodującego somatostatynę (SST), parwalbuminę (PV) lub naczynioruchowy polipeptyd jelitowy (VIP). Dzięki wprowadzeniu sekwencji Cre pod kontrolą odpowiedniego promotora uzyskano zmiany w materiale genetycznym organizmu w specyficznie określonych typach komórek. Do procedur doświadczalnych wykorzystano linie myszy podwójnie transgeniczných, czyli: SST-Ai14, VIP-Ai14 i PV-Ai14, które powstały po skrzyżowaniu homozygotycznych myszy ww. linii transgeniczných Cre z homozygotycznymi myszami linii Ai14 (numer katalogowy szczepu:

007914). Myszy transgenicznej linii Ai14 wykazują ekspresję białka czerwonej fluorescencji - tdTomato, w wyniku działania rekombinazy Cre (Madisen i in., 2010). Oznacza to, że potomstwo powstałe po skrzyżowaniu tych dwóch linii (Ai14 × SST-Cre, Ai14 × PV-Cre oraz Ai14 × VIP-Cre) wykazywało będzie ekspresję białka czerwonej fluorescencji wyłącznie w komórkach wykazujących obecność somatostatyny, parwalbuminy lub naczynioruchowego polipeptydu jelitowego.

### 3.2 Badania behawioralne

#### 3.2.1 System klatek IntelliCage

Doświadczenia behawioralne zostały przeprowadzone w klatkach IntelliCage (TSE NewBehavior) (Kiryk i in., 2020). IntelliCage to klatka domowa o wymiarach 55×37,5×20,5 cm pozwalająca na zautomatyzowane testowanie zachowania zwierząt żyjących w grupach od 10 do 16 osobników (Ryc. 4).



**Rycina 4. Klatka IntelliCage.** (A) Widok ogólny, widoczne cztery rogi wyposażone w butelki. Po środku widoczne schronienie dla zwierząt. (B) Róg doświadczalny. Widoczne dwie butelki. Mysz na zdjęciu wykonuje puknięcie nosem, tzw. *nosepoke* do jednej z butelek.

Klatka IntelliCage posiada cztery rogi doświadczalne podłączone do panelu sterującego. Do każdego rogu prowadzi otwór o średnicy około 3 cm zaopatrzony w czujnik temperatury oraz specjalną antenę, która dzięki wcześniej wszczepionemu podskórnie identyfikatorowi (transponder) rozpoznaje zwierzę wchodzące do rogu. Po wejściu do rogu mysz ma dostęp do dwóch otworów (prawa i lewa strona) (Ryc. 4B) ograniczonych ruchomymi drzwiczkami, za którymi znajdują się dwie butelki z wodą. U ich wejścia zlokalizowane są czujniki, które rejestrują tzw. instrumentalną reakcję puknięcia nosem (ang. *nosepoke*), która prowadzi do otwarcia drzwiczek i uzyskania dostępu do butelek np. z wodą. Dodatkowo, każda strona rogu wyposażona jest w system diod LED, które mogą dostarczać zwierzęciu bodźce wizualne. Butelki, w zależności od kontekstu doświadczenia, mogą być wypełnione wodą lub roztworem sacharozy. Po kontakcie zwierzęcia z poidelkiem następuje rejestracja liczby wypitych kropeł płynu oraz czasu kontaktu zwierzęcia z butelką. Dzięki ruchomym drzwiczkom dostęp do butelek może być sterowany komputerowo bez kontaktu zwierząt z eksperymentatorem. Wielkość rogu została zaprojektowana tak, aby zmieściło się w nim tylko jedno zwierzę. System pozwala także na zastosowanie bodźców awersyjnych. Mianowicie każdy róg wyposażony jest w zawór z rurką doprowadzającą sprężone powietrze. Dzięki temu możliwe jest skierowanie sprężonego powietrza w kierunku zwierzęcia (tzw. *air-puff*) podczas wizyty w rogu klatki. Wszystkie aktywności zwierząt, m.in. wizyty w rogu, liczba wykonanych *nosepoke* i wypitych kropeł są rejestrowane i przesyłane do komputera sterującego, który przechowuje zbierane informacje. Środowisko wewnątrz klatki wzbogacone jest czterema domkami. Klatka zamykana jest metalową kratką, w której umieszczone jest pożywienie. System IntelliCage jest kontrolowany przez oprogramowanie stworzone przez firmę NewBehavior. Do projektowania schematów doświadczalnych wykorzystywane jest narzędzie IntelliCage Plus Designer. W bezpośredniej kontroli doświadczenia używa się oprogramowania IntelliCage Plus Controller, natomiast do analizy uzyskanych wyników wykorzystuje się IntelliCage Plus Analyzer. Dane eksperymentalne są zapisywane i przechowywane na dysku dzięki czemu można je analizować w trybie *offline*. Klatka IntelliCage to w pełni zautomatyzowane narzędzie do testowania zachowania zwierząt, począwszy od prostego monitorowania aktywności myszy, po skomplikowane warunkowania instrumentalne czy badanie motywacji i uzależnień (Iman i in., 2021).

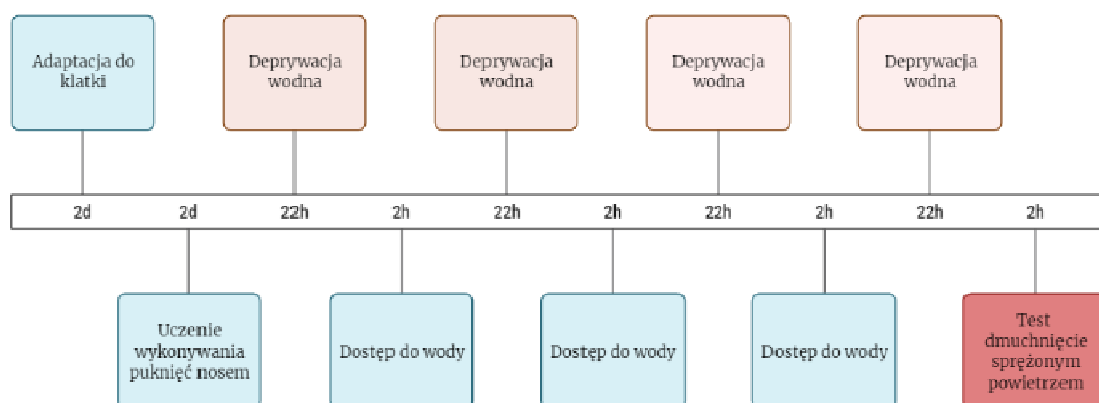




butelki z wodą. Drzwiczki dające dostęp do wody były zamknięte i otwierały się w momencie poprawnego wykonania tej czynności. W kolejnym etapie doświadczenia aby zwiększyć motywację zwierząt do poszukiwania płynów, dostęp do wody został częściowo ograniczony. Przez kolejne 3 doby drzwiczki dające dostęp do wody otwierały się wyłącznie przez 2 godziny, codziennie, o tej samej porze, wraz z rozpoczęciem fazy ciemnej. W trakcie ostatniej sesji picia wody dla każdego zwierzęcia został wybrany róg z najmniejszą liczbą wizyt (róg najmniej preferowany). Ostatniego dnia treningu, po 22 godzinnej deprivacji wodnej, w rogach najmniej preferowanych zostały umieszczone butelki z roztworem 10% sacharozy (bodziec apetytywny). W trakcie tej sesji zwierzęta miały wykształcić preferencję miejsca do rogu zawierającego butelki z 10% sacharozą. Grupa zwierząt kontrolnych we wszystkich rogach, zamiast roztworu 10% sacharozy dostawała wodę. Zwierzęta zostały uśmiercone po upływie 1,5 - 2 godz. od pierwszego kontaktu z roztworem 10% sacharozy, a ich mózgi zostały zachowane do dalszych analiz opisanych w rozdziale 3.3.

### **3.2.3 Trening unikania miejsca w klatce IntelliCage**

Podczas treningu unikania miejsca myszy uczyły się omijania jednego z czterech rogów eksperymentalnych w klatce, po zadziałaniu w nim bodźca awersyjnego. Pierwsze dni doświadczenia były takie same jak w przypadku treningu preferencji miejsca. Na Rycinie 6 przedstawiono schemat treningu awersyjnego.



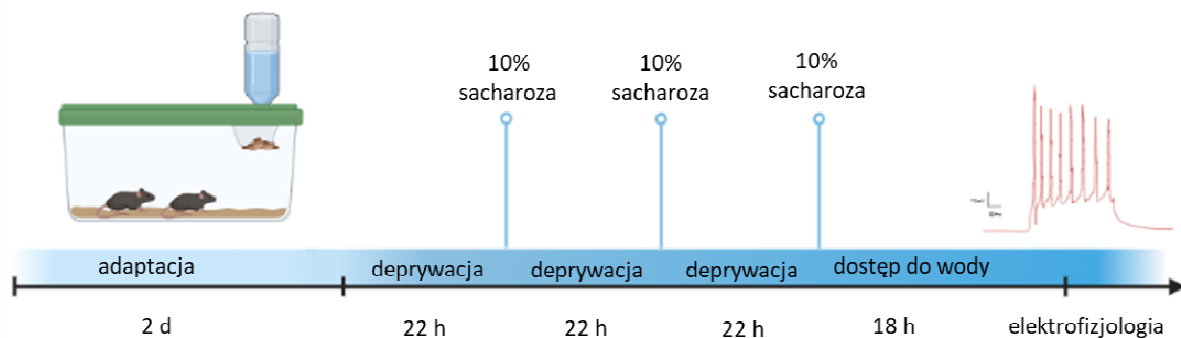
**Rycina 6. Schemat treningu unikania miejsca przeprowadzonego w klatce IntelliCage.**

Po upływie dwóch dni adaptacji do klatki zwierzęta uczyły się wykonywania *nosepoke*, w celu uzyskania dostępu do wody (2 dni). Następnie, przez kolejne 3 dni dostęp do wody został limitowany do 2 godzin w ciągu dnia. Ostatniego dnia treningu, w rogach najbardziej preferowanych dostęp do wody został utrudniony poprzez zastosowanie dmuchnięcia sprężonym powietrzem (bodziec awersyjny). Zwierzęta miały nieograniczony dostęp do wody.

Sesja treningowa rozpoczynała się od 2 dniowej adaptacji do klatki, podczas której drzwiczki do wody pozostawały stale otwarte (Ryc. 6). Następne 2 dni treningu polegały na uczeniu się zwierząt poprawnego wykonywania *nosepoke* w stronę otworu prowadzącego do butelki z wodą. Przez kolejne 3 doby drzwiczki dające dostęp do wody otwierały się wyłącznie przez 2 godziny, codziennie, o tej samej porze, wraz z rozpoczęciem fazy ciemnej. W pozostałej części doby dostęp do wody był ograniczony. W trakcie ostatniej sesji picia wody dla każdego zwierzęcia został wybrany róg z największą liczbą wizyt (róg preferowany). Ostatniego dnia treningu, po 22 godzinnej deprywacji wodnej, dostęp do wody w rogu preferowanym został utrudniony. Po wejściu do tego rogu mysz była traktowana bodźcem awersyjnym, czyli dmuchnięciem sprężonego powietrza w nos. Zwierzęta zostały uśmiercone po upływie 1,5 - 2 godz. od pierwszego kontaktu z bodźcem awersyjnym, a ich mózgi zostały zachowane do przeprowadzania barwienia immunofluorescencyjnego w kierunku c-Fos (patrz Immunodetekcja białka c-Fos, część 3.3.3)

### 3.2.4 Trening apetytywny w klatce domowej - pomiary pobudliwości neuronalnej

W celu sprawdzenia wpływu treningu apetytywnego na pobudliwość neuronów przeprowadzono doświadczenie behawioralne z bodźcem apetytywnym w postaci 10% sacharozy. Schemat doświadczenia został przedstawiony na Rycinie 7. Myszy trzymano parami w klatkach domowych w cyklu 12 godz. światła/12 godz. ciemności. Zwierzęta otrzymywały pokarm i wodę *ad libitum*. Aby zwiększyć motywację do poszukiwania 10% roztworu sacharozy przez kolejne 3 dni, myszy czasowo pozbawiono wody. Zwierzęta miały dostęp do picia tylko przez 2 godziny dziennie, codziennie o tej samej porze fazy aktywnej. W grupie apetytywnej myszy dostawały wodę z 10% sacharozą, podczas gdy w grupie kontrolnej myszom podawano wodę. Po ostatniej sesji picia 10% sacharozy butelki zastąpiono wodą. Myszy uśmiercono około 24 godzin po ostatnim kontakcie z roztworem sacharozy, a ich mózgi pobrano do analiz elektrofizjologicznych.



**Rycina 7. Schemat treningu apetytywnego przeprowadzonego w klatce domowej z wykorzystaniem myszy SST-Ai14.** Trening polegał na podawaniu zwierzętom 10% roztworu sacharozy przez 3 kolejne dni o tej samej porze, po uprzedniej deprivacji. Zwierzęta z grupy kontrolnej zamiast roztworu 10% sacharozy miały podawaną wodę. Mózgi zwierząt poddanych treningowi zostały wykorzystane do przeprowadzenia analiz elektrofizjologicznych.

### **3.3 Doświadczenia laboratoryjne**

#### **3.3.1 Przygotowanie mózgów do znakowania immunofluorescencyjnego**

Po zakończeniu doświadczeń behawioralnych (opis zastosowanych treningów patrz punkt: 3.2.2 i 3.2.3) myszy zostały poddane anestezji wziewnej przy użyciu izofluranu (Aerrane, Baxter) i eutanazji za pomocą pentobarbitalu sodu w dawce 100 mg/kg masy ciała (Biowet, nazwa handlowa: Morbital®). Następnie myszy poddano perfuzji przezsercowej, poprzez umieszczenie w lewej komorze serca igły z obciętym końcem i rozcięciem prawego przedsionka. Procedura rozpoczynała się od wypompowania z krwioobiegu krwi poprzez przepuszczenie przezzeń około 50 ml zbuforowanego roztworu 0,01 M PBS (ang. *phosphate buffered saline*, Thermo Fisher Scientific). Epitopy utrwalono za pomocą około 50 ml 4% roztworu paraformaldehydu rozpuszczonego w 0,01 M PBS, pH=7,4 (PFA, Sigma-Aldrich). Po zakończeniu perfuzji mózgi wypreparowano, a następnie umieszczono w pojemnikach wypełnionych roztworem 4% PFA i inkubowano przez noc w temperaturze 4°C w celu wzmocnienia utrwalenia.

#### **3.3.2 Przygotowanie skrawków mózgów**

Po całonocnej inkubacji w 4% PFA, utrwalone mózgi przepłukano 3 razy roztworem 0,01 M PBS. Mózgi skrojono na skrawki przy użyciu wibratomu (Leica VT1000S) celem ich przygotowania do oznaczeń immunofluorescencyjnych. Utrwaloną tkankę przyklejono do stolika wibratomu. Komorę do krojenia wypełniono schłodzonym (4°C) roztworem 0,01 M PBS i obłożono z zewnątrz lodem. Następnie wibrującym ostrzem mózgi cięto w płaszczyźnie czołowej na skrawki o grubości 40 µm. Skrawki wykorzystywane do dalszych oznaczeń umieszczano w szalkach 24-dołkowych wypełnionych 0,01 M PBS i przechowywano w temperaturze 4°C. Przed rozpoczęciem dalszych procedur skrawki przechowywano w lodówce w roztworze 0,01 M PBS z dodatkiem 0,02% azydku sodu (NaN<sub>3</sub>).

### 3.3.3 Immunodetekcja białka c-Fos w skrawkach mózgu

W celu wytypowania neuronów, w których dochodzi do zmian plastycznych w odpowiedzi na bodźce apetytywne i awersyjne przeprowadzono znakowanie immunofluorescencyjne c-Fos. Wybrane skrawki przełożono do szalki 12-dółkowej, po 3 skrawki na każdy dołek. Do każdego dołka dodano 500 µl PBS i płukano przez 5 min w temperaturze pokojowej na wytrząsarce laboratoryjnej. Następnie odciągnięto PBS i dodano 500 µl buforu do permeabilizacji błon komórkowych (0,25% TritonX-100/PBS) i inkubowano przez 10 min w temperaturze pokojowej na wytrząsarce laboratoryjnej. Permeabilizacja ma na celu rozluźnienie struktury błony komórkowej, umożliwiając przez to wnikanie przeciwciał w głąb komórek. W dalszej kolejności roztwór do permeabilizacji został odciągnięty i skrawki przepłukano PBS. Kolejnym krokiem było dodanie buforu blokującego, który zmniejsza sygnał tła wynikający z niespecyficznego wiązania się przeciwciał drugorzędowych. W tym celu skrawki poddano 3 godzinnej inkubacji z buforem blokującym (3% BSA/0,1% TritonX-100/PBS) w temperaturze pokojowej, zawierającym białko albuminy surowicy bydlęcej. Po skończonej inkubacji bufor blokujący odciągnięto i dodano 300 µl roztworu z przeciwciałem pierwszorzędowym anty c-Fos (Synaptic System, nr. kat: 226004) rozcieńczonym w stosunku 1:1000, w 10× rozcieńczonym buforze do blokowania (0,3% BSA /0,1% TritonX-100/PBS). Inkubację z przeciwciałem pierwszorzędowym przeprowadzono w temperaturze 4°C, na wytrząsarce kołyskowej przez noc (16-18 godzin). Następnego dnia nadmiar niezwiązanego przeciwciała pierwszorzędowego usunięto poprzez trzykrotne, 10 minutowe płukanie skrawków w 0,01 M PBS na wytrząsarce laboratoryjnej, w temperaturze pokojowej. W dalszej kolejności, skrawki inkubowano z przeciwciałem drugorzędowym w roztworze 0,3% BSA/PBS, przez dwie godziny, w temperaturze pokojowej na wytrząsarce laboratoryjnej. Po zakończeniu inkubacji skrawki przepłukano trzykrotnie po 10 minut w 0,01 M PBS oraz nałożono na adhezyjne mikroskopowe szkiełka podstawowe pokryte polilizyną (Menzel-Gläser, nr katalogowy: J2800AMNZ; nazwa handlowa: Polysine®). Następnie skrawki zostały wysuszone i zatopione w płynnym medium do zamykania preparatów, zawierającym fluorescencyjny barwnik jąder komórkowych DAPI (4',6-diamidyno-2-fenylindol) (Fluoromount-G™ Mounting Medium, with DAPI, Invitrogen™, numer katalogowy: 00-4959-52) i przykryte szkiełkiem nakrywkowym. Tak przygotowane preparaty zostały pozostawione w ciemności do wyschnięcia przez noc.

### **3.3.4 Obrazowanie w mikroskopie konfokalnym**

Wszystkie preparaty skrawków mózgow były obrazowane za pomocą mikroskopu konfokalnego z wirującym dyskiem (Zeiss Spinning Disk). Mikroskopia konfokalna jest odmianą mikroskopii fluorescencyjnej. Jej zaletą jest zastosowanie przesłony konfokalnej u wejścia do detektora, która odcina światło pochodzące spoza miejsca ogniskowania, dzięki czemu uzyskujemy wzrost stosunku sygnału do szumu. W konsekwencji otrzymujemy obraz z większym kontrastem i lepszą rozdzielczością, zwłaszcza w osi Z, co ułatwia późniejszą interpretację obrazu. Obszary obejmujące wybrane regiony mózgu obrazowano za pomocą suchego obiektywu z 20× powiększeniem (Plan Aplanachromat 20×, NA=0.8, WD=0.55). Obraz zbierano w osi Z na głębokość około 30 μm w głąb skrawka, zaczynając od jego powierzchni. Zdjęcia zbierano jako serię pojedynczych zdjęć w osi Z, z zachowaniem odstępu między zdjęciami równemu 2 μm. Sygnał wzbudzano laserami o długości fali odpowiedniej dla użytego znacznika fluorescencyjnego. Analizę obrazów przeprowadzono za pomocą programu opartego na oprogramowaniu Java - ImageJ (Schneider i in., 2012).

### **3.3.5 Przygotowanie mózgow do oczyszczania optycznego metodą iDISCO+**

Oczyszczanie optyczne mózgow prowadzono zgodnie z ustalonym protokołem (Renier i in., 2014). Po wyjęciu z 4% PFA, mózgi przepłukano 3 razy po 15 min w 0,01 M PBS oraz przecięto na półkule. Następnie całe półkule mózgowe odwadniano we wzrastającym szeregu stężeń metanol/woda, kolejno: 20, 40, 60, 80 i 100%, po 1 godz. w każdym stężeniu, w temperaturze pokojowej. Następnie próbki inkubowano przez 1 godz. w 100% metanolu w temperaturze pokojowej, po czym je schłodzono do 4°C. W kolejnym kroku, próbki inkubowano przez całą noc z wytrząsaniem, w mieszaninie 66% dichlorometan/33% metanol, w temperaturze pokojowej. Następnie zostały dwukrotnie przepłukane w 100% metanolu w temperaturze pokojowej i inkubowane w świeżo przygotowanym, schłodzonym 5% nadtlenu wodoru w metanolu (1:5, v/v), przez noc w 4°C. Po zakończeniu inkubacji mózgi ponownie nawodniono przy użyciu malejącego szeregu stężeń metanol/woda, kolejno: 80, 60, 40 i 20%. Próbki inkubowano w każdym stężeniu przez 1 godz., w temperaturze pokojowej. Resztki metanolu z mózgow wypłukano za pomocą 0,01 M PBS (1 h, temperatura pokojowa). Ostatnim krokiem przygotowania tkanki mózgowej

było dwukrotne przepłukanie próbek w buforze PTx.2 (0,2% TritonX-100/PBS), przez 1 godz. każde, w temperaturze pokojowej. Tak przygotowane półkule mózgowe poddano dalszym etapom, mianowicie znakowaniu immunofluorescencyjnemu i oczyszczaniu optycznemu.

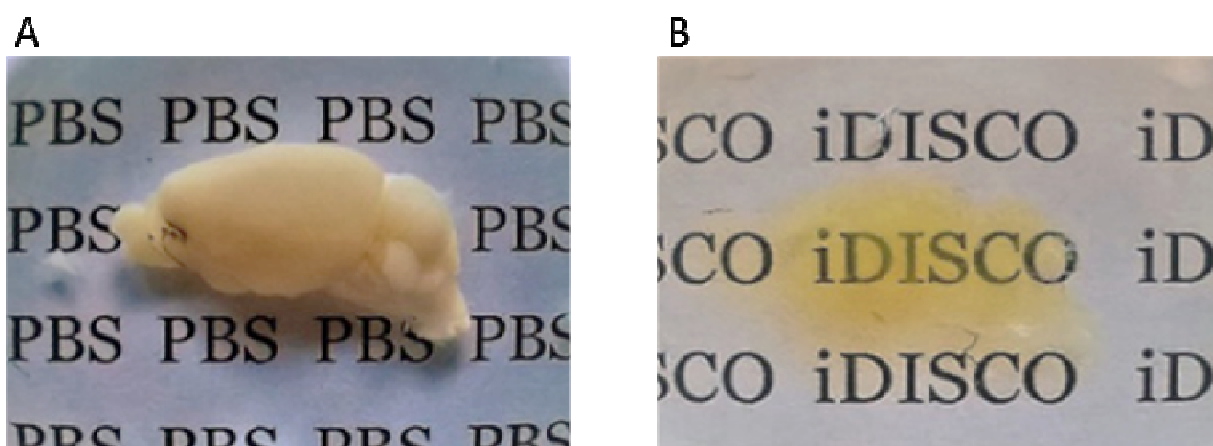
### **3.3.6 Immunodetekcja c-Fos w półkulach mózgowych**

Półkule mózgowe przełożono do szczelnie zamykanych 5 ml probówek typu Eppenderof. Wszystkie dalsze kroki wykonywano tak aby zapobiec oksydacji próbek, która wpływa niekorzystnie na oczyszczanie tkanki. Pierwszym etapem znakowania immunofluorescencyjnego była inkubacja w buforze do permeabilizacji. Próbki inkubowano przez dwa dni na kołysce rotacyjnej w temperaturze 37°C. W dalszej kolejności mózgi inkubowano w buforze blokującym na wytrząsarce rotacyjnej, w cieplarni, w temperaturze 37°C, przez trzy dni. Następnie do mózgow dodano roztwór zawierający przeciwciało pierwszorzędowe skierowane przeciwko c-Fos (1:500, Synaptic Systems, nr.kat: 226004) i inkubowano przez 7 dni na wytrząsarce rotacyjnej, w cieplarni, w temperaturze 37°C. Po upływie tego czasu próbki wypłukano 5-krotnie w buforze do płukania PTwH, po 1 godz. na każde płukanie, na kołysce rotacyjnej w temperaturze pokojowej. W dalszej części doświadczenia do próbek dodano przeciwciało drugorzędowe, uprzednio zwirowane w wirówce (20000 g, 10 min), a następnie rozpuszczone w buforze (PTwH/3% surowica ośla) z dodatkiem 120 µg witaminy C. Mózgi ponownie inkubowano przez tydzień na wytrząsarce rotacyjnej, w temperaturze 37°C. Po inkubacji z przeciwciałem drugorzędowym mózgi wypłukano 5-krotnie w buforze do płukania PTwH, po 1 godz. na każde płukanie, na wytrząsarce rotacyjnej w temperaturze pokojowej. Po zakończeniu procedury znakowania immunofluorescencyjnego mózgi były gotowe do dalszych etapów oczyszczania optycznego.



### 3.3.6 Oczyszczanie optyczne półkul mózgowych

Procedurę przeprowadzono zgodnie z protokołem opracowanym przez (Renier i in., 2014). Po znakowaniu immunofluorescencyjnym mózgi odwadniano we wzrastającym szeregu stężeń metanol/woda, kolejno: 20, 40, 60, 80, oraz 2-krotnie w 100%, po 1 godz. W każdym stężeniu, na kołyszce rotacyjnej i temperaturze pokojowej i pozostawiono na noc w 100% metanolu. Następnego dnia inkubowano je przez 3 godz. w mieszaninie 66% DCM / 33% metanol w temperaturze pokojowej, z wytrząsaniem. Następnie, aby dokładnie usunąć resztki metanolu, powyższą mieszaninę zastąpiono 100% DCM w którym próbki płukano 2-krotnie po 15 minut, z wytrząsaniem. Ostatecznie mózgi płukano w eterze dibenzylu, bez wytrząsania i przechowywano w temperaturze pokojowej. W tym etapie szczególną uwagę poświęcono całkowitemu wypełnieniu probówki eterem dibenzylu, tak aby wyeliminować dostęp powietrza i zapobiec utlenianiu próbki. Po tej procedurze mózgi były przezroczyste i gotowe do obrazowania w mikroskopie opartym na arkuszu światła (Ryc. 8).

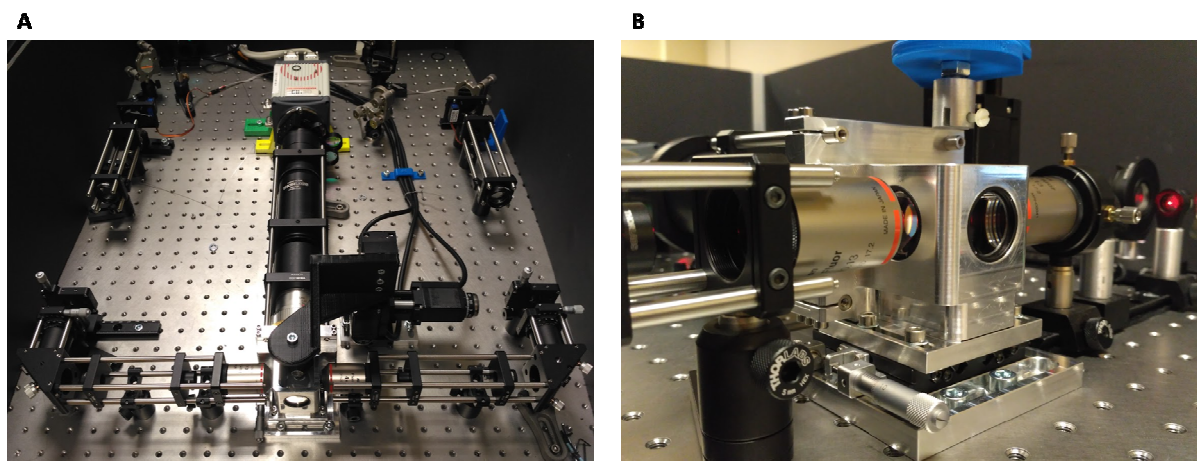


**Rycina 8. Półkule mózgowe oczyszczone metodą iDISCO+.** A) Półkula mózgowa przed procedurą oczyszczania B) Przezroczysta półkula mózgowa po zastosowanej procedurze oczyszczania optycznego metodą iDISCO+ .

### 3.3.7 Obrazowanie mózgow w mikroskopie opartym na arkuszu światła

Oczyszczone optycznie mózgi obrazowane były w mikroskopie opartym na arkuszu światła LSM minimum 24 godziny po zakończeniu procedury oczyszczania iDISCO+. Mikroskop arkusza światła użyty do obrazowania mózgow został zaprojektowany

i samodzielnie skonstruowany przez dr Monikę Pawłowską z Pracowni Neurobiologii Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego Polskiej Akademii Nauk w Warszawie (Stefaniuk i in. 2016, Ryc. 9). Dla każdego mózgu zbierano sygnał fluorescencyjny z dwóch kanałów: sygnał pochodzący z wyznakowanych jąder komórkowych wykazujących ekspresję c-Fos, wzbudzany falą o długości 638 nm oraz autofluorescencją tkanki wzbudzaną falą o długości 488 nm. Sygnał pochodzący z autofluorescencji tkanki został następnie wykorzystany do dopasowania obrazów mózgu do atlasu anatomicznego. Mikroskop został wyposażony w obiektyw immersyjny 4×, NA=0,3 skorygowany na współczynniki załamania do 1,6 (LaVision Biotec LVMI-Fluor 4×/0,3) oraz kamerę sCMOS o rozdzielczości 2048×2048 pikseli (Hamamatsu Orca 4), co odpowiada wielkości piksela  $1,45 \times 1,45 \mu\text{m}$ . Półkule mózgowe obrazowano zachowując interwał  $4 \mu\text{m}$  pomiędzy kolejnymi zdjęciami w przypadku kanału dla sygnału białka c-Fos oraz  $10 \mu\text{m}$  dla sygnału z tkanki.



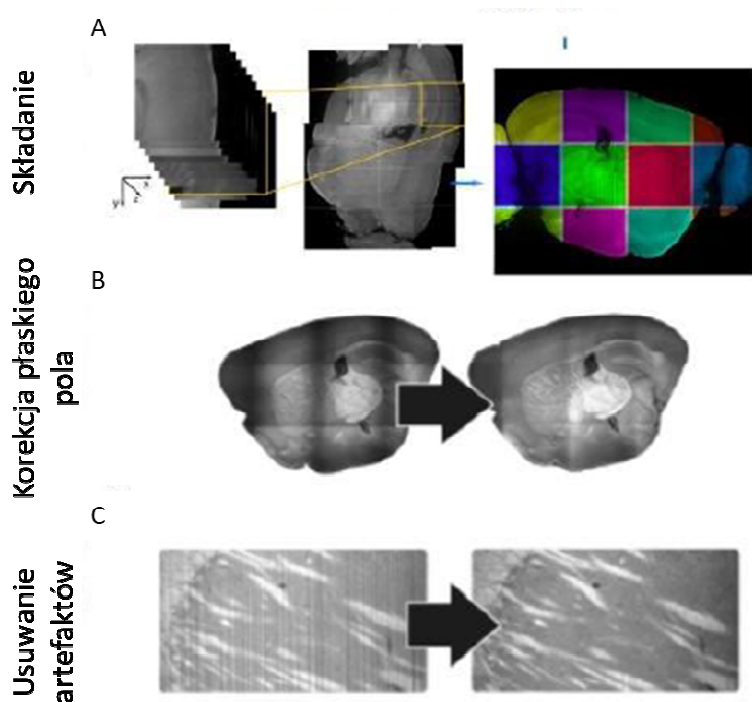
**Rycina 9. Mikroskop LSM zaprojektowany i skonstruowany przez dr Monikę Pawłowską w Pracowni Neurobiologii Instytutu Nenckiego A) Konstrukcja optyczna mikroskopu LSM B) Komora do obrazowania preparatów z dwoma obiektywami (oświetlającym i zbierającym fluorescencję).**

### 3.3.8 Analiza obrazów uzyskanych w mikroskopie LSM

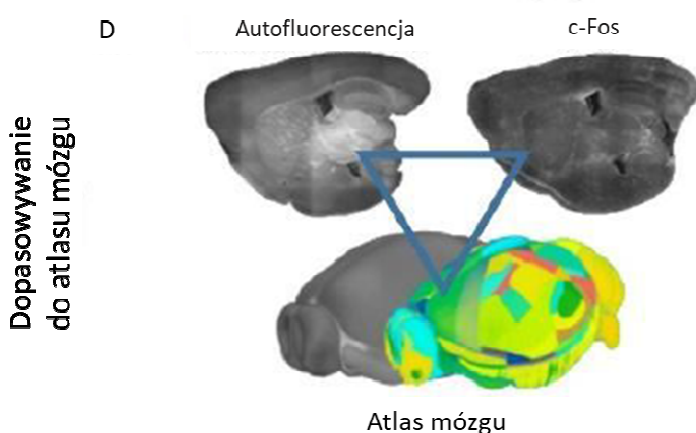
Następnym etapem była identyfikacja miejsc wysokiej aktywności komórkowej (tzw. *hotspot*) w mózgu zachodzącej w odpowiedzi na zadany bodziec. Dane pochodzące z mikroskopu oparte na arkuszu światła to seria kilkuset pojedynczych zdjęć w formacie TIFF, zrobionych dla każdego obrazowanego kanału. Otrzymane zdjęcia zapisywano

w formacie kompozycji zdjęć (ang. *tiles*). Rozdzielczość poszczególnych kompozycji odpowiadała natywnej rozdzielczości kamery 2048×2048, w skali 1,45 μm/pixel. Zachowując interwał 4 μm uzyskano około 500 obrazów odpowiadających kolejnym warstwom preparatu. Analizę zdjęć pochodzących z całych półkuli mózgu przeprowadzono etapowo (Ryc.10). W pierwszej kolejności dane zostały przetworzone w celu połączenia pojedynczych obrazów i warstw w jeden obraz. W tym celu użyto wtyczki Big Stitcher (Hörl i in., 2019) w programie Fiji (Ryc.10A). Dodatkowo w tym samym programie wykorzystano wtyczkę BaSiC, która pozwoliła na skorygowanie efektu winietowania (zaciemnienia granicy obrazu), który pojawia się w efekcie łączenia ze sobą poszczególnych zdjęć (Ryc. 10B). Następnie za pomocą algorytmu VSNR (Escande i in., 2017) usunięte zostały artefakty związane z miejscową absorpcją lub rozproszeniem sygnału (Ryc. 10C). Przy współpracy z członkami Laboratorium Neuroinfomatyki Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego w Warszawie opracowano dedykowany, kilkietapowy proces obliczeniowy, który został zastosowany do wykrywania jąder komórkowych wykazujących ekspresję c-Fos. Zastosowanie tego algorytmu pozwoliło na odróżnienie pożądanego sygnału od artefaktów obrazowania, a przez to na identyfikację i zliczenie komórek aktywowanych zadaniem bodźcem w sposób powtarzalny i zautomatyzowany. W ostatnim etapie, obrazy uzyskane dla tła preparatu zostały dopasowane do atlasu anatomicznego mózgu myszy (Ryc. 10D). Aby przeprowadzić automatyczną segmentację anatomicznych struktur mózgu na obrazie kanału autofluorescencji wykorzystano wyszkoloną dwuwymiarową głęboką sieć neuronową (DCNN) opartą na architekturze UNet. Zbiory danych wykorzystane do wyszkolenia sieci DCNN zostały utworzone poprzez ręczne anotowanie obrazów w trzech płaszczyznach kardynalnych (koronalnej, strzałkowej i horyzontalnej) przy użyciu oprogramowania ITKSnap v.3.8.0 <http://www.itksnap.org>. Wyszkolona sieć DCNN pozwoliła na automatyczną identyfikację zarysu mózgu, a także głównych traktów istoty białej, zakrętu zębatego i charakterystycznych części mózdzku. Następnie na posegmentowane obrazy z kanału autofluorescencji nałożono zdjęcia uzyskane dla sygnału pochodzącego od wyznakowanego białka c-Fos. Dzięki temu uzyskano precyzyjną mapę, ukazującą rozmieszczenie komórek wykazujących obecność c-Fos w poszczególnych strukturach mózgu.

## Tworzenie obrazu 3D



## Detekcja sygnału



**Rycina 10. Etapy obróbki obrazów w celu uzyskania trójwymiarowych map aktywacji c-Fos w mózgu.** A) Zdjęcia pochodzące z mikroskopu LSM to seria kilkuset pojedynczych zdjęć. Dzięki zastosowaniu wtyczki BigStitcher zdjęcia zostały dopasowane i złożone w jeden obraz. B) Za pomocą wtyczki BaSiC wykonano korekcję zaciemnionych krawędzi obrazu. C) Artefakty związane z miejscową absorpcją lub rozproszeniem sygnału zostały usunięte za pomocą algorytmu VSNR. D) Obrazy uzyskane dla tła preparatu zostały dopasowane do atlasu anatomicznego mózgu myszy. Następnie na nie zdjęcia uzyskane dla sygnału pochodzącego od wyznakowanego białka c-Fos. W ten sposób otrzymano trójwymiarową mapę, ukazującą rozmieszczenie komórek wykazujących obecność c-Fos w poszczególnych strukturach mózgu.

### **3.3.9 Badanie występowania białka c-Fos w komórkach SST, PV oraz VIP**

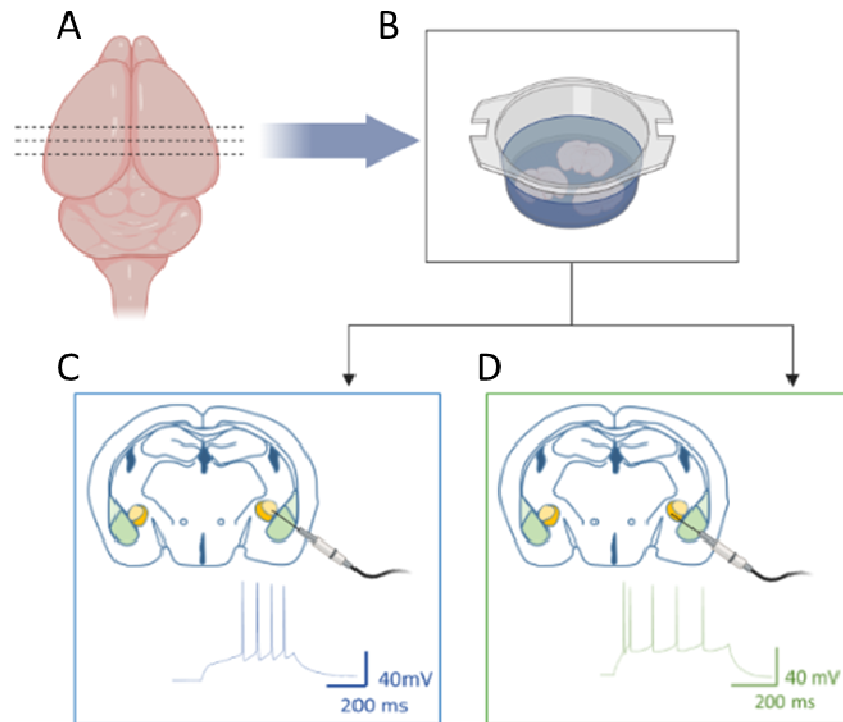
W celu określenia typu komórek środkowego ciała migdałowatego potencjalnie zaangażowanych w proces uczenia się zdarzeń nacechowanych pozytywnie, przeprowadzono eksperyment, w którym zbadano współwystępowanie komórek wykazujących ekspresję białka c-Fos z różnymi populacjami komórek ciała migdałowatego. W badaniu wykorzystano transgeniczne myszy posiadające gen kodujący białko czerwonej fluorescencji tdTomato w neuronach wykazujących obecność somatostatyny, parwalbuminy oraz naczynioruchowego polipetydu jelitowego (SST-Ai14, PV-Ai14 i VIP-Ai14). Ekspresję białka c-Fos badano po treningu preferencji miejsca w klatce IntelliCage (patrz Materiały i Metody, punkt 3.2.2). W tym celu myszy zostały uśmiercone, a mózgi utrwalono i pocięto na skrawki o grubości 40  $\mu\text{m}$  przy użyciu wibratomu (Leica VT1000S). Skrawki mózgow obejmujące region ciała migdałowatego, zostały poddane znakowaniu immunofluorescencyjnemu przeciwko epitopom białka c-Fos, według protokołu opisanego w punkcie 3.3.3. Następnie preparaty zostały zobrazowane przy użyciu mikroskopu konfokalnego (Zeiss Cell Observer SD Spinning Disk Confocal Microscope). Zdjęcia wykonywano w dwóch kanałach: fala wzbudzenia 555 nm dla tdTomato w celu identyfikacji komórek SST, PV, VIP oraz fala 488 nm w celu zobrazowania wyznakowanego fluorescencyjnie białka c-Fos. Obszary obejmujące środkowe ciało migdałowate obrazowano za pomocą suchego obiektywu z 20 $\times$  powiększeniem. Obraz zbierano w osi Z na głębokość około 30  $\mu\text{m}$  w głąb skrawka, zaczynając od jego powierzchni, z interwałem 2  $\mu\text{m}$ . Występowanie komórek c-Fos pozytywnych w neuronach hamujących liczono manualnie z pomocą programu ImageJ.

### **3.3.10 Badanie pobudliwości neuronów SST+ środkowego ciała migdałowatego metodą *whole-cell patch clamp***

W celu zbadania zmian aktywności neuronalnej interneuronów środkowego ciała migdałowatego po warunkowaniu apetytywnym, przy współpracy z mgr. inż. Dominikiem Kanigowskim z Pracowni Elektrofizjologii, Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego Polskiej Akademii Nauk w Warszawie, przeprowadzono analizy elektrofizjologiczne interneuronów wykazujących obecność somatostatyny.

### 3.3.11 Przygotowanie przyżyciowych skrawków mózgow

Osiemnaście godzin po zakończeniu behawioralnej części eksperymentów, myszy poddano anestezji wziewnej za pomocą izofluranu (Aerrane, Baxter) i dekapitowano. Następnie mózgi wypreparowano na lodzie i pocięto na skrawki w płaszczyźnie czołowej przy użyciu wibratomu Leica VT1200s w temperaturze 4°C w sztucznym płynie mózgowo-rdzeniowym (ACSF) o następującym składzie: 119 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1,25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 26 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM D-glukoza, zrównoważonym mieszaniną gazów O<sub>2</sub> / CO<sub>2</sub> w stosunku objętościowym 95/5 %. Pobierano skrawki przekroju czołowego (koronalne) o grubości 250 μm obejmujące ciało migdałowate. Schemat doświadczenia przedstawiono na Rycinie 11.



**Rycina 11. Schemat doświadczenia elektrofizjologicznego.** A) Wypreparowany mózg cięty w płaszczyźnie czołowej (koronalnej) na skrawki o grubości 250 μm, obejmujące obszar CeA B) Inkubacja przyżyciowych skrawków w sztucznym płynie mózgowo-rdzeniowym ACSF C) Elektroda rejestrująca komórki somatostatynowe umieszczona w obszarze CeL D) Elektroda rejestrująca komórki somatostatynowe umieszczona w obszarze CeM.

Po 1–2 godz. regeneracji, pojedynczy skrawek mózgu przeniesiono z komory inkubacyjnej do komory rejestrującej, gdzie był poddawany ciągłej perfuzji roztworem ACSF

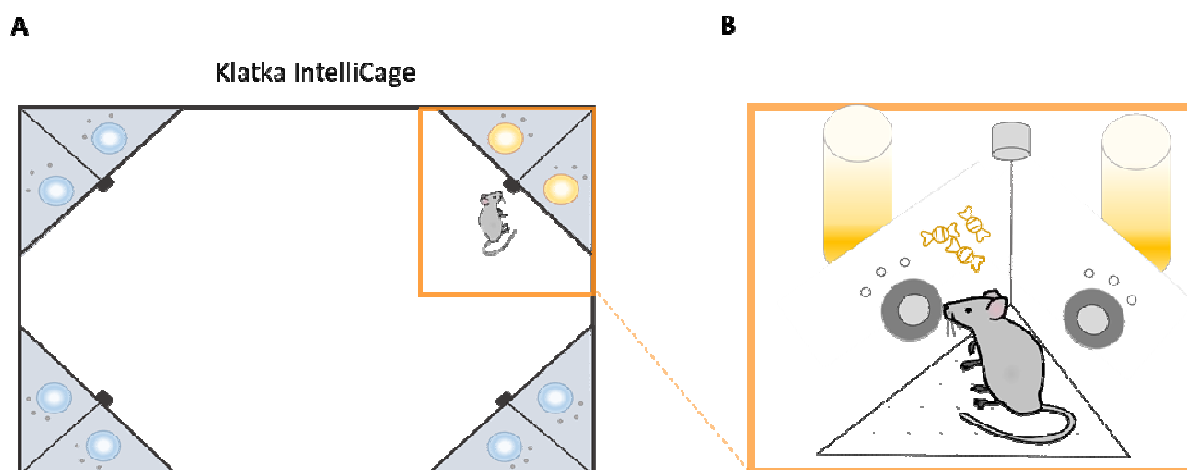
w temperaturze pokojowej. Rejestrację elektrofizjologiczną przeprowadzono z komórek hamujących wykazujących obecność SST, zlokalizowanych w regionach CeL lub CeM. Komórki SST zidentyfikowano na podstawie obecności tdTomato wyrażanego w sposób zależny od CRE. Rejestracji dokonano za pomocą elektrod ze szkła borokrzemianowego (o rezystancji 5-8 M $\Omega$ ) wypełnionych roztworem składającym się z: 125 mM glukonianu potasu, 2 mM KCl, 10 mM HEPES, 0,5 mM EGTA, 4 mM MgATP i 0,3 mM NaGTP, przy pH 7,2, 290 mM mOsm. Dane elektrofizjologiczne zebrano za pomocą wzmacniacza MultiClamp 700B (Molecular Device) oraz interfejsu Axon Digidata 1550B (Molecular Devices, USA). Dane zostały przefiltrowane przy częstotliwości 3 kHz, a następnie przetworzone na sygnał cyfrowy z częstotliwością 20 kHz oraz zebrane za pomocą oprogramowania pCLAMP v. 10.07 (Molecular Device). Rezystancja wejściowa, pojemność neuronów i rezystancja dostępu były monitorowane automatycznie. Rejestrowano dwa parametry aktywności spoczynkowej neuronów hamujących: częstotliwość spoczynkową wyładowań oraz potencjał spoczynkowy błony.



## 4. Wyniki

### 4.1 Trening apetytywny w klatce IntelliCage

Aby przeprowadzić mapowanie profilu ekspresji białka c-Fos jako markera aktywności/plastyczności neuronalnej mózgu, występującej podczas uczenia się zdarzeń pozytywnych, w pierwszej kolejności przeprowadzono doświadczenia behawioralne. W badaniach wykorzystano myszy model uczenia apetytywnego w zautomatyzowanym systemie klatek IntelliCage. Trening polegał na wykształceniu przez zwierzęta preferencji miejsca do rogu, w którym jako bodziec pozytywny zastosowano roztwór 10% sacharozy (Ryc.12 A-B). Rycina 12 A przedstawia schemat klatki Intellicage obrazujący rozmieszczenie butelek z wodą oraz z 10% sacharozą podczas treningu apetytywnego. Rycina 12 B ukazuje widok od środka rogu klatki w którym zastosowano nagrodę.



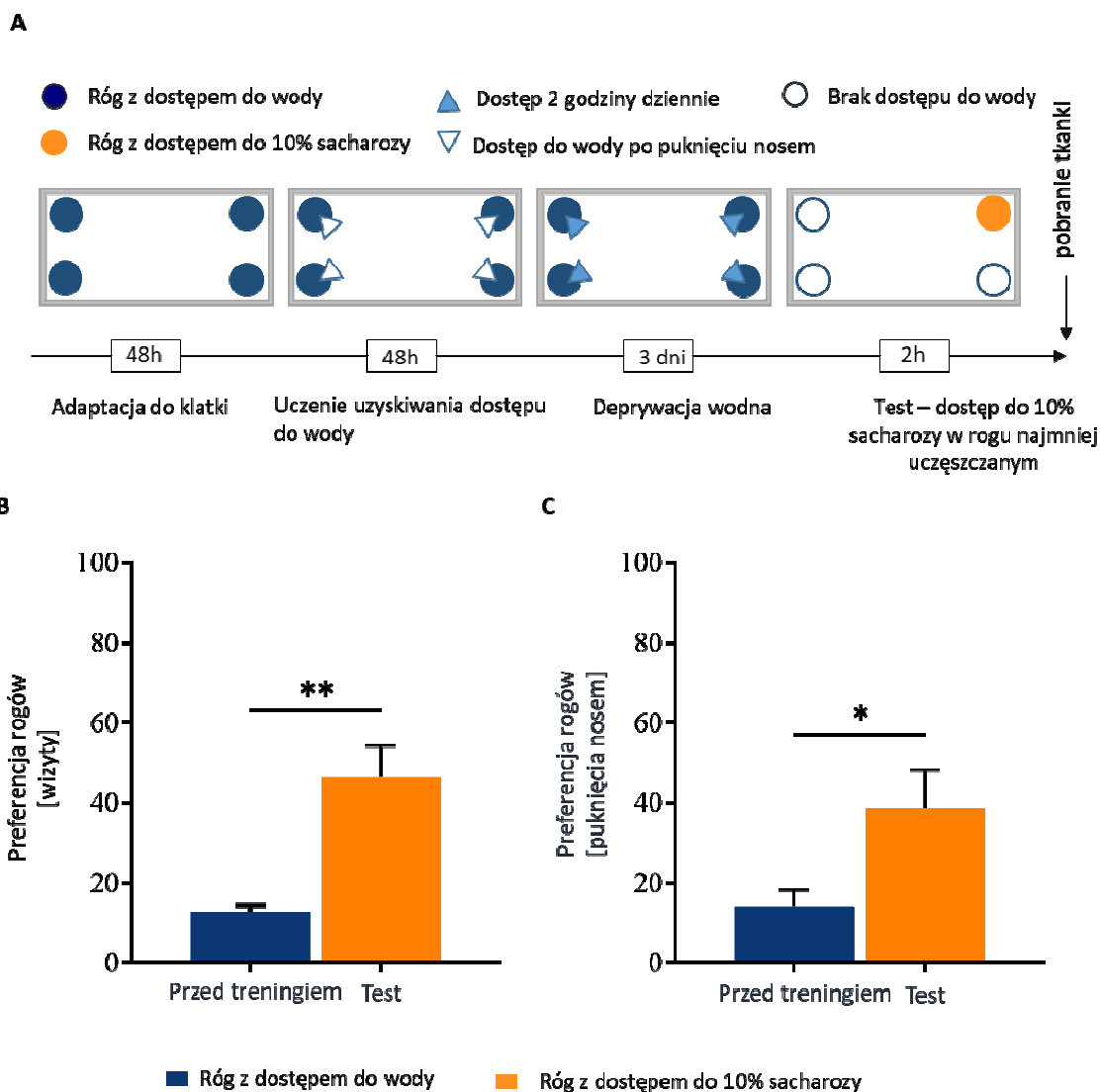
**Rycina 12. Schemat klatki IntelliCage podczas treningu apetytywnego. A)** Klatka IntelliCage – widok od góry. Na niebiesko zaznaczono butelki zawierające wodę, a na pomarańczowo butelki z roztworem 10% sacharozy. **B)** Schemat budowy rogu doświadczalnego, w którym jako bodziec apetytywny zastosowano roztwór 10% sacharozy – widok od środka klatki.

Trening przeprowadzono według ustalonego wcześniej protokołu (Knapska i in., 2006) (Ryc.13 A). Sesja doświadczalna rozpoczynała się od 2 dni adaptacji do klatki. W tym okresie myszy swobodnie eksplorowały klatkę, drzwiczki prowadzące do butelek były



otwarte, a zwierzęta miały nieograniczony dostęp do wody. Następnie drzwiczki zostały zamknięte i otwierały się po wykonaniu *nosepoke* w stronę otworu prowadzącego do butelek. W kolejnym etapie doświadczenia, aby zwiększyć motywację zwierząt do poszukiwania wody, dostęp do butelek został czasowo ograniczony. Przez kolejne 3 dni zwierzęta codziennie o tej samej porze miały dostęp do wody przez 2 godz. dziennie. Po 2 godzinnej sesji picia drzwiczki prowadzące do butelek były zablokowane. W trakcie ostatniej sesji picia wody dla każdego zwierzęcia został wybrany róg z najmniejszą liczbą wizyt (róg najmniej preferowany). Ostatniego dnia treningu po 22 godzinnej deprivacji wodnej do rogu najmniej preferowanego zostały włożone butelki z roztworem 10% sacharozy (bodziec apetytywny). Grupa zwierząt kontrolnych we wszystkich rogach, zamiast roztworu 10% sacharozy, miała podaną wodę. Analizowano nabywanie umiejętności wykształcania preferencji miejsca do butelek z 10% sacharozą znajdujących się w najrzadziej uczęszczanym rogu klatki. Dane dotyczące aktywności zwierząt przedstawiono jako liczbę wizyt oraz *nosepoke* w wybranym rogu w stosunku do sumy wizyt i *nosepoke* we wszystkich rogach.

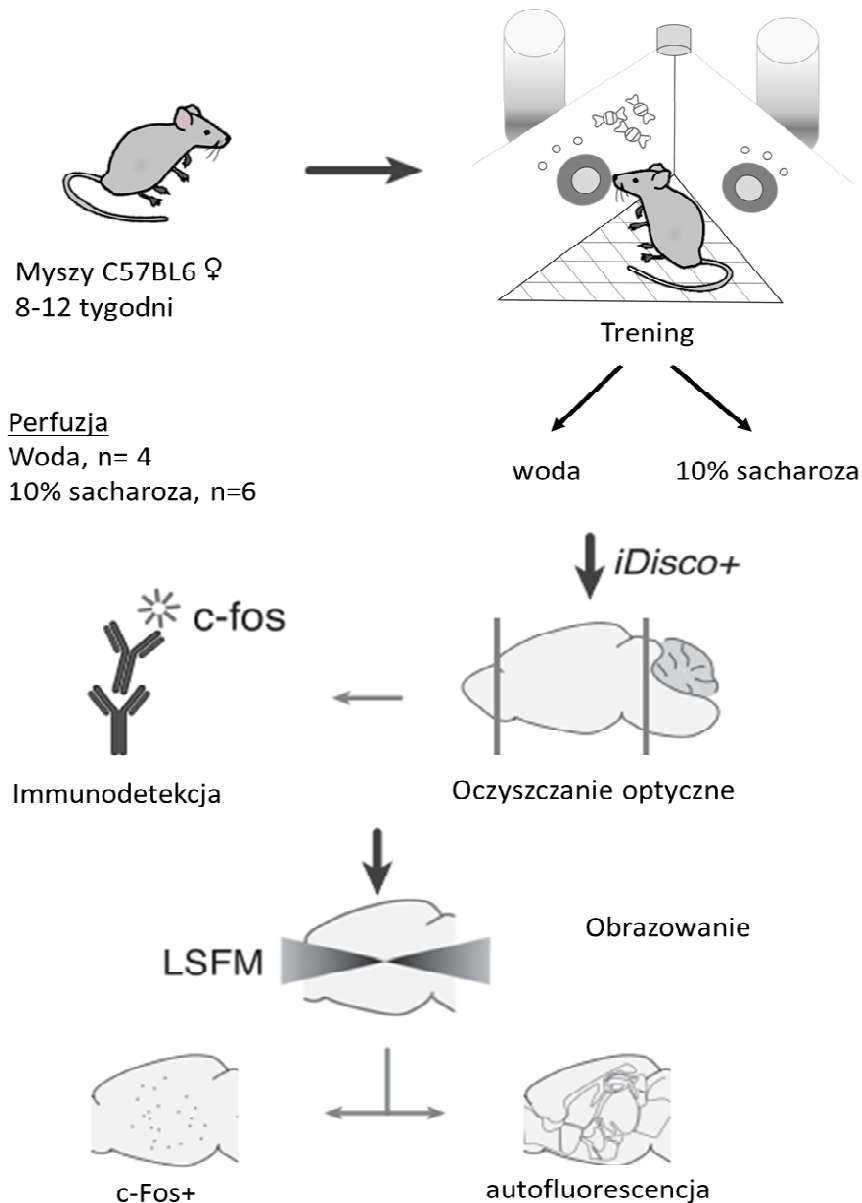
Proces uczenia przedstawiono jako procent wykonanych wizyt oraz *nosepoke* w wybranym rogu w sesji poprzedzającej dzień testowy i w trakcie wykonywania testu apetytywnego. Wyniki przedstawiono na Rycinie 13 B-C. Na Rycinie 13 B widoczny jest wzrost liczby wizyt do rogu, w którym umieszczono roztwór 10% sacharozy. Rozkład normalny uzyskanych danych został zachowany, a niesparowany dwustronny test t-Studenta wykazał istotne zmiany pomiędzy grupami ( $F(5,5)=23,52$ ,  $p=0,0035$ ,  $n=6$ ). Na Rycinie 13 C pokazano wzrost liczby *nosepoke* w celu uzyskania dostępu do butelki w rogu z 10% sacharozą. Rozkład normalny uzyskanych danych został zachowany, a niesparowany dwustronny test t-Studenta wykazał istotne zmiany pomiędzy grupami ( $F(5,5)=5,350$ ,  $p=0,0403$ ,  $n=6$ ). Wyniki te wskazują na to, że myszy wykształciły preferencję miejsca o czym świadczy zarówno wzrost liczby wizyt, jak i *nosepoke* w kierunku rogu z 10% sacharozą. Po skończonej sesji treningowej mózgi myszy zostały wyizolowane i wykorzystane do oznaczeń immunofluorescencyjnych c-Fos.



**Rycina 13. Uczenie apetytywne w klatce IntelliCage.** A) Schemat treningu apetytywnego: doświadczenie rozpoczynało się od 48 godz. adaptacji do klatki z nielimitowanym dostępem do wody we wszystkich rogach. Następnie przez kolejne 48 godz. dostęp do wody następował po wykonaniu *nosepoke*. Kolejnym etapem była okresowa deprywacja. Dostęp do wody ograniczony był do 2 godz. dziennie o stałej porze. Ostatni etap doświadczenia to warunkowanie apetytywne, podczas którego butelki w rogu najmniej uczęszczanym zostały wymienione na butelki z roztworem 10% sacharozy. Po upływie 90-120 min. od napicia się roztworu 10% sacharozy myszy zostały uśmiercone, a ich mózgi zachowane do dalszych analiz. B) Preferencja rogów została wyrażona jako procent wizyt wykonanych do rogu najmniej uczęszczanego przed i po otrzymaniu w tym rogu roztworu 10% sacharozy. C) Preferencja rogu została wyrażona jako procent *nosepoke* skierowanych do otworów prowadzących do butelek z wodą i po wymienieniu ich zawartości na roztwór 10% sacharozy. Zarówno na wykresie C jak i D dane przedstawiono jako wartość średnia  $\pm$  błąd standardowy, zastosowano niesparowany dwustronny test t-Studenta. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , (grupa kontrolna,  $n=6$ , grupa apetytywna,  $n=6$ ).

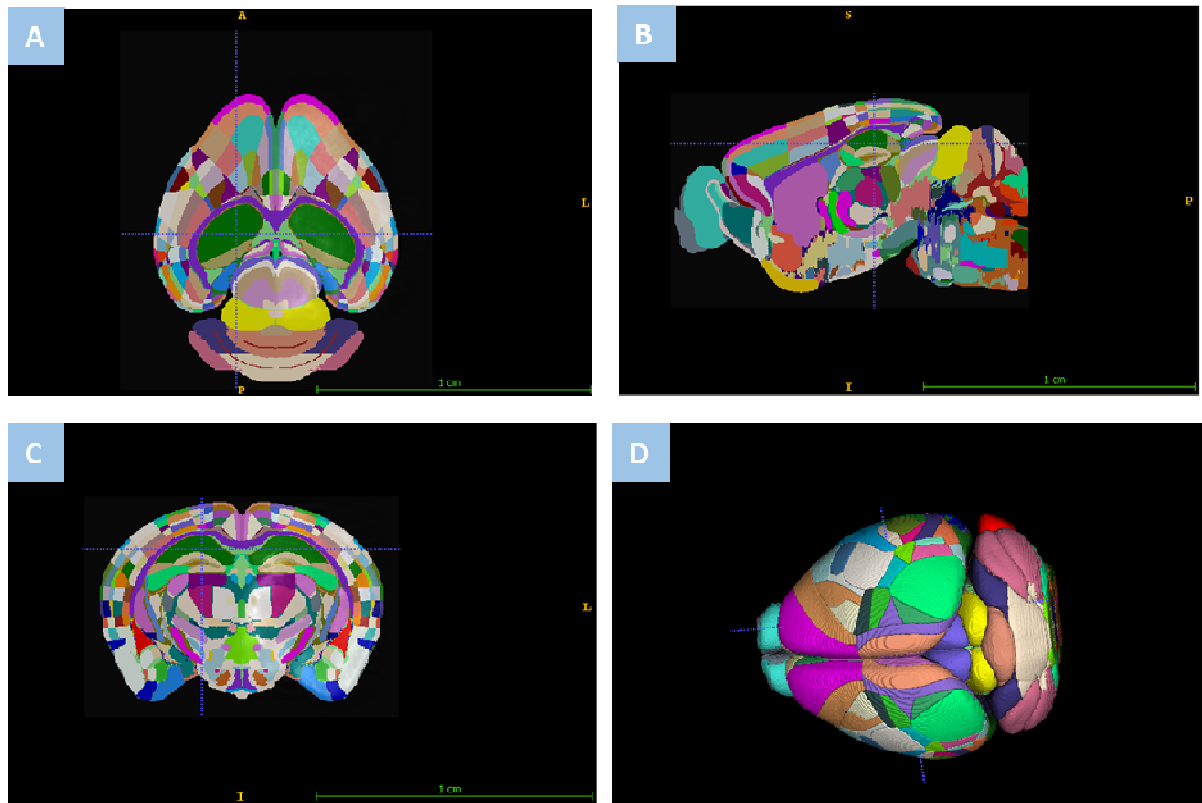
### **4.3 Mapowanie ekspresji c-Fos wywołanej treningiem apetytywnym**

W celu przygotowania mapy wszystkich struktur odpowiadających na bodziec apetytywny w uczeniu, przeprowadzono analizę występowania białka c-Fos w mózгах zwierząt po treningu behawioralnym (Ryc. 14). Doświadczenie rozpoczynało się od przeprowadzenia warunkowania apetytywnego w klatce Intellicage wg. protokołu treningu preferencji miejsca opisanego w punkcie 3.3.3. Po skończonej procedurze behawioralnej zwierzęta zostały uśmiercone, a ich mózgi wyizolowane i utrwalone. Odpowiednio przygotowane tkanki mózgowe zostały poddane procedurze oczyszczania optycznego z wykorzystaniem techniki iDISCO+ (Renier i in., 2014, 2016) oraz znakowaniu immunofluorescencyjnemu c-Fos. Dzięki zastosowaniu techniki iDISCO+ uzyskano preparaty mózgowe charakteryzujące się wysokim poziomem przezroczystości, co umożliwia obrazowanie mózgu w całości bez konieczności przygotowania cienkich preparatów mikroskopowych. Dzięki możliwości połączenia metody oczyszczania iDISCO+ z metodą immunodetekcji w badanych mózгах zostało wyznakowane białko c-Fos. Przygotowane preparaty zostały zobrazowane w mikroskopie opartym na arkuszu światła (Pawłowska, Stefaniuk, i Legutko, 2019). Dla każdego mózgu zebrano obrazy w dwóch kanałach - c-Fos i autofluorescencji, który to kanał został w późniejszym etapie wykorzystany do dopasowania sygnału c-Fos do atlasu anatomicznego mózgu.



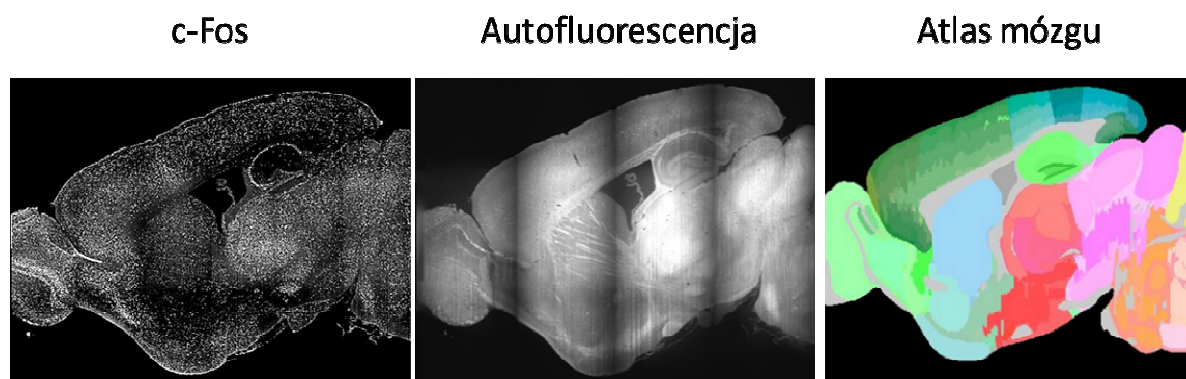
**Rycina 14. Schemat doświadczenia mapowania ekspresji c-Fos w mózgu po treningu apetytywnym.** Myszy szczepu C57BL6 zostały poddane treningowi preferencji miejsca do 10% sacharozy w klatce IntelliCage. Grupa kontrolna zamiast roztworu 10% sacharozy miała dostęp do wody. W czasie 90-120 minut po rozpoczęciu testu myszy zostały uśmiercone i poddane perfuzji, a ich mózgi oczyszczone optycznie metodą iDISCO+. W celu wyznaczenia regionów mózgu aktywowanych treningiem przeprowadzono znakowanie immunofluorescencyjne c-Fos. Tak przygotowane mózgi zostały obrazowane w mikroskopie opartym na arkuszu światła (LSFM), w dwóch kanałach: 647 nm – dla komórek c-Fos+ oraz 488 nm – dla autofluorescencji.

W wyniku obrazowania otrzymano grupę pojedynczych serii zdjęć pokrywających cały obszar mózgu. Po usunięciu artefaktów związanych z obrazowaniem (patrz Materiały i Metody, część 3.3.7), serie zdjęć zostały ze sobą połączone w formie mozaiki, która pokrywała obszarem powierzchnię całej półkuli w trzech wymiarach (Ryc.15).



**Rycina 15. Efekt segmentacji obrazu i rekonstrukcja mózgu 3D.** A-C) Schemat przedstawia zobrazowany mózg, pochodzący od zwierzęcia biorącego udział w doświadczeniu. Na obraz nałożono maskę pozwalającą na identyfikację anatomiczną poszczególnych struktur mózgowych. Widok w różnych płaszczyznach: horyzontalna A), strzałkowa B), czołowa C). D) Trójwymiarowa rekonstrukcja mózgu przeprowadzona w programie ITK-SNAP.

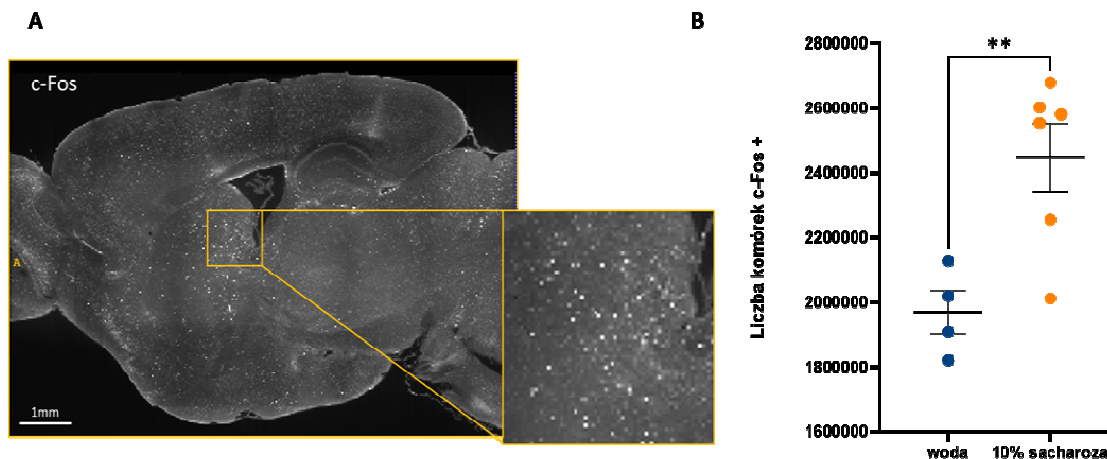
Dzięki dopasowaniu uzyskanych obrazów do atlasu mózgu uzyskano precyzyjną mapę, ukazującą rozmieszczenie komórek wykazujących obecność białka c-Fos w poszczególnych strukturach (Ryc.16). Wszystkie zobrazowane mózgi pochodzące od zwierząt grupy apetytywnej i kontrolnej zostały zanalizowane w ten sam sposób. Dzięki temu uzyskano porównywalne dane, ukazujące rozmieszczenie białka c-Fos w wielu strukturach anatomicznych jednocześnie, dla obu badanych grup. Ponadto zachowano integralność tkanki oraz wyeliminowano błędy pochodzące z manualnego zaznaczania obszarów struktur na skrawkach mózgu. W wyniku analizy uzyskano profil ekspresji c-Fos wyrażony jako liczba komórek c-Fos pozytywnych we wszystkich aktywnych strukturach mózgu.



**Rycina 16. Tworzenie mapy aktywności mózgu wywołanej treningiem apetytywnym.** Mózgi pochodzące od zwierząt poddanych treningowi preferencji miejsca zostały zobrazowane w mikroskopie LSM w dwóch kanałach: c-Fos i autofluorescencji. Następnie obrazy przedstawiające autofluorescencję preparatu zostały dopasowane do atlasu mózgu. Mapę aktywności uzyskano poprzez nałożenie zdjęć wykonanych w kanale ukazującym ekspresję c-Fos na dopasowany do atlasu kanał autofluorescencji.

#### **4.4 Ocena liczby komórek wykazujących ekspresję białka c-Fos w mózgu myszy poddanych treningowi apetytywnemu**

W kolejnych etapach skupiono się na szczegółowej analizie liczby komórek, w których doszło do ekspresji c-Fos na skutek treningu behawioralnego. Analiza ta obejmowała zaznaczenie jąder komórkowych wykazujących sygnał fluorescencyjny, pochodzący z wyznakowanego białka c-Fos. Na rycinie 17 A przedstawiono przykładowy obraz mikroskopowy przedstawiający przekrój strzałkowy mózgu z widocznymi komórkami pozytywnymi względem c-Fos. Na rycinie 17 B pokazano całkowitą liczbę komórek c-Fos pozytywnych dla mózgow zwierząt należących do grupy apetytywnej i kontrolnej. Całkowita liczba komórek c-Fos pozytywnych była większa w mózgu zwierząt poddanych treningowi apetytywnemu, niż w mózgu pochodzących od zwierząt kontrolnych. Analiza statystyczna wykazała, że otrzymane dane zachowują rozkład normalny, a niesparowany dwustronny test t-Studenta wykazał istotne zmiany pomiędzy porównywanymi grupami (niesparowany test t-Studenta,  $p=0,0098$ ). Oznacza to, że w wyniku treningu apetytywnego nastąpił globalny wzrost liczby komórek c-Fos+ w mózgu. Wartości zawarte na poniższym wykresie zostały podane jako średnia  $\pm$  błąd standardowy.

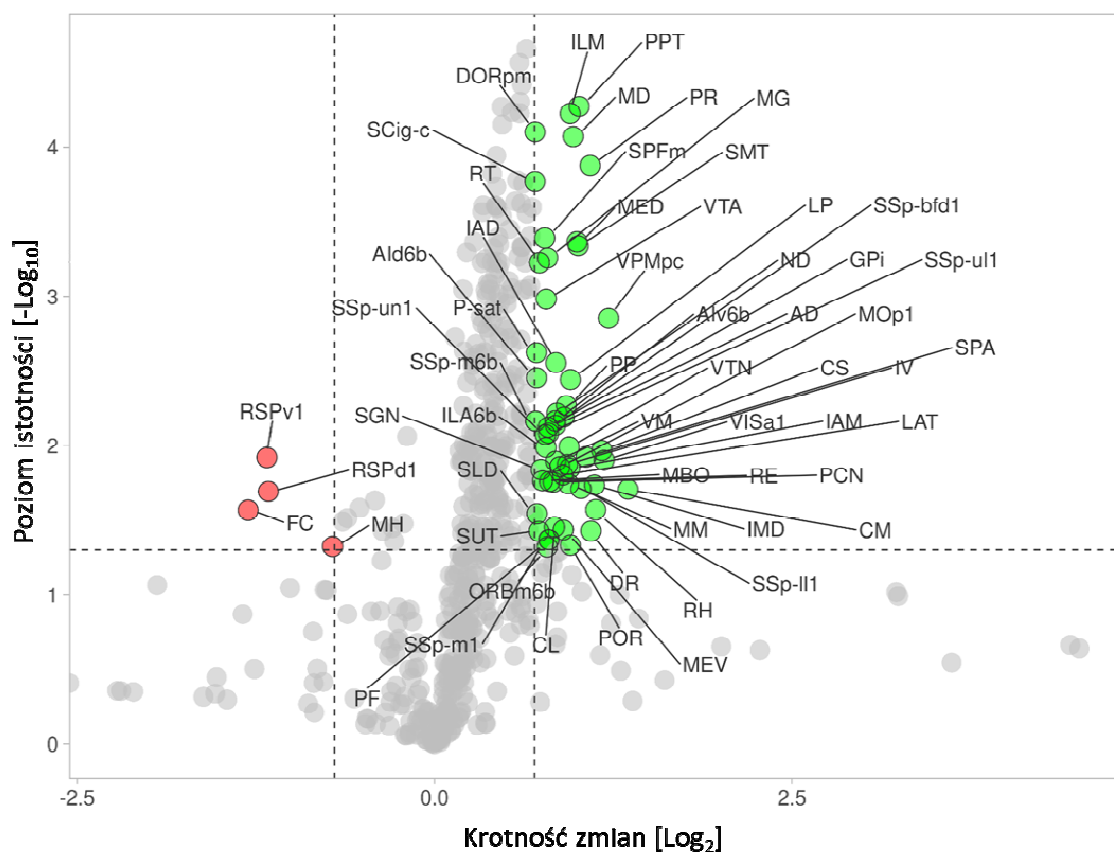


**Rycina 17. Liczba komórek c-Fos w mózgu zwierząt po treningu apetytywnym** A) Przekrój strzałkowy mózgu z widocznymi komórkami pozytywnymi względem c-Fos. B) Liczba komórek c-Fos pozytywnych w mózgu zwierząt poddanych warunkowaniu apetytywnemu (n=6) z użyciem 10% sacharozy oraz zwierząt kontrolnych (n=4) pijących wodę (niesparowany test t-Studenta, p=0,0098). Wartości zawarte na wykresie zostały podane jako średnia ± błąd standardowy. Skala: 1mm.

Po określeniu całkowitej liczby komórek dodatnich względem c-Fos przeprowadzono analizę ekspresji tego białka w poszczególnych strukturach mózgu. Bazując na obrazach mikroskopowych dopasowanych do atlasu anatomicznego mózgu myszy *Allen Brain Atlas* ([atlas.brain-map.org](http://atlas.brain-map.org)) zidentyfikowano około 790 struktur, spośród których 390 wykazywało ekspresję białka c-Fos. Analiza wykazała, że 195 struktur charakteryzowało się zwiększonym poziomem ekspresji białka c-Fos u zwierząt poddanych treningowi apetytywnemu w porównaniu do zwierząt kontrolnych (niesparowany test t-Studenta,  $p < 0,05$ ). Spis struktur wykazujących zwiększoną liczbę komórek c-Fos po uczeniu apetytywnym znajduje się w tabeli dołączonej jako załącznik do niniejszej pracy (Załącznik 1).

W celu wytypowania struktur wykazujących największe różnice w liczbie komórek dodatnich względem c-Fos między badanymi grupami zwierząt przeprowadzono dodatkową analizę statystyczną, która służy do identyfikowania i obrazowania zmian w obszernych zestawach danych. Prowadzi ona do powstania wykresu punktowego (ang. *volcano plot*) (Ryc. 18). Dzięki temu na jednym wykresie możliwe jest zidentyfikowanie struktur, które między badanymi grupami doświadczalnymi wykazują istotne statystycznie różnice przy odpowiednio wysokiej skali. Aby wytypować struktury wykazujące największe różnice w poziomie ekspresji c-Fos między porównywanymi grupami przyjęto następujące warunki: struktury wykazujące różnice na poziomie istotności  $p < 0,05$  ( $-\log_{10}(0.05) = 1.3$ )

i jednocześnie struktury, które wykazują co najmniej 2-krotną skalę zmian ( $\log(2) = 0.7$ ). Rycina 18 przedstawia wizualizację uzyskanych danych. Obrazuje ona struktury uszeregowane ze względu na różnice w liczbie komórek wykazujących ekspresję c-Fos między analizowanymi grupami zwierząt. Kolorem zielonym zaznaczono struktury, które wykazywały co najmniej 2-krotnie większą liczbę komórek pozytywnych względem c-Fos w grupie apetytywnej, niż w kontrolnej. Kolor czerwony to struktury posiadające co najmniej 2-krotnie mniejszą liczbę komórek wykazujących ekspresję białka c-Fos w grupie apetytywnej niż w kontrolnej. Szare punkty to pozostałe struktury, które nie spełniły jednego lub obu warunków założonych w analizie.

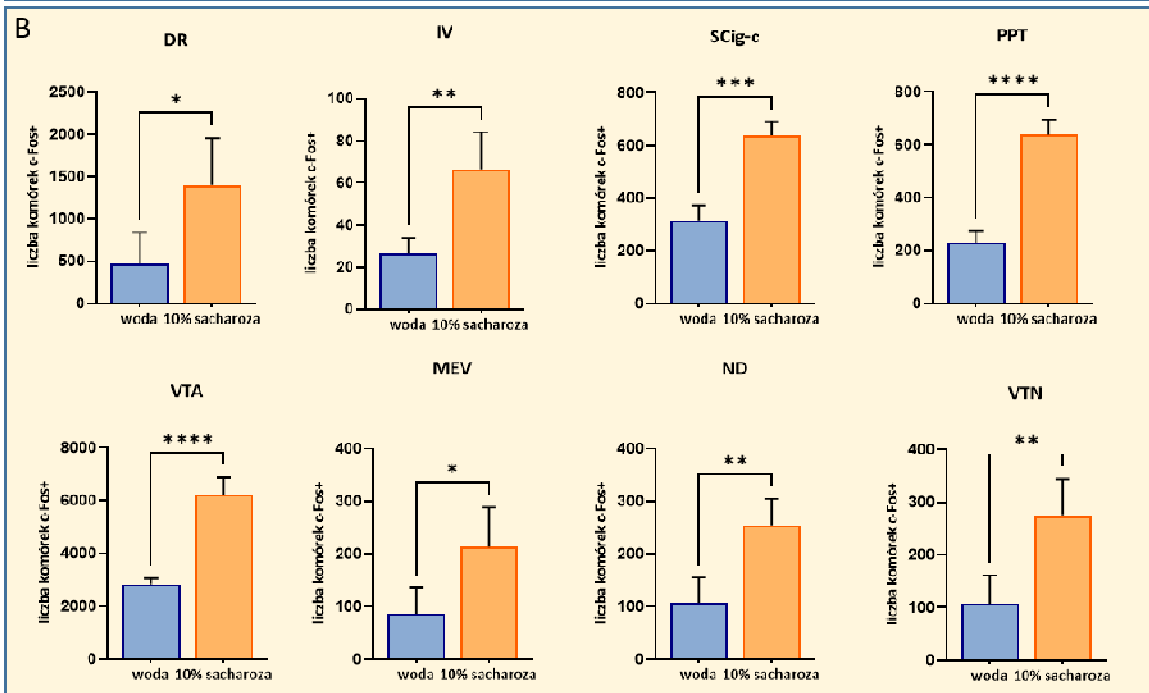
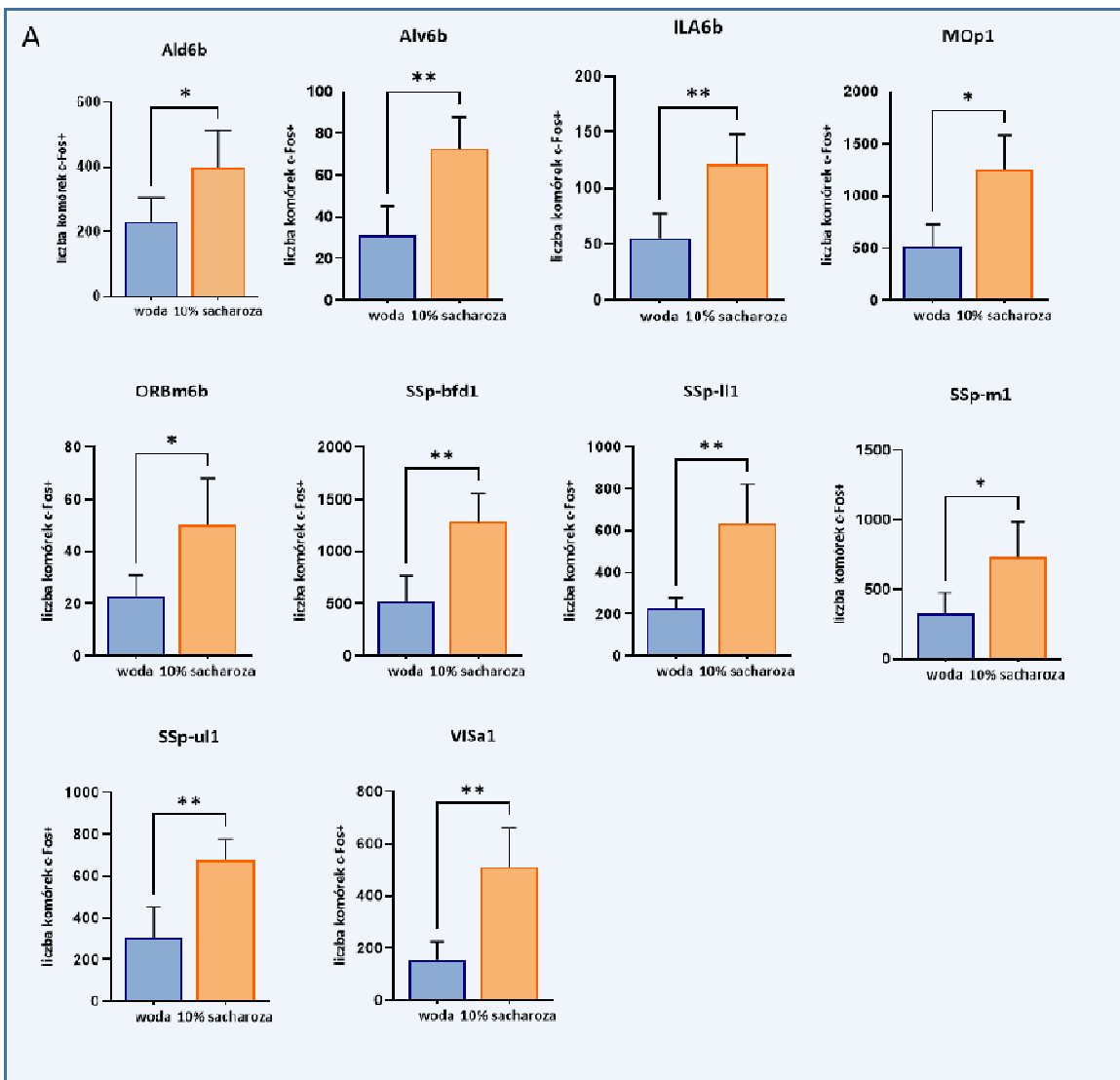


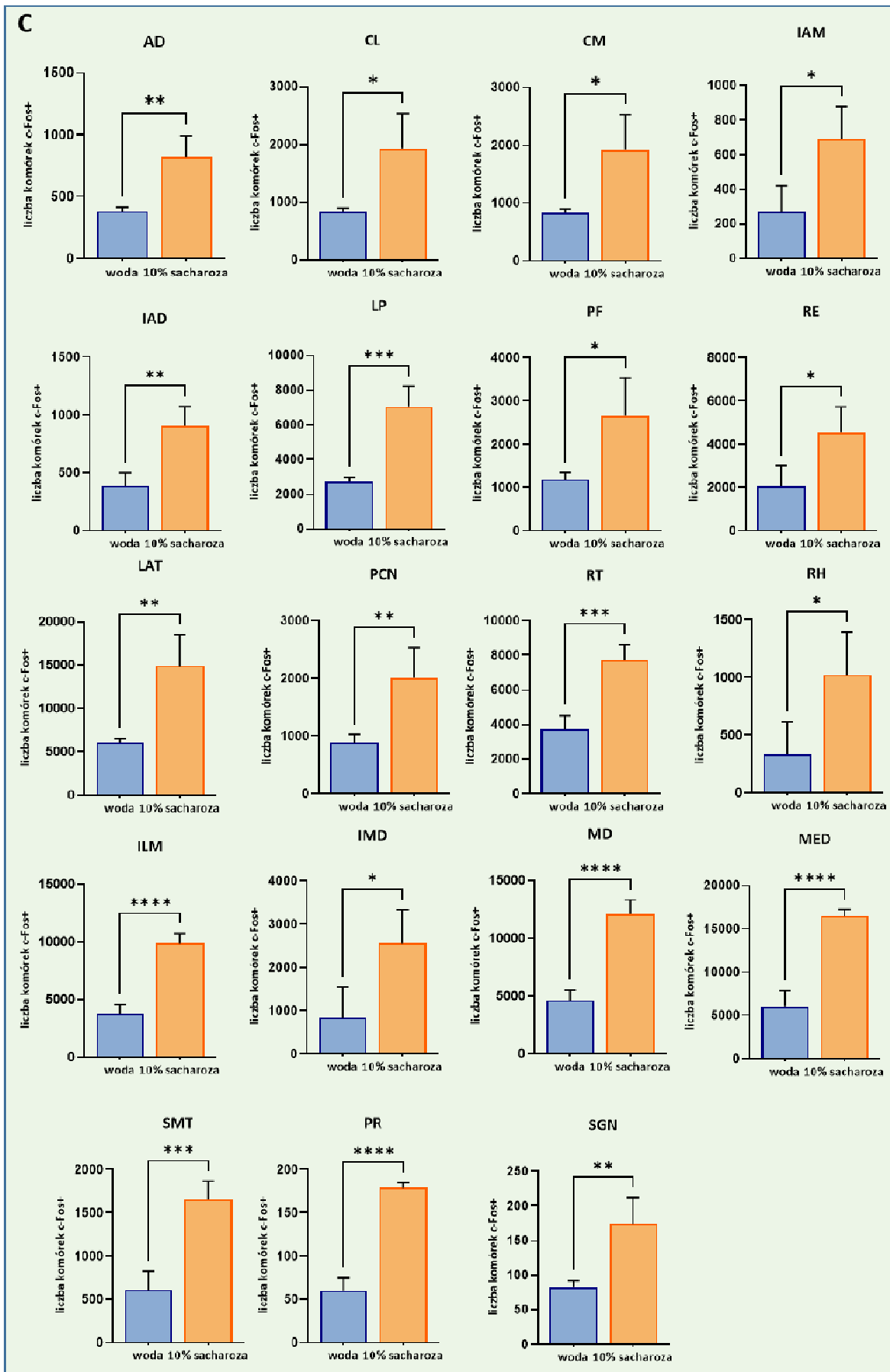
**Rycina 18. Struktury wykazujące największe zmiany w poziomie ekspresji c-Fos po treningu apetytywnym.** Wykres typu *volcano plot* przedstawia struktury różniące się między grupami zarówno istotnością statystyczną ( $p < 0,05$ ), jak również wielokrotnością zmian ( $\Delta\Pi$ ). Dane zostały przeanalizowane za pomocą jednokierunkowego, sparowanego testu t-Studenta. Punkty reprezentujące struktury mózgu pokolorowane są zgodnie z przyjmowanymi poziomami istotności. Kolor zielony wskazuje na struktury w których poziom ekspresji białka c-Fos po treningu apetytywnym był najwyższy ( $p \leq 0,05$  i  $|\Delta\Pi| \geq 2$ ). Na czerwono zaznaczono struktury w których poziom białka c-Fos w grupie apetytywnej był istotnie niższy niż w grupie kontrolnej. Punkty szare to struktury, które nie różnią się znacząco. Akronimy

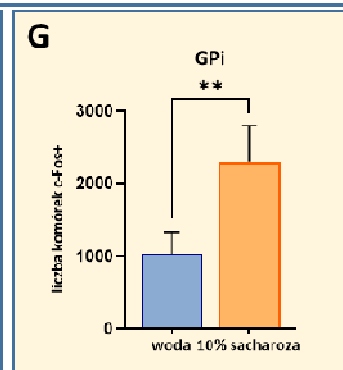
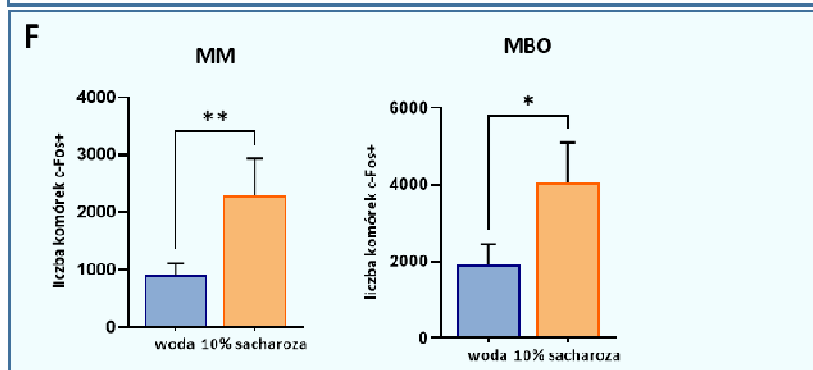
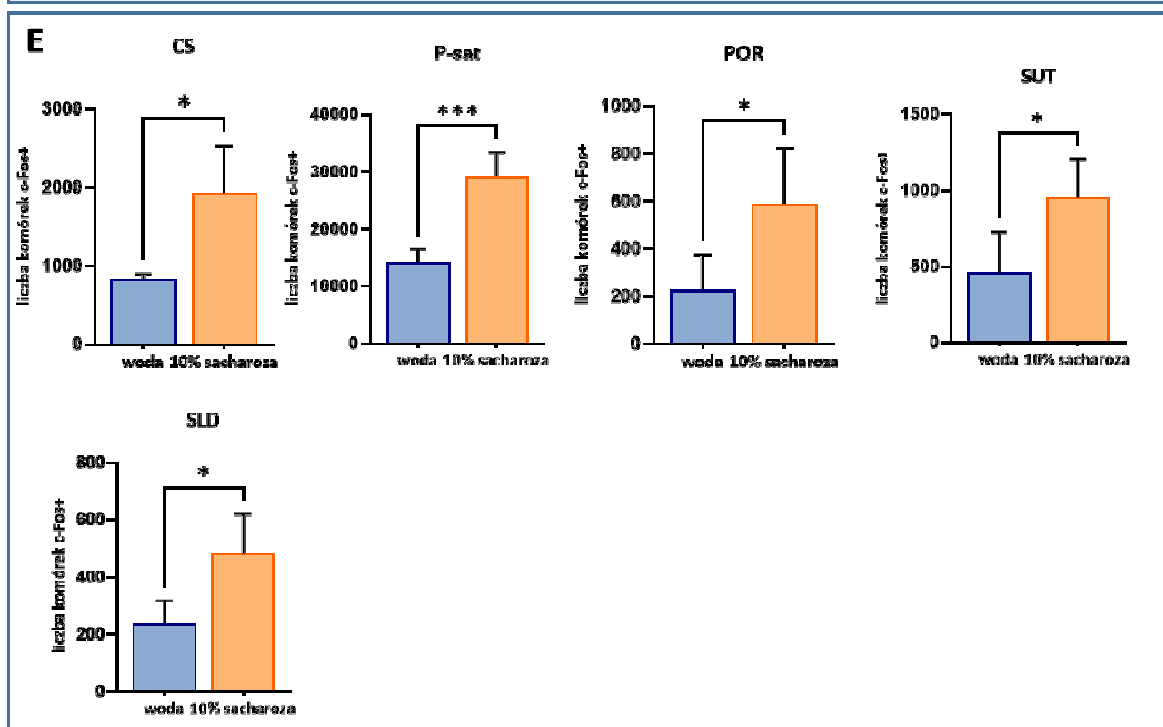
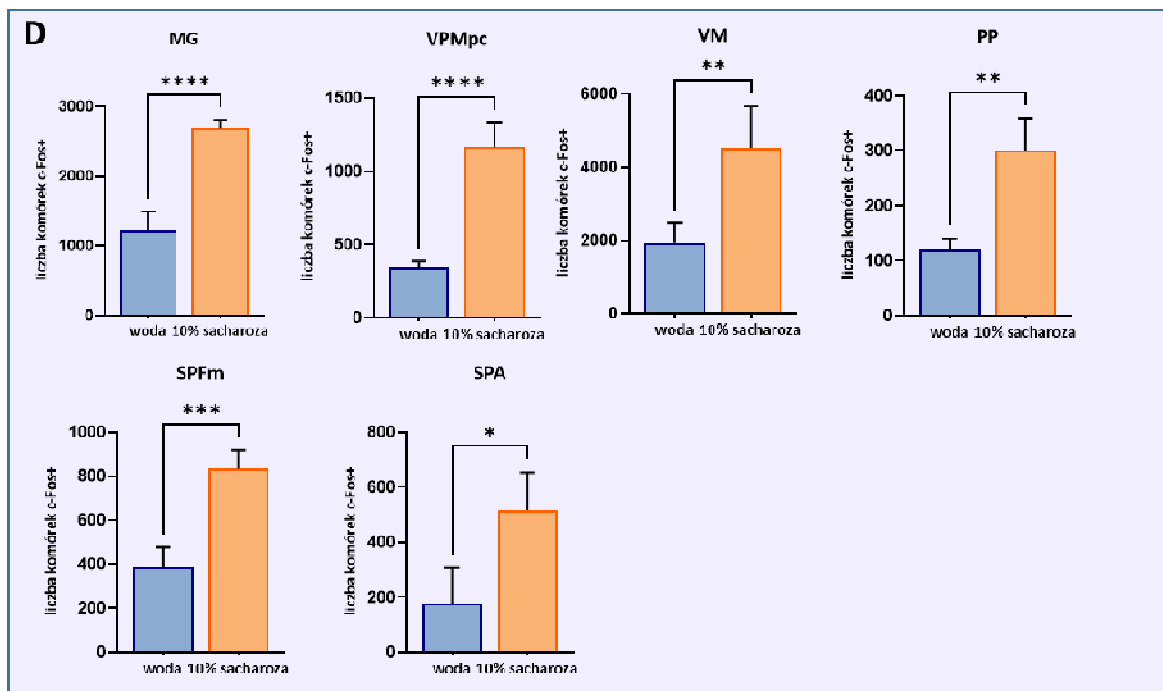


struktur mózgowych nadano zgodnie z atlasem mózgu Allen Brain Atlas. Kompletna lista akronimów stanowi załącznik do pracy (załącznik 2).

Struktury wykazujące największe zmiany w poziomie ekspresji c-Fos posegregowano według regionów anatomicznych mózgu. Na rycinie 19 A przedstawiono wzrost poziomu ekspresji c-Fos dla 10 struktur będących częścią kory nowej. Rycina 19 B przedstawia wykaz 8 struktur aktywowanych treningiem apetytywnym należących do śródmózgowia. Na Rycinie 19C widoczne jest 19 struktur wykazujących wzrost liczby komórek c-Fos pozytywnych. Struktury te należą do jąder wzgórza związanych z polimodalną korą asocjacyjną, natomiast na rycinie 19 D przedstawiono wyniki dla 6 struktur należących do jąder wzgórza związanych z korą sensomotoryczną. Kolejno na Rycinie 19 E znajduje się 5 struktur należących do grupy jąder mostu, a na Rycinie 19 F umieszczono 2 struktury należące do podwzgórza. Rycina 19 G przedstawia 1 strukturę, która jest częścią gałki bladej. Przedstawiona analiza pokazuje, że zastosowanie techniki obrazowania całego mózgu umożliwia jednocześnie zaobserwowanie zmian aktywności neuronalnej w wielu obszarach mózgu, wywołanych treningiem apetytywnym. Spośród otrzymanej listy struktur wytypowano 10, które wykazywały najwyższy poziom ekspresji c-Fos po zadanym treningu oraz pogrupowano je zgodnie z ich lokalizacją w mózgu. Wśród nich znajdowały się należące do śródmózgowia: jądro tylne przedpokrywy (PPT), wzgórek górny (SCig-c) oraz brzuszne pole nakrywki (VTA). W kolejnej grupie znajdowały się struktury należące do grupy jąder wzgórza związanych z polimodalną korą asocjacyjną: jądro śródbłonkowe wzgórza grzbietowego (ILM), jądro przyśrodkowo- grzbietowe (MD), Perireunensis nucleus (PR), Jądro podprzyśrodkowe (SMT). Do ostatniej grupy struktur należących do jąder wzgórza związanych z korą sensomotoryczną zaliczały się: jądro podprzypęczkowe (SPFm) oraz ciało kolankowate (MG). Należy zauważyć, że są to często struktury położone w odległych od siebie regionach mózgu.





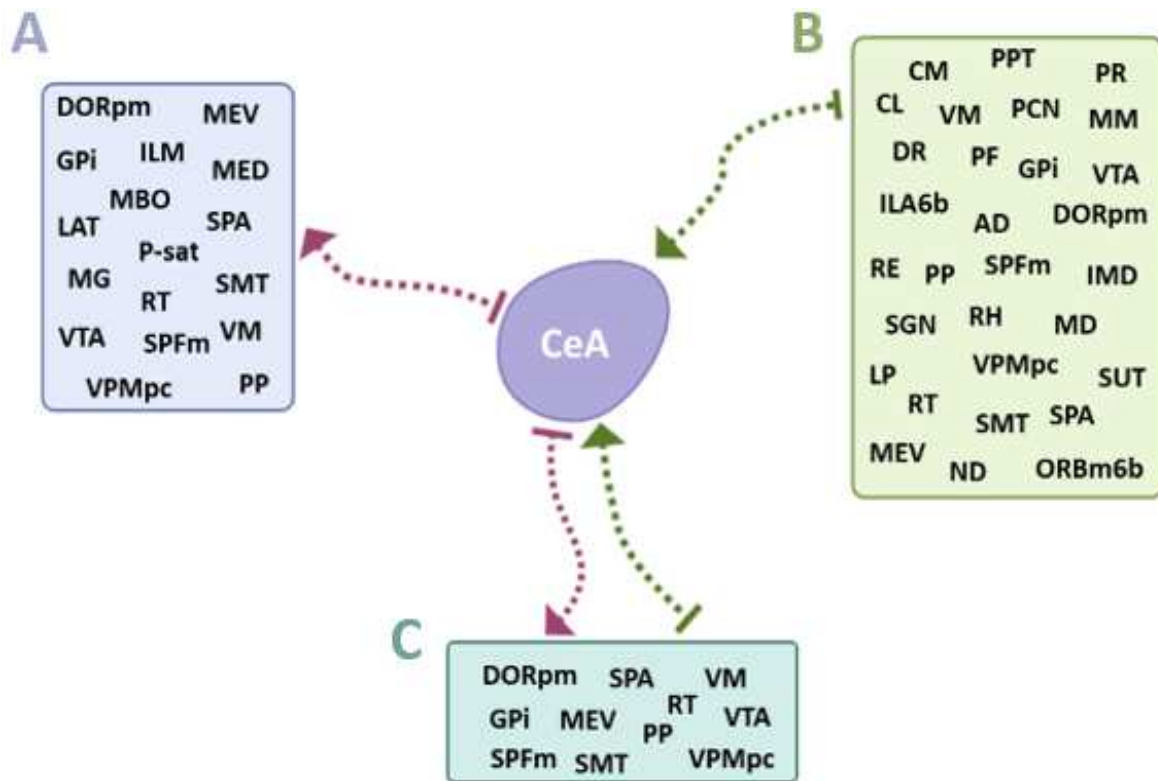


**Rycina 19. Podział struktur wykazujących wzrost ekspresji c-Fos po treningu apetytywnym w różnych regionach mózgu.** **A.** Kora nowa: Ald6b, Alv6b, Ila6b, MOpl, ORBm6b, SSp-bfd1, SSp-III1, SSp-m1, SSp-un1, VISa1. **B.** Śródmózgowie: DR, IV, SCig-c, PPT, VTA, MEV, ND, VTN. **C.** Jądra wzgórza związane z polimodalną korą asocjacyjną: AD, CL, CM, IAM, IAD, LP, PF, RE, LAT, PCN, RT, RH, ILM, IMD, MD, MED, SMT, PR, SGN. **D.** Jądra wzgórza związane z korą sensomotoryczną: MG, VPMPC, VM, PP, SPFM, SPA. **E.** Jądra mostu: CS, P-sat, POR, SUT, SLD. **F.** Podwzgórze: MM, MBO. **G.** Gałka biała: GPI. Dane przedstawiono jako wartość średnia  $\pm$  błąd standardowy. Liczba komórek c-Fos pozytywnych w mózgu zwierząt poddanych warunkowaniu apetytywnemu (n=6) z użyciem 10% sacharozy oraz zwierząt kontrolnych (n=4) pijących wodę. Zastosowano niesparowany dwustronny test t-Studenta, \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001. Akronimy struktur mózgowych nadano zgodnie z atlasem mózgu Allen Brain Atlas. Kompletna lista akronimów stanowi załącznik do pracy.

#### **4.5 Analiza połączeń neuronalnych występujących pomiędzy strukturami aktywowanymi treningiem apetytywnym.**

W kolejnym kroku przeprowadzono analizę *in silico* polegającą na sprawdzeniu połączeń neuronalnych pomiędzy strukturami, które różniły się liczbą komórek c-Fos pozytywnych po treningu apetytywnym. Do tego celu wykorzystano internetową bazę danych stworzoną przez *Allen Institute Publications for Brain Science*, dostarczającą informacji anatomicznych i fizjologicznych dotyczących mózgu myszy. Używając narzędzia *Mouse Brain Connectivity* przeanalizowano wchodzące i wychodzące projekcje neuronalne dla każdej z wyznaczonych struktur osobno. Analiza ta wykazała, że spośród 58 struktur wykazujących największe różnice pomiędzy badanymi grupami zwierząt, najwięcej połączeń neuronalnych z badanymi strukturami posiada jądro środkowe ciała migdałowatego (CeA). Warto zauważyć, że według uzyskanej mapy aktywności mózgu, CeA również wykazywało zwiększoną ekspresję c-Fos po uczeniu apetytywnym, jednakże poziom zmian nie spełniał warunków przyjętych do wytypowania struktur najsilniej aktywowanych ( $p < 0,05$  ( $-\log_{10}(0,05) = 1,3$ ) oraz co najmniej 2-krotna skala zmian ( $\log(2) = 0,7$ ). Na Rycinie 20 A-C przedstawiono wyniki uzyskane w tej części badań. W kolejnym kroku sprawdzono obecność projekcji wychodzących z CeA. Analiza wykazała, że 17 spośród 58 struktur wykazujących wysoką ekspresję białka c-Fos po treningu apetytywnym, otrzymuje projekcje z CeA (Ryc. 20 A). Z przeprowadzonej analizy wynika również, że do CeA dochodzą projekcje z 30 spośród badanych struktur (Ryc. 20 B). Ponadto, zidentyfikowano 11 struktur, które

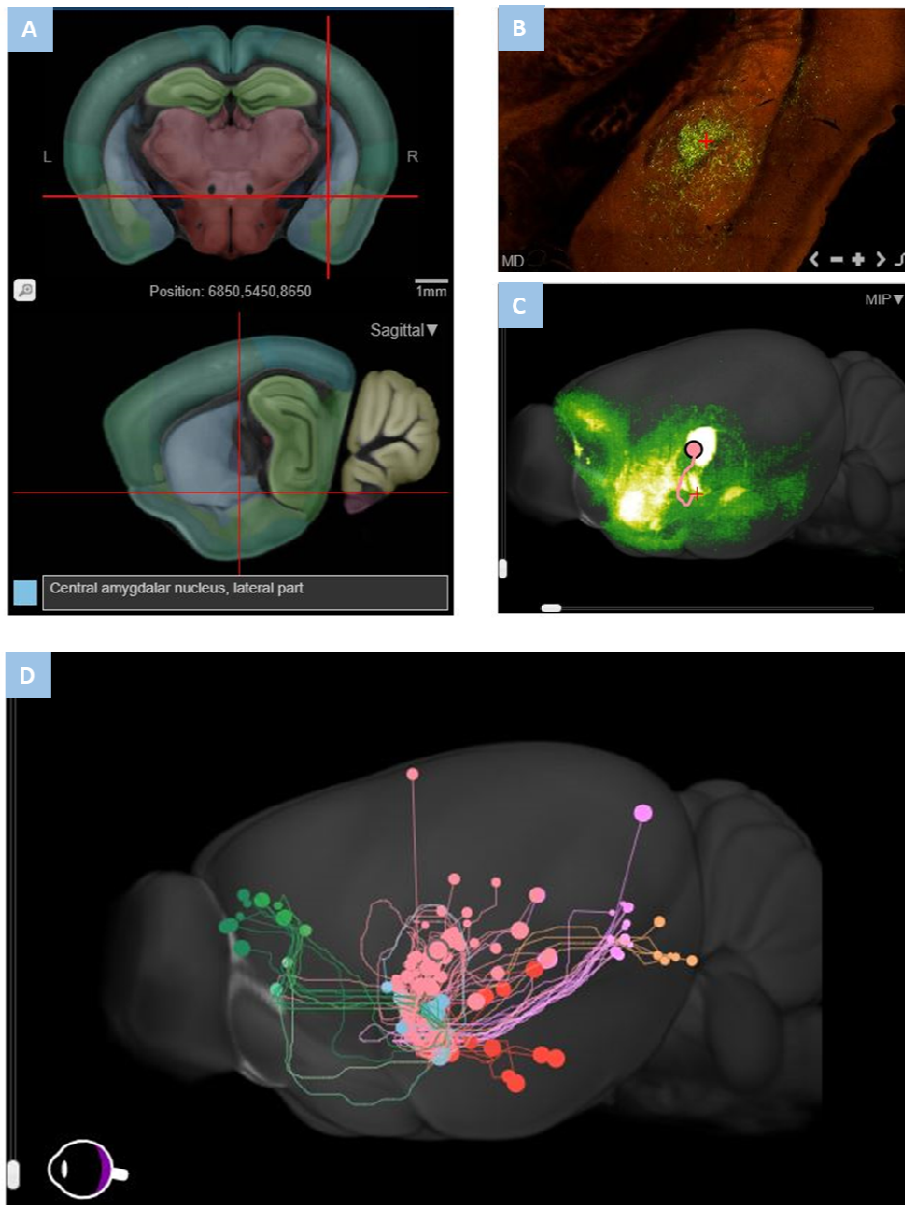
charakteryzowały się tym, że zarówno wysyłają jak i otrzymują projekcje z CeA (Ryc. 20 C). Na potrzeby grafiki zostały użyte nazwy skrócone struktur. Skróty nazw struktur nadano zgodnie z atlasem mózgu *Allen Brain Atlas*. Rozwinięcie nazw struktur zostało przedstawione w tabeli i dołączone jako załącznik do niniejszej rozprawy (załącznik 2).



**Rycina 20. Połączenia neuronalne CeA z innymi strukturami wykazującymi ekspresję białka c-Fos na skutek uczenia apetytywnego** A) Struktury otrzymujące projekcje z CeA. B) Struktury wysyłające projekcje do CeA. C) Struktury które zarówno otrzymują, jak i wysyłają projekcje do CeA. Akronimy nazw struktur użyte do stworzenia grafiki są nadane zgodnie z atlasem mózgu *Allen Brain Atlas*.

Uzyskane wyniki sugerują, że CeA może pełnić ważną rolę w przetwarzaniu informacji zdarzeń nacechowanych pozytywnie. Na Rycinie 21 umieszczono reprezentatywne wycinki obrazu przedstawiające wizualizacje przeprowadzonej analizy *in silico*, na przykładzie środkowego jądra ciała migdałowatego. Rycina 21 A przedstawia czołowy i strzałkowy przekrój mózgu myszy z zaznaczonymi strukturami anatomicznymi. Czerwone, przecinające się linie wskazują na strukturę, dla której połączenia neuronalne były aktualnie wyszukiwane. Na Rycinie 21 B przedstawiono trójwymiarowe zdjęcie mózgu myszy

z widocznymi na zielono projekcjami aksonów, wychodzącymi z miejsca iniekcji znacznika rAAV. Zdjęcie mikroskopowe na Rycinie 21 C przedstawia projekcje neuronalne docierające do CeA z przyśrodkowego jądra grzbietowego wzgórza (MD). Rycina 21 D przedstawia mapę projekcji wysyłanych do CeA ze struktur wykazujących ekspresję białka c-Fos na skutek treningu apetytywnego. W analogiczny sposób przeprowadzono analizę projekcji neuronalnych wychodzących z CeA.



**Rycina 21. Projekcje neuronalne wysyłane do CeA.** A) Czołowy i strzałkowy przekrój mózgu myszy z zaznaczonymi strukturami anatomicznymi. Czerwone, przecinające się linie wskazują CeA. B) Zdjęcie mikroskopowe skrawka mózgu przedstawiające w kolorze zielonym projekcje neuronalne docierające do CeA z przyśrodkowego jądra grzbietowego wzgórza (MD). C) Rekonstrukcja mózgu 3D ukazująca wyznakowane projekcje neuronalne wychodzące z jądra grzbietowego wzgórza (MD). Kolorem różowym zaznaczono projekcję wysyłaną do CeA. D) Mapa projekcji wysyłanych do CeA ze struktur wykazujących ekspresję białka c-Fos po treningu apetytywnym. Analiza została wykonana za pomocą internetowej bazy danych stworzonej przez *Allen Institute Publications for Brain Science*. Do przeprowadzenia analizy wykorzystano wtyczkę *Mouse Brain Connectivity*.

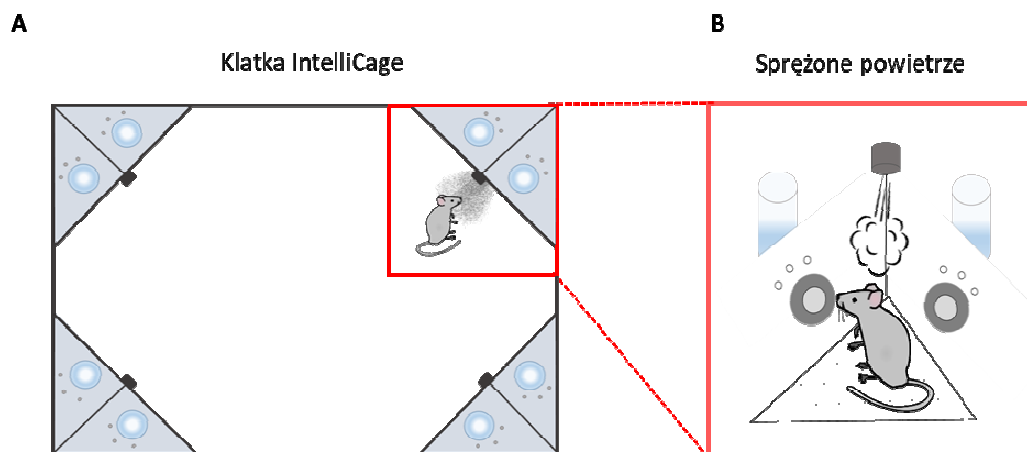


## **4.6 Udział części ciała migdałowatego w uczeniu apetytywnym i awersyjnym**

Mapowanie ekspresji białka c-Fos w mózgu podczas uczenia apetytywnego oraz wykonanie analizy *in silico* projekcji między strukturami wykazały, że CeA może pełnić szczególną rolę w tym procesie. W związku z tym, w kolejnych doświadczeniach skupiono się na dokładniejszym zbadaniu procesów zachodzących w CeA podczas uczenia zdarzeń pozytywnych. W tym celu, analogicznie do poprzedniego doświadczenia przeprowadzono trening apetytywny w klatkach IntelliCage. Trening ten polegał na wykształceniu preferencji miejsca do rogu, w którym podano butelki zawierające roztwór 10% sacharozy. Aby potwierdzić, że ekspresja białka c-Fos w CeA zachodzi w wyniku uczenia się zdarzeń pozytywnych, równocześnie przeprowadzono dwa doświadczenia kontrolne. W pierwszej grupie kontrolnej zwierzęta zamiast 10% sacharozy dostawały butelki z wodą. Z kolei w drugiej grupie kontrolnej przeprowadzono trening awersyjny, polegający na wykształceniu umiejętności unikania rogu, po umieszczeniu w nim bodźca awersyjnego. Bodźcem awersyjnym było dmuchnięcie sprężonym powietrzem podczas wizyty zwierzęcia w odpowiednim rogu.

### **4.6.1 Trening awersyjny w klatce IntelliCage**

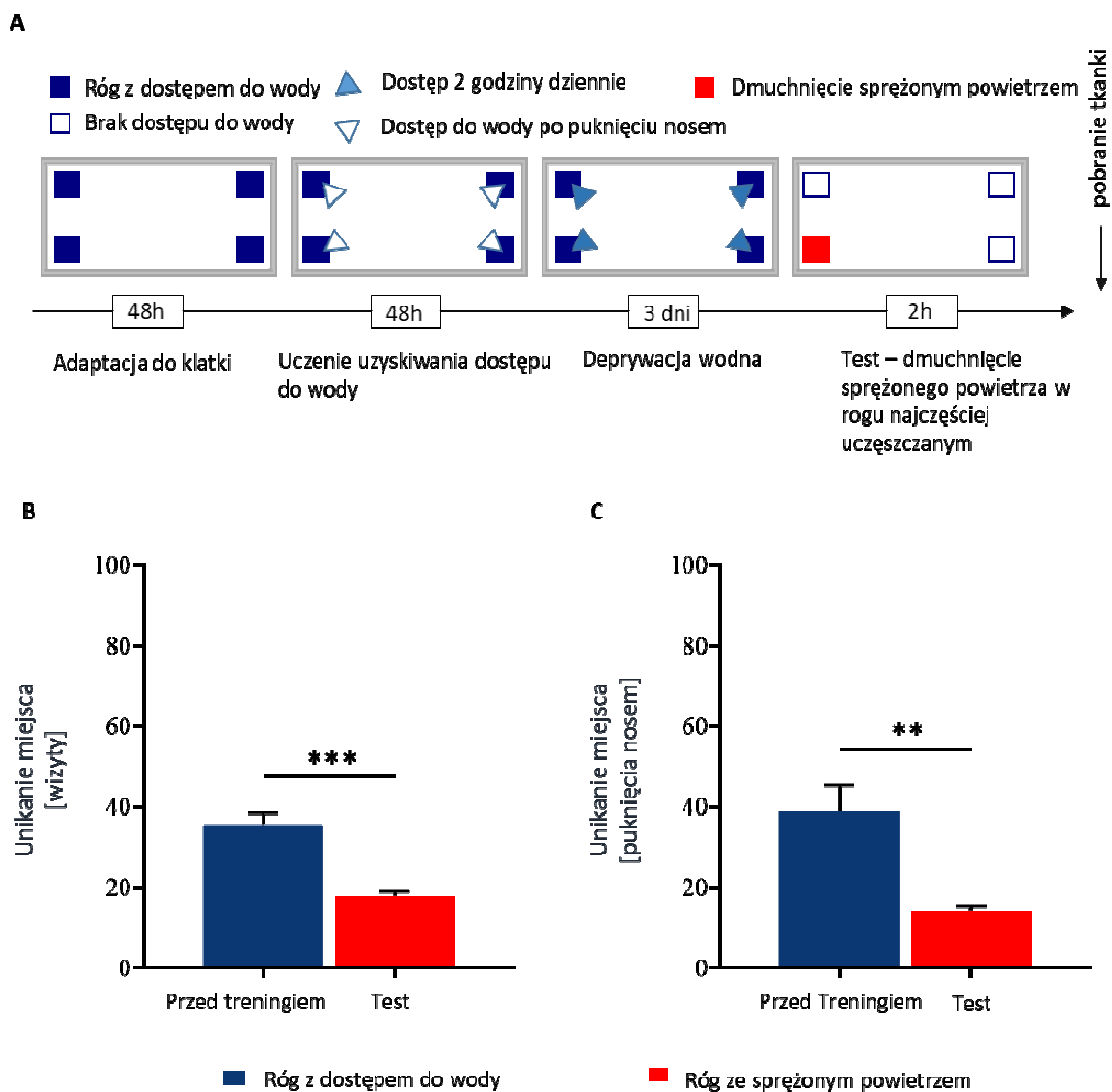
Odpowiedź poszczególnych części ciała migdałowatego na bodźce awersyjne zbadano w kolejnym doświadczeniu. Mianowicie przeprowadzono trening w klatce IntelliCage, który polegał na wykształceniu przez zwierzęta reakcji unikania miejsca, gdzie jako bodziec awersyjny zastosowano dmuchnięcie sprężonym powietrzem (Ryc. 22).



**Rycina 22. Schemat treningu awersyjnego w klatce IntelliCage.** A) Schemat klatki Intellicage – widok od góry. Na niebiesko zaznaczone butelki zawierające wodę, w prawym górnym rogu zaznaczono róg warunkowo awersyjnie za pomocą dmuchnięcia sprężonym powietrzem. B) Mysz wewnątrz rogu doświadczalnego, w którym jako bodziec awersyjny zastosowano dmuchnięcie sprężonym powietrzem – widok od środka klatki.

Procedura treningu awersyjnego została przeprowadzona według opublikowanego wcześniej protokołu (Knapska i in., 2006). Sesja doświadczalna rozpoczynała się od 2 dniowej adaptacji do klatki. W tym okresie myszy mogły swobodnie eksplorować klatkę, gdyż drzwiczki prowadzące do butelek były otwarte, zapewniając zwierzętom nieograniczony dostęp do wody. Następnie drzwiczki zostały zamknięte i otwierały się po wykonaniu *nosepoke* w stronę otworu prowadzącego do butelek. Zwiększenie motywacji zwierząt do poszukiwania wody osiągnięto za pomocą czasowego ograniczenia dostępu do butelek. Przez kolejne 3 dni zwierzęta posiadały dostęp do wody tylko przez 2 godziny dziennie, codziennie o tej samej porze. Po 2 godzinnej sesji picia wody, drzwiczki prowadzące do butelek były blokowane. W trakcie ostatniej sesji dla każdego zwierzęcia został wybrany róg z największą liczbą wizyt (róg najbardziej preferowany). Ostatniego dnia treningu, w rogu najbardziej preferowanym zastosowano dmuchnięcie sprężonym powietrzem w stronę zwierzęcia (bodziec awersyjny). Grupa zwierząt kontrolnych nie otrzymywała bodźca awersyjnego w żadnym z rogów. Dokładny schemat zastosowanego treningu przedstawiono na Rycinie 23A. Analizowano nabywanie umiejętności unikania miejsca po otrzymaniu bodźca awersyjnego. Dane dotyczące aktywności zwierząt przedstawiono jako liczba zarejestrowanych wizyt oraz *nosepoke* w rogu warunkowanym awersyjnie, w stosunku do sumy wizyt i puknięć nosem we wszystkich rogach. Proces uczenia się przedstawiono jako procent wykonanych wizyt i *nosepoke* w rogu warunkowanym w sesji poprzedzającej dzień

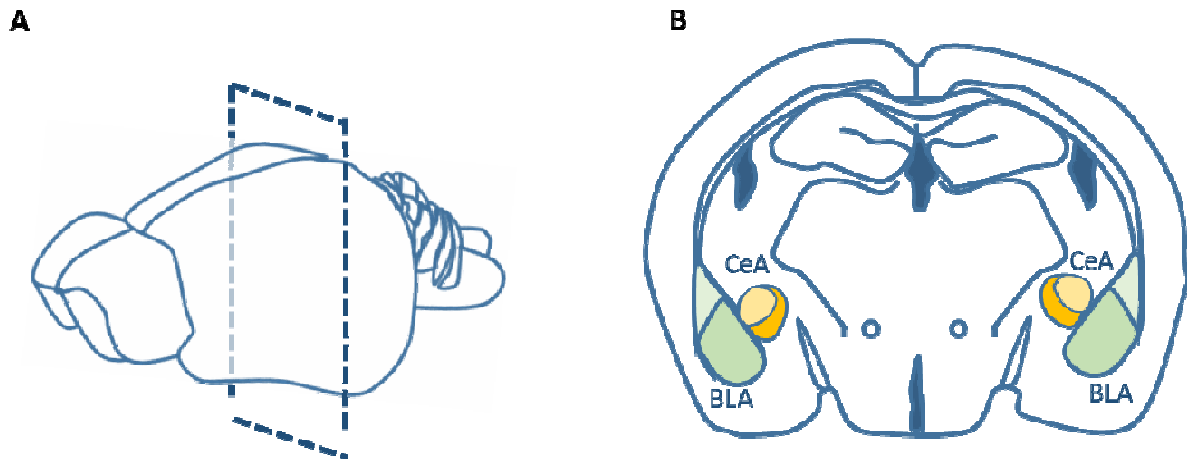
testowy i w trakcie wykonywania testu. Wyniki przedstawiono na Rycinie 23 B-C. Na Rycinie 23 B pokazano proces nabywania umiejętności unikania rogów wyrażony jako procent wizyt do rogu najczęściej uczęszczanego przed i po otrzymaniu w tym rogu bodźca awersyjnego. Uwagę zwraca spadek liczby wizyt do rogu najbardziej preferowanego po otrzymaniu w tym rogu dmuchnięcia sprężonym powietrzem. Rozkład normalny uzyskanych danych został zachowany, a niesparowany dwustronny test t-Studenta wykazał istotne zmiany pomiędzy sesjami ( $F(7,7)=6,8$ ,  $p=0,0001$ ,  $n=8$ ). Rycina 23 C przedstawia proces nabywania umiejętności unikania rogów wyrażony jako procent *nosepoke* skierowanych do otworów prowadzących do butelek z wodą w sesji przed oraz w trakcie warunkowania awersyjnego. Uwagę zwraca spadek liczby *nosepoke* w celu uzyskania dostępu do wody po otrzymaniu w tym rogu bodźca awersyjnego. Rozkład normalny uzyskanych danych został zachowany, a niesparowany dwustronny test t-Studenta wykazał istotne zmiany pomiędzy porównywanymi sesjami ( $F(7,7)=20,75$ ,  $p=0,0024$ ,  $n=8$ ). Uzyskane wyniki wskazują na nabycie umiejętności unikania miejsca warunkowanego negatywnie przez myszy, o czym świadczy spadek udziału odpowiedzi (zarówno wizyt, jak i *nosepoke*) w miejscu warunkowanym awersyjnie w stosunku do ogólnej liczby odpowiedzi we wszystkich rogach.



**Rycina 23. Uczenie awersyjne w klatce IntelliCage.** A) Schemat treningu awersyjnego: doświadczenie rozpoczynało się od 48 godz. adaptacji do klatki z nieograniczonym dostępem do wody we wszystkich rogach. Następnie przez kolejne 48 godz. dostęp do wody następował po wykonaniu przez mysz *nosepoke*. Kolejnym etapem była okresowa deprywacja wodna. Dostęp do wody ograniczony był do 2 godz. dziennie o stałej porze. Ostatnim etapem doświadczenia było warunkowanie awersyjne, podczas którego w najczęściej uczęszczanym rogu zostało wprowadzone dmuchięcie sprężonym powietrzem. Po upływie 90-120 min od kontaktu z bodźcem awersyjnym, myszy zostały uśmiercone, a ich mózgi zachowane do dalszych analiz. B) Unikanie rogów wyrażono jako procent wizyt do najczęściej uczęszczanego rogu, przed i po otrzymaniu w nim dmuchięcia sprężonym powietrzem. C) Unikanie rogów wyrażono jako procent puknięć nosem skierowanych do otworów prowadzących do butelek z wodą w sesji przed oraz w trakcie warunkowania awersyjnego. Dane na wykresach B i C przedstawiono jako wartość średnia  $\pm$  błąd standardowy, zastosowano niesparowany dwustronny test t-Studenta,  $n=8$ . Gwiazdkami oznaczono poziom istotności różnic między grupami: \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ , \*\*\* $p<0,001$ .

#### 4.6.2 Ekspresja c-Fos w jądrach ciała migdałowatego po treningu apetytywnym i awersyjnym

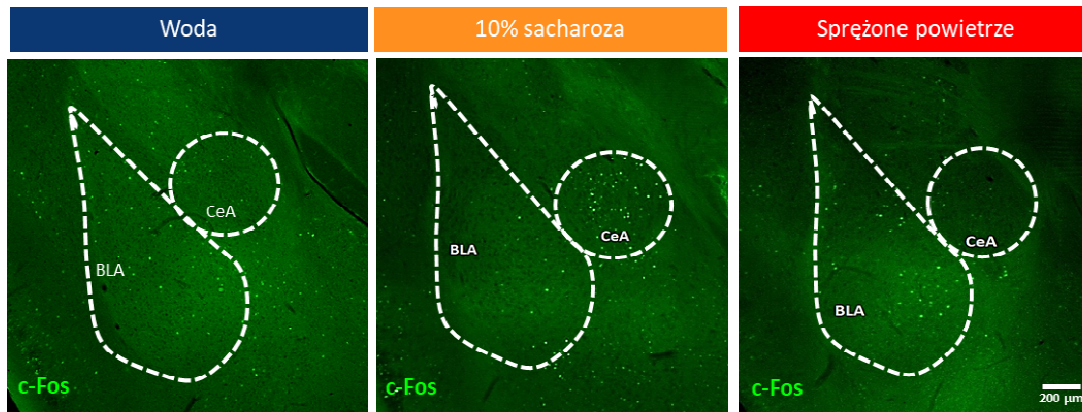
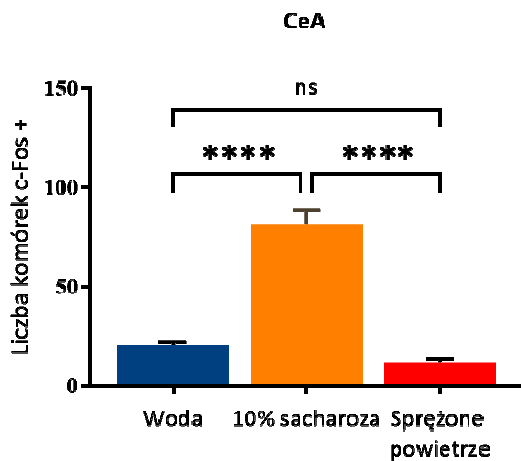
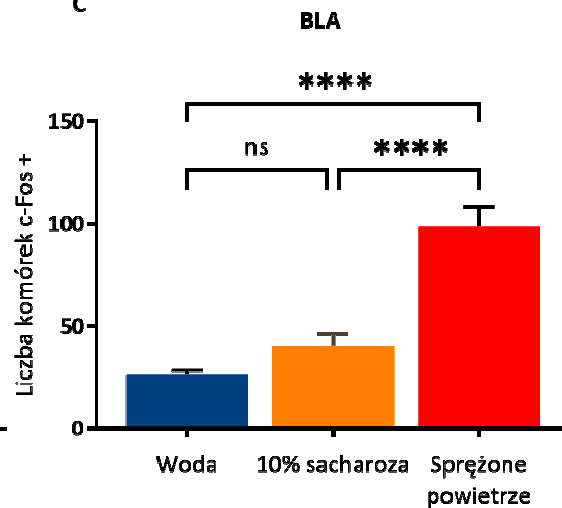
Po zakończeniu procedur behawioralnych myszy zostały poddane anestezji, a ich mózgi zostały wypreparowane, utrwalone i pokrojone na skrawki w płaszczyźnie czołowej (Ryc. 24 A-B).



**Rycina 24. Schemat przygotowania skrawków mózgu obejmujących obszar CeA.** A) Schemat wypreparowanego mózgu z zaznaczonym miejscem cięcia w płaszczyźnie czołowej. B) Schemat czołowego skrawka mózgu myszy obejmujący obszar ciała migdałowatego – żółtym kolorem zaznaczono jądra środkowe ciała migdałowatego (CeA) natomiast kolor zielony wskazuje na jądra podstawno-boczne ciała migdałowatego (BLA).

Wyniki uzyskane z mapowania ekspresji białka c-Fos w mózgu z użyciem mikroskopu LSM zostały potwierdzone w znakowaniu immunofluorescencyjnym tego białka na skrawkach w mózgu. Analizowano liczbę jąder komórkowych z ekspresją białka c-Fos w CeA oraz w BLA. Granice poszczególnych jąder jednakowo nanoszono manualnie na każdym skrawku, zgodnie z atlasem mózgu *Allen Brain Atlas*. Jądra komórkowe, które wykazywały ekspresję białka c-Fos były zaznaczano i zliczano w programie ImageJ. Rycina 25 A przedstawia przykładowe obrazy mikroskopowe z zaznaczonymi obszarami CeA i BLA dla grupy kontrolnej, apetytywnej oraz awersyjnej. Analiza liczby komórek wykazujących ekspresję białka c-Fos w obszarze CeA wykazała, że największa liczba komórek c-Fos-pozytywnych występowała w grupie poddanej treningowi uczenia się zdarzeń pozytywnych, z zastosowaniem 10% sacharozy. Z kolei u zwierząt poddanych treningowi

awersyjnemu zaobserwowano w CeA najmniejszą liczbę komórek z ekspresją tego białka (Ryc. 25 B). Analiza statystyczna wykazała, że otrzymane dane zachowują rozkład normalny. W celu porównania poziomu ekspresji białka c-Fos w różnych grupach doświadczalnych przeprowadzono analizę wariancji dla powtarzanych pomiarów z testem wielokrotnych porównań Tukey'a. Uzyskane wyniki wskazują na statystycznie najwyższą liczbę komórek c-Fos+ po uczeniu apetytywnym ( $F(2,19)=64.80$ ,  $p<0.0001$ ,  $n=11$ ) w porównaniu do grupy kontrolnej ( $n=11$ ) i awersyjnej ( $n=10$ ). Poziom ekspresji białka c-Fos w przypadku uczenia awersyjnego nie różnił się od liczby zaobserwowanych komórek c-Fos+ u zwierząt kontrolnych ( $p=0,268$ ). Analogiczną analizę przeprowadzono dla BLA (Ryc. 25 C). Z danych przedstawionych na wykresie wynika, że w przypadku BLA największą liczbę komórek z ekspresją c-Fos zaobserwowano u zwierząt warunkowanych awersyjnie. Wyniki te potwierdzono przeprowadzeniem analizy wariancji powtarzanych pomiarów z testem wielokrotnych porównań Tukey'a, która wykazała, iż zwierzęta traktowane sprężonym powietrzem miały największą liczbę komórek c-Fos+ w BLA spośród wszystkich badanych grup ( $F(2,19)=32,96$ ,  $p<0,0001$ ). Nie zaobserwowano zmiany poziomu ekspresji białka c-Fos w BLA w przypadku zwierząt pijących 10% roztwór sacharozy w porównaniu do grupy kontrolnej ( $p=0,299$ ). Uzyskane wyniki sugerują, iż CeA może być zaangażowane w proces uczenia się zdarzeń nacechowanych pozytywnie, podczas gdy BLA prawdopodobnie uczestniczy w procesowaniu zdarzeń awersyjnych.

**A****B****C**

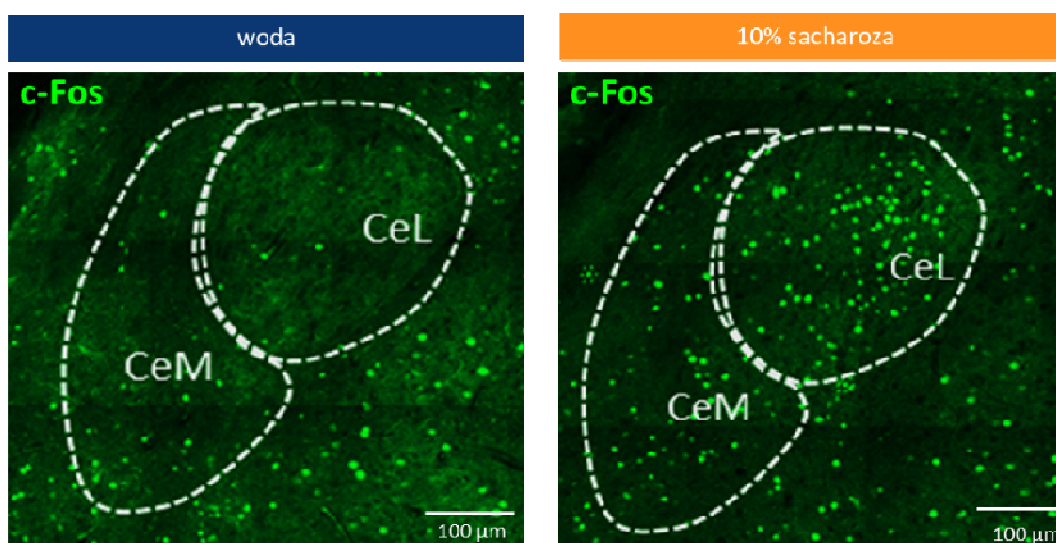
**Rycina 25. Udział jąder ciała migdałowatego w uczeniu apetytywnym i awersyjnym. A)** Przykładowe obrazy mikroskopowe przedstawiające znakowanie immunofluorescencyjne białka c-Fos z zaznaczonymi obszarami CeA i BLA, wykonane na skrawkach płatów czołowych mózgu myszy. **B)** Liczba komórek z ekspresją białka c-Fos w CeA w efekcie uczenia się zdarzeń nacechowanych pozytywnie oraz negatywnie w porównaniu do grupy pijącej wodę. **C)** Liczba komórek wykazująca ekspresję białka c-Fos w jądrze BLA w efekcie uczenia się zdarzeń nacechowanych pozytywnie (n=11) oraz negatywnie (n=10) w porównaniu do grupy pijącej wodę (n=11). Dane na wykresach D i E przedstawiono jako wartość średnia  $\pm$  błąd standardowy. Zastosowano analizę wariancji dla powtarzanych pomiarów z testem wielokrotnych porównań Tukey'a (\*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001).

#### **4.7 Udział poszczególnych części jądra środkowego ciała migdałowatego w uczeniu apetytywnym**

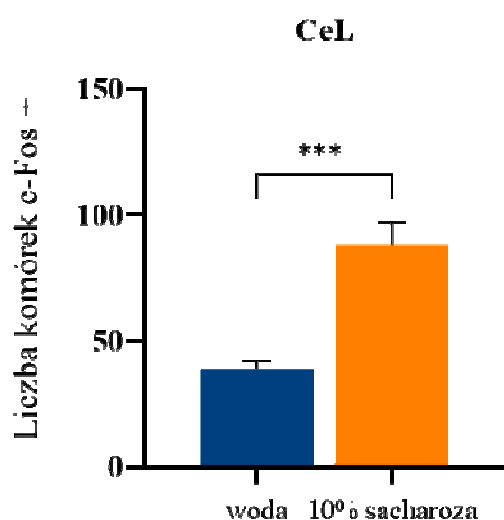
W kolejnych doświadczeniach postanowiono bardziej szczegółowo zbadać udział CeA w uczeniu się zdarzeń nacechowanych pozytywnie. Ponieważ CeA jest strukturą złożoną z kilku części, w kolejnych etapach skupiono się na zbadaniu części przyśrodkowej jądra środkowego ciała migdałowatego (CeM) oraz części bocznej jądra środkowego ciała migdałowatego (CeL). Poziom ekspresji białka c-Fos indukowanej w obu obszarach CeA na skutek treningu apetytywnego oznaczono za pomocą znakowania immunofluorescencyjnego. Na Rycinie 26 A widoczne są obrazy mikroskopowe przedstawiające czołowe skrawki mózgów myszy obejmujące jądro środkowe ciała migdałowatego. Przerywaną linią zaznaczono granice poszczególnych części CeA. Punkty w kolorze zielonym przedstawiają sygnał fluorescencyjny pochodzący z wyznakowanych jąder komórkowych, wykazujących ekspresję białka c-Fos. Na Rycinie 26 A zestawiono obrazy mikroskopowe przedstawiające wyznakowane komórki c-Fos pozytywne u myszy kontrolnych oraz u myszy poddanych treningowi apetytywnemu. Na przedstawionych obrazach mikroskopowych można zauważyć, że liczba komórek wykazujących ekspresję białka c-Fos jest większa u zwierząt pochodzących z grupy apetytywnej niż u zwierząt kontrolnych. Wykres na Rycinie 26 B przedstawia porównanie poziomu ekspresji białka c-Fos w części CeL dla zwierząt kontrolnych oraz zwierząt po treningu apetytywnym. Dane te pokazują zwiększoną liczbę komórek wykazujących ekspresję c-Fos u zwierząt będących w grupie apetytywnej w stosunku do liczby tych komórek u zwierząt kontrolnych. Rozkład normalny uzyskanych danych został zachowany, a niesparowany dwustronny test t-Studenta wykazał istotne zmiany pomiędzy porównywanymi grupami ( $F(7,7)=8,321$ ,  $p=0,0001$ ,  $n=8$ ) Wykres na Rycinie 26 C przedstawia poziom ekspresji białka c-Fos w CeM dla grupy kontrolnej i apetytywnej. Z tych danych wynika, że liczba komórek wykazujących ekspresję c-Fos w CeM była wyższa u zwierząt poddanych treningowi apetytywnemu, niż u zwierząt kontrolnych. W tym wypadku rozkład normalny analizowanych danych nie został zachowany. Zastosowanie statystyczna analiza porównawcza z wykorzystaniem dwustronnego testu Manna Whitney'a wykazało istotne różnice w liczbie komórek z ekspresją białka c-Fos pomiędzy obiema grupami myszy ( $p=0,0026$ ,  $n=8$ ). Uzyskane wyniki wskazują na to, że zarówno w CeL, jak i CeM po przeprowadzeniu warunkowania apetytywnego następuje zwiększona ekspresja c-Fos.



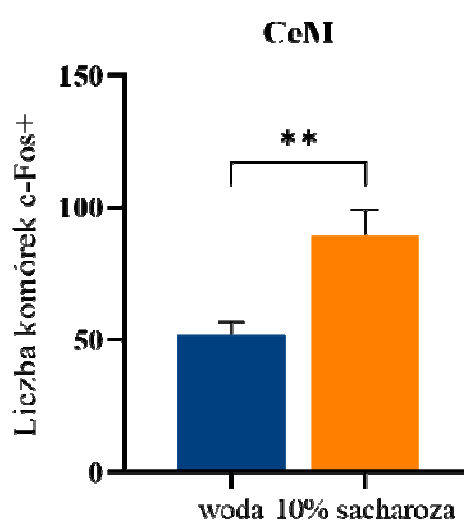
A



B



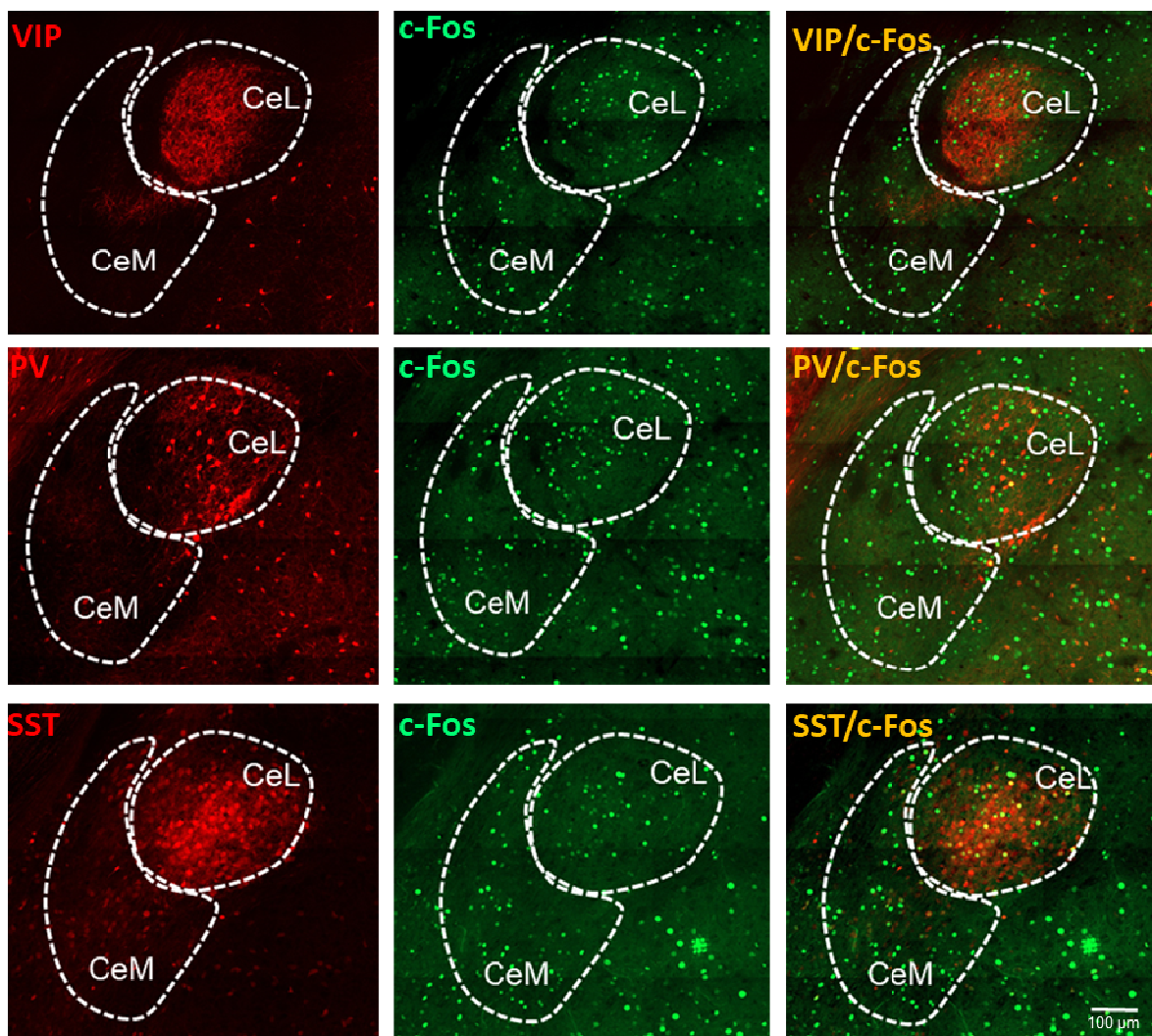
C



**Rycina 26. Udział CeL i CeM jądra środkowego ciała migdałowego w uczeniu apetytywnym.** A) Obrazy mikroskopowe przedstawiające czołowe skrawki mózgu myszy obejmujące jądro środkowe ciała migdałowego z widoczną ekspresją białka c-Fos (zielone jądra komórkowe) w CeL i CeM u myszy kontrolnych oraz warunkowanych apetytywnie. Liniami przerywanymi zaznaczono granice danych części CeA. Skala: 100μm. B) Liczba komórek z ekspresją białka c-Fos w CeL po uczeniu się zdarzeń nacechowanych pozytywnie w porównaniu do grupy kontrolnej. Niesparowany dwustronny test t-Studenta wskazuje na istotne zmiany pomiędzy porównywanymi grupami ( $F(7,7)=8,321$ ,  $p=0,0001$ ,  $n=8$ ). C) Liczba komórek wykazująca ekspresję białka c-Fos w CeM w efekcie uczenia się zdarzeń nacechowanych pozytywnie w porównaniu do grupy kontrolnej. Dwustronny test Mann'a Whitney'a wskazuje na istotne różnice w liczbie komórek wykazujących ekspresję białka c-Fos pomiędzy obiema grupami myszy ( $p=0,0026$ ,  $n=8$ ). Dane na wykresach B i C przedstawiono jako wartość średnia  $\pm$  błąd standardowy, (\* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ , \*\*\* $p<0,001$ ,  $n=10$ ).

#### **4.8 Identyfikacja typów neuronów środkowego jądra ciała migdałowatego wykazujących ekspresję białka c-Fos na skutek treningu apetytywnego**

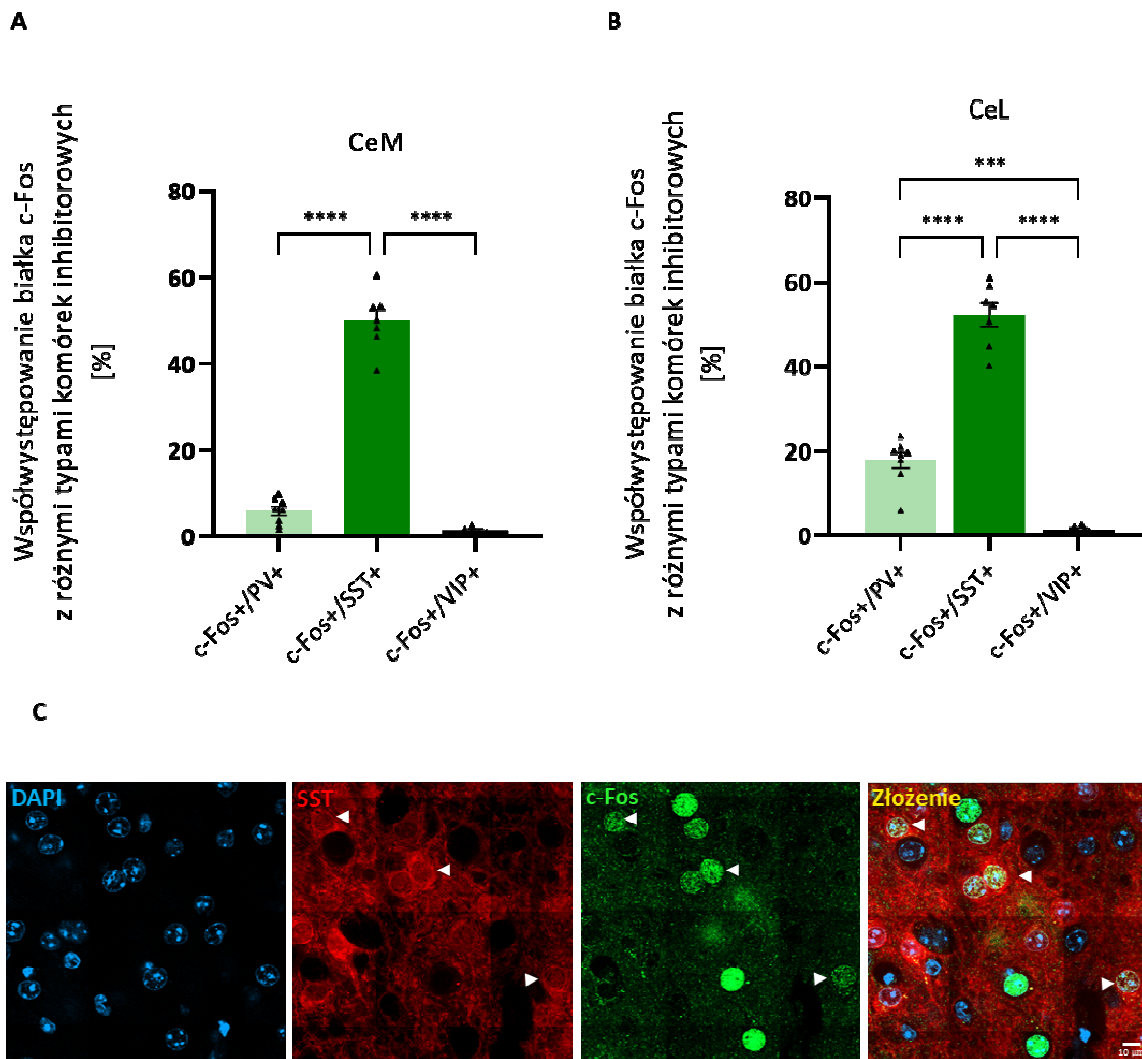
Następnie zidentyfikowano typy neuronów w obrębie CeA z ekspresją białka c-Fos indukowaną treningiem apetytywnym. Jądro środkowe ciała migdałowatego jest w większości złożone z neuronów hamujących (Cassell i in., 1986; McDonald, 1982). W niniejszej pracy skupiono się zatem na analizie tego rodzaju komórek. Wybrano 3 grupy neuronów hamujących: neurony somatostatynowe (SST+), neurony wazoaktywnego polipeptydu jelitowego (VIP+) oraz neurony parwalbuminowe (PV+). W celu stwierdzenia obecności c-Fos w neuronach hamujących wykorzystano myszy transgeniczne, w których białko czerwonej fluorescencji ulega ekspresji w neuronach SST+ (n=7), PV+ (n=8) i VIP+ (n=6). Ekspresję białka c-Fos indukowano poprzez poddanie myszy treningowi preferencji miejsca w klatce IntelliCage. Białko c-Fos wyznakowano metodami immunofluorescencji w skrawkach mózgu pobranych po treningu behawioralnym. Na Rycinie 27, w kolorze czerwonym pokazano wybrane typy neuronów hamujących i ich rozmieszczenie w CeL oraz CeM środkowego ciała migdałowatego. Kolejno, w kolorze zielonym uwidocznione są jądra komórkowe z obecnym białkiem c-Fos. Ostatnia kolumna przedstawia nałożone obrazy obecności białka c-Fos w neuronach hamujących.



**Rycina 27. Neurony hamujące (VIP, PV, SST) w poszczególnych częściach jądra środkowego ciała migdałowatego oraz ekspresja c-Fos wywołana warunkowaniem apetytywnym.** Obrazy mikroskopowe czołowych skrawków mózgu myszy pokazujące wybrane typy neuronów hamujących (kolor czerwony) oraz ekspresję białka c-Fos (kolor zielony) w CeL i CeM środkowego ciała migdałowatego w efekcie uczenia apetytywnego. W 3 kolumnie przedstawiono obrazy powstałe przez nałożenie obu kanałów. Spinning Disk, obj. 20x, skala: 100µm

Analiza otrzymanych obrazów mikroskopowych obejmowała zliczenie jąder komórkowych z ekspresją białka c-Fos we wszystkich neuronach, a następnie określenie liczby neuronów hamujących z ekspresją tego białka. Rycina 28 przedstawia ekspresję indukowanego treningiem apetytywnym białka c-Fos w neuronach hamujących zarówno CeL, jak i CeM. Wyniki przedstawiono jako procentowy stosunek liczby neuronów hamujących z ekspresją c-Fos do liczby wszystkich komórek c-Fos+. Rycina 28 B przedstawia ekspresję białka c-Fos w neuronach hamującymi CeL po treningu motywowanym apetytywnie.

Z podanych danych wynika, że w przypadku CeL, dystrybucja komórek z ekspresją białka c-Fos wynosiła:  $17,8 \pm 1,9\%$  (neurony PV+),  $52,3 \pm 2,9\%$  (neurony SST+) oraz  $1,52 \pm 0,3\%$  (neurony VIP+). Wszystkie przedstawione wartości zostały podane jako średnia  $\pm$  błąd standardowy. Analiza statystyczna wykazała, że rozkład normalny uzyskanych danych został zachowany. Różnice pomiędzy poszczególnymi grupami neuronów wykazało zastosowanie analizy wariancji dla powtarzanych pomiarów (ANOVA) z testem wielokrotnych porównań Tukey'a, które wykazały istnienie znaczących różnic pomiędzy badanymi grupami ( $F(2,18)=144,9$ ,  $p<0,0001$ ). Podsumowując, Rycina 23 A przedstawia dane z których wynika, że w przypadku CeL najbardziej liczną grupą neuronów hamujących z ekspresją białka c-Fos po treningu apetytywnym jest populacja neuronów SST+. Następnie przeprowadzono analogiczną analizę dla części CeM, a uzyskane wyniki przedstawiono na Rycinie 28 A. Wynika z nich, że w przypadku CeM dystrybucja komórek wykazujących ekspresję białka c-Fos wynosiła:  $5,85 \pm 1,1\%$  (neurony PV+),  $50,1 \pm 2,6\%$  (neurony SST+) oraz  $1,52 \pm 0,3\%$  (neurony VIP+). Podane wartości przedstawiono jako średnia  $\pm$  błąd standardowy. Rozkład normalny danych uzyskanych dla CeM został zachowany. Różnice pomiędzy poszczególnymi populacjami neuronów wykazano za pomocą analizy wariancji dla powtarzanych pomiarów (ANOVA) z testem wielokrotnych porównań Tukey'a. Analiza statystyczna wykazała różnice pomiędzy badanymi grupami ( $F(2,18)=256,8$ ;  $p<0,0001$ ). Z danych przedstawionych na Rycinie 28 A wynika, że dla części CeM, indukcja białka c-Fos w największej mierze występowała w neuronach SST+. Na Rycinie 28 C przedstawiono obrazy mikroskopowe czołowych skrawków mózgu myszy w powiększeniu  $63\times$  przedstawiające neurony SST+ środkowego ciała migdałowatego z ekspresją białka c-Fos po treningu apetytywnym. Białe strzałki wskazują reprezentacyjne neurony SST+ z c-Fos pozytywnym jądrem komórkowym. Podsumowując, neurony SST+ mogą być prawdopodobnie zaangażowane w proces uczenia się zdarzeń pozytywnych, o czym świadczy zwiększona ekspresja białka c-Fos w tych komórkach po treningu apetytywnym.



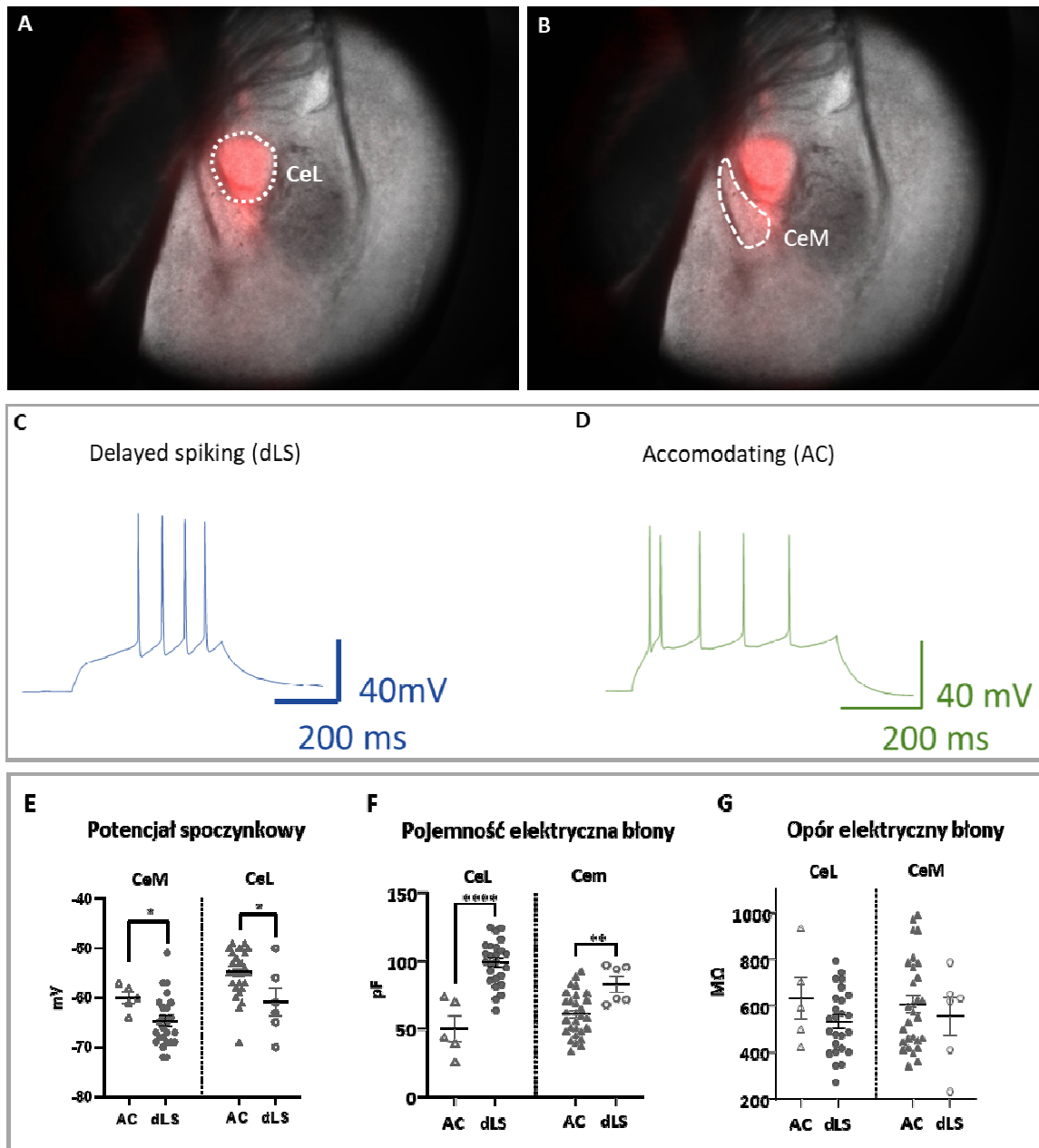
**Rycina 28. Identyfikacja neuronów zaangażowanych w proces uczenia apetytywnego w środkowym jądrze ciała migdałowatego.** A) Współwystępowanie białka c-Fos z wybranymi typami neuronów inhibitorowych po treningu apetytywnym w CeL: SST+ (n=7), PV+ (n=8) i VIP+ (n=6). Różnice pomiędzy poszczególnymi grupami neuronów wykazano poprzez zastosowanie analizy wariancji dla powtarzanych pomiarów (ANOVA) z testem wielokrotnych porównań Tukey'a ( $F(2,18) = 144,9, p < 0,0001$ ). C) Występowanie białka c-Fos w wybranych typach neuronów inhibitorowych po treningu apetytywnym w CeM: SST+ (n=7), PV+ (n=8) i VIP+ (n=6). Różnice pomiędzy poszczególnymi populacjami neuronów wykazano poprzez zastosowanie analizy wariancji dla powtarzanych pomiarów (ANOVA) z testem wielokrotnych porównań Tukey'a. ( $F(2,18) = 256,8, p < 0,0001$ ). Dane na wykresach B i C przedstawiono jako wartość średnia  $\pm$  błąd standardowy, (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ). D) Obrazy mikroskopowe czołowych skrawków mózgu myszy pokazujące neurony somatostatynowe CeA wykazujące ekspresję białka c-Fos po treningu apetytywnym przedstawione z użyciem większego powiększenia (63 $\times$ ). Od lewej: jądra komórkowe - DAPI (kolor niebieski), neurony somatostatynowe (kolor czerwony), jądra komórkowe z wybarwionym c-Fos (kolor zielony), obraz złożony. Białe strzałki wskazują przykłady neuronów somatostatynowych z c-Fos+ jądrem komórkowym. Skala: 10  $\mu$ m.

#### 4.9 Charakterystyka elektrofizjologiczna neuronów somatostatynowych CeA

Uzyskane wyniki pokazują, że w uczeniu apetytywnym białko c-Fos jest obecne przede wszystkim w neuronach SST+. Może świadczyć to o zachodzących w tych neuronach zmianach plastycznych związanych z uczeniem apetytywnym. Zachodzenie zmian neuroplastycznych potwierdzono w badaniach właściwości elektrofizjologicznych tych komórek. W celu scharakteryzowania neuronów SST+ w CeL i CeM, w pierwszym etapie zmierzono ich podstawowe parametry elektrofizjologiczne. Rejestracji sygnałów elektrycznych z pojedynczych neuronów SST+ dokonywano metodą *patch-clamp* przy pomocy szklanych kapilar. Pomiarów dokonywano w konfiguracji całej komórki, tzw. *whole-cell*, która polega na rejestrowaniu prądów z całej powierzchni błony neuronu. Podczas rejestracji kontakt elektryczny przebiega przez cytoplazmę nagrywanej komórki. Dokonywano rejestracji neuronów SST+ z obszaru CeA. Za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego, będącego częścią układu do rejestracji, identyfikowano neurony SST+, w których ekspresji ulega białko czerwonej fluorescencji tdTomato. Dzięki obecności tego białka możliwe było wyselekcjonowanie komórek do pomiarów elektrofizjologicznych. Na Rycinie 29 A-B pokazano neurony SST+ w częściach CeL (Ryc. 29 A) i CeM (Ryc. 29 B). Właściwości elektrofizjologiczne badanych neuronów scharakteryzowano za pomocą pomiarów podstawowych parametrów elektrycznych ich błony komórkowej, takich jak: potencjał spoczynkowy (mV), pojemność elektryczna (pF) i opór elektryczny (mW) oraz analizowano wzory generowanych potencjałów czynnościowych w odpowiedzi na podawany prąd. Parametry te zostały wyznaczone z tkanki zwierząt przebywających w klatce domowej, niepodlegających żadnej procedurze behawioralnej. Z uzyskanych danych wynika, że neurony SST+ w CeA można podzielić na dwie grupy różniące się pod względem wzorów generowanych potencjałów czynnościowych. Pierwsza grupa to neurony o wzorze wyładowań typu z ang. *accomodating spiking* (AC), natomiast druga to neurony generujące potencjały czynnościowe o wzorze nazywanym *delayed spiking* (dLS). Na Rycinie 29 C-D przedstawiono charakterystyczne schematy wzorów wyładowań dla obu grup neuronów SST+. Po dokonaniu podziału neuronów SST+, dla każdej z grup przeprowadzono pomiary podstawowych parametrów błony w obu częściach CeA – CeL i CeM. Rycina 29E-G przedstawia porównanie uzyskanych wyników dla grup neuronów SST+ (AC i dLS), w CeL oraz CeM. Z przedstawionych danych wynika, że badane grupy neuronów SST+ wykazywały różnice w spoczynkowym potencjale błonowym zarówno w obrębie CeL, jaki CeM

( $p=0,0255$  dla CeL i  $p=0,037$  dla CeM) (Ryc. 29 E). Analizę porównawczą przeprowadzono z wykorzystaniem dwustronnego testu Mann'a Whitney'a. W obrębie CeL neurony typu dLS SST+ wykazywały wyższy potencjał spoczynkowy błony niż neurony typu AC SST+, a w przypadku CeM, neurony typu dLS SST+ charakteryzowały się niższym potencjałem spoczynkowym błony niż neurony typu AC SST+. Pojemność elektryczna błony była z kolei mniejsza dla komórek AC niż dla dLS zarówno w CeL (Mann-Whitney,  $p<0,0001$ ) jak i w CeM (Mann-Whitney,  $p=0,0056$ ) (Ryc. 29 F). Jednocześnie, oba typy neuronów charakteryzowały się podobnym poziomem oporności elektrycznej błony w obu częściach CeA (Mann-Whitney,  $p=0,3005$  i  $p=0,8146$ , odpowiednio dla CeL i CeM) (Ryc. 29 G). Wyniki uzyskane w tej części badań umożliwiły podział neuronów SST+ na dwie różne grupy różniące się wzorem generowanych wyładowań. Co więcej, otrzymane wyniki pokazują, że neurony SST+ w CeL i CeM mają inne właściwości elektrofizjologiczne.





**Rycina 29. Elektrofizjologiczna charakterystyka komórek somatostatynowych w CeA.**

**A-B)** Obraz mikroskopowy komórek SST+ w skrawkach mózgu zwierząt transgeniczných. tdTomato występuje w komórkach SST+. Przerywane linie wyznaczają obszar rejestracji elektrofizjologicznych dla CeL (A) oraz CeM (B). **C)** Przykładowy wzór wyładowań dla komórek typu delayed spiking (dLS). **D)** Przykładowy wzór wyładowań dla komórek typu accomodating (AC). **E-F)** Przykładowe parametry opisujące właściwości błony komórek somatostatynowych w jądrze CeL i CeM. **E)** Komórki typu AC wykazywały większy potencjał spoczynkowy niż komórki typu dLS, zarówno w CeL jak i CeM. (Mann-Whitney test,  $p=0,0255$  dla CeL i  $p=0,037$  dla CeM). **F)** Komórki typu AC charakteryzowały się mniejszą pojemnością elektryczną błony niż komórki typu dLS, zarówno w CeL jak i CeM. (Mann-Whitney,  $p<0,0001$  dla CeL i  $p=0,0056$  dla CeM). **G)** Komórki typu AC jak i dLS charakteryzowały się podobnym poziomem oporności elektrycznej błony w obu częściach CeA (Mann-Whitney,  $p=0,3005$  i  $p=0,8146$ , odpowiednio dla CeL i CeM).



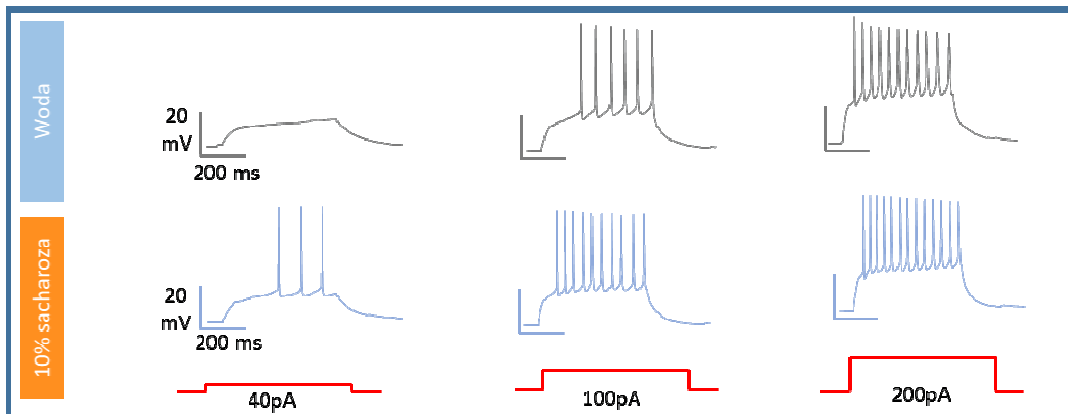
#### 4.10 Wpływ uczenia apetytywnego na właściwości elektrofizjologiczne komórek somatostatynowych w CeL i CeM

Wpływ uczenia apetytywnego na zmianę podstawowych właściwości i pobudliwości własnej błony komórkowej neuronów SST+ w CeA wykonano rejestrując sygnały elektryczne tych komórek. W tym celu, myszy przebywające w klatce domowej (po 2 osobniki na klatkę) zostały poddane treningowi apetytywnemu. Polegał on na podawaniu przez 3 dni, codziennie o tej samej porze roztworu 10% sacharozy. Efekt nagrody wzmocniono za pomocą 22 godzinnej deprivacji wodnej, przed podaniem 10% sacharozy. Grupę kontrolną warunkowano w analogiczny sposób lecz zamiast 10% sacharozy podawano samą wodę. Rycina 30 przedstawia schemat behawioralny zastosowany w tym doświadczeniu. W odpowiednim punkcie czasowym zwierzęta zostały uśmiercone, a ich mózgi przygotowane do przyżyciowych rejestracji elektrofizjologicznych. Rejestracji sygnałów elektrycznych z pojedynczych neuronów SST+ dokonywano metodą *patch-clamp* przy pomocy szklanych kapilar. Pomiarów dokonywano w konfiguracji całej komórki, tzw. *whole-cell*, podczas której prądy rejestrowane są z całej powierzchni błony neuronu, a kontakt elektryczny zachodzi przez cytoplazmę nagrywanej komórki. Rejestracji dokonywano z neuronów SST+ w obszarze CeA. Neurony SST+ identyfikowano poprzez obrazowanie czerwonej fluorescencji tdTomato za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego, będącego częścią układu do rejestracji. W tabeli przedstawiono podział liczbowy neuronów SST+ w poszczególnych częściach CeA (CeL i CeM) ze względu na wzór ich wyładowań. Z przedstawionych danych wynika, że dla części CeL większość neuronów SST+ charakteryzowała się wzorem wyładowań typu dLS zarówno u zwierząt kontrolnych jak i warunkowanych apetytywnie. W przypadku CeM zdecydowana większość neuronów SST+ charakteryzowała się wzorem wyładowań typu AC w obu analizowanych grupach zwierząt. Dlatego w dalszych analizach przedstawiono wyniki dla dominujących typów neuronów SST+ CeM i CeL. Rycina 30B przedstawia reprezentatywne wzory wyładowań komórek dLS SST+ CeL w odpowiedzi na 3-etapowe, zwiększające się natężenie prądu depolaryzującego dla myszy kontrolnej (woda) oraz myszy poddanej treningowi apetytywnemu. Analogicznie, na rycinie 30C przedstawione są wzory wyładowań komórek AC SST+ zaobserwowane w CeM. W obu przypadkach można zauważyć, że częstotliwość generowanych potencjałów w odpowiedzi na zwiększone natężenie prądu była wyższa u zwierząt warunkowanych apetytywnie, niż u zwierząt pijących samą wodę (grupa kontrolna).

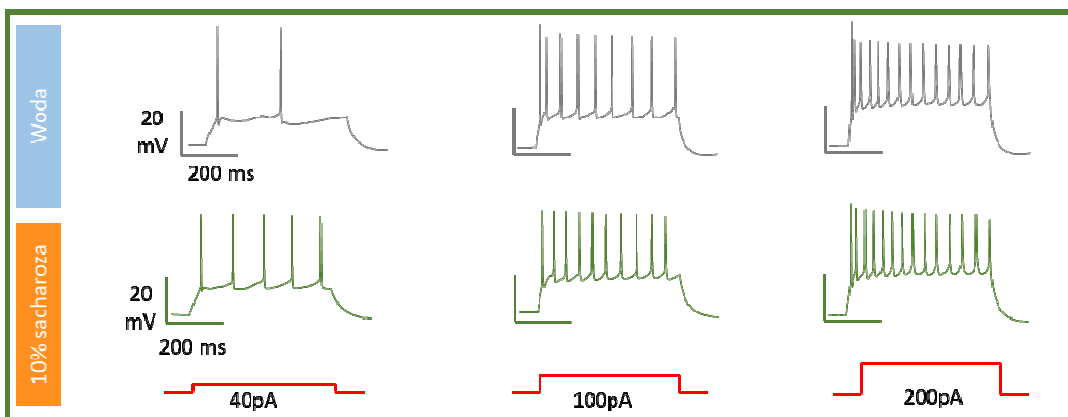
A

	CeL		CeM	
	Woda	10% sacharoza	Woda	10% sacharoza
AC	5	13	29	21
dLS	26	18	6	0
Inne	1	1	2	7
Suma	32	32	37	28
Liczba zwierząt	10	7	10	6

B



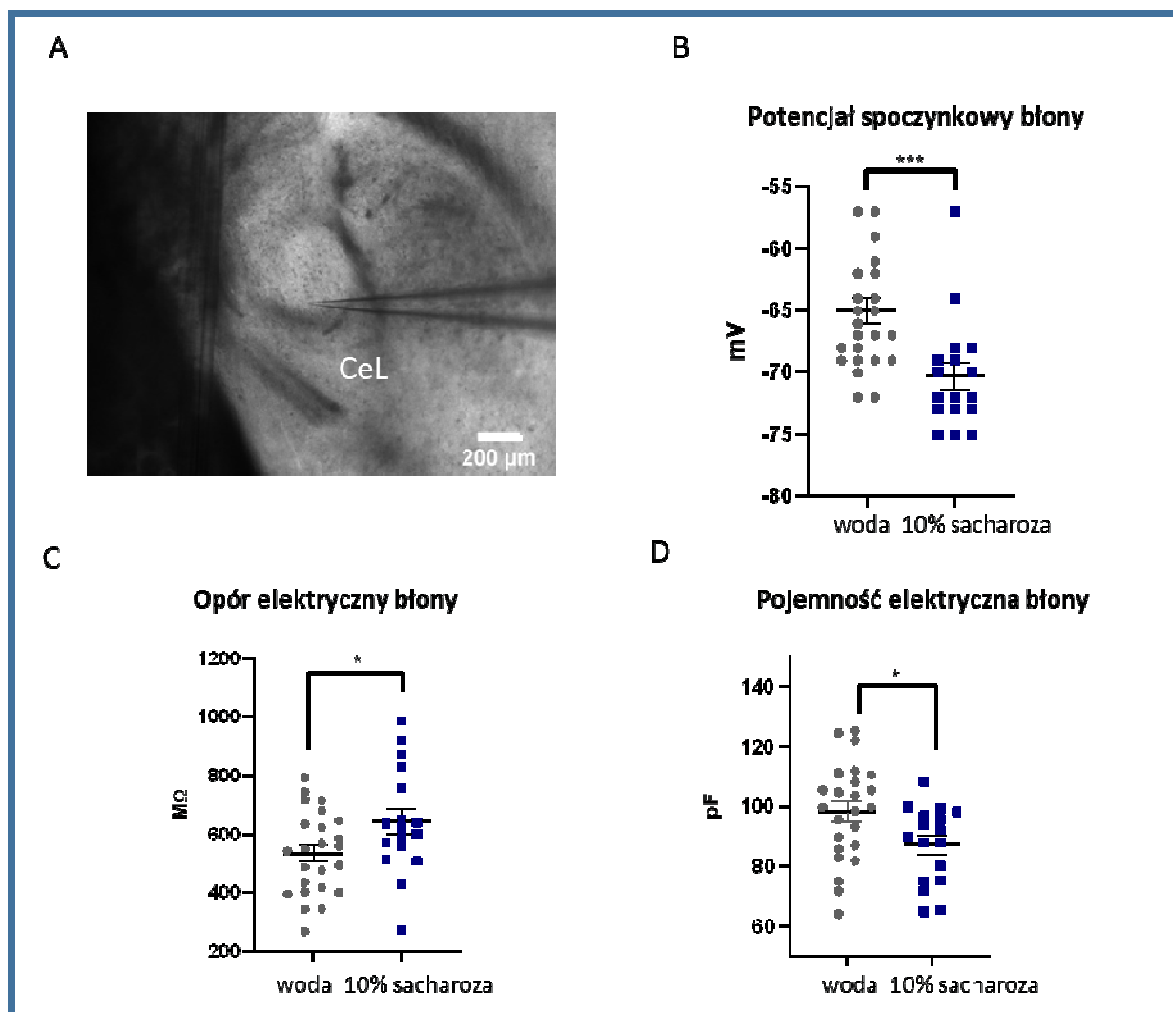
C



**Rycina 30. Wpływ uczenia apetytywnego na pobudliwość własną i parametry błony neuronów somatostatynowych w CeA.** A) Tabela przedstawia zestawienie liczbowe wszystkich zarejestrowanych komórek somatostatynowych w CeL i CeM dla grupy kontrolnej oraz apetytywnej. Tabela zawiera podział liczbowy komórek somatostatynowych ze względu na wzór ich wyładowań (AC i dLS). Przedstawione dane wskazują na to, że większość komórek jądra CeL charakteryzowała się wzorem wyładowań typu dLS zarówno u zwierząt kontrolnych ( $n=10$ ) jak i warunkowanych apetytywnie ( $n=7$ ). W przypadku CeM zdecydowana większość neuronów SST+ charakteryzowała się wzorem wyładowań typu AC w obu analizowanych grupach (grupa kontrolna  $n=10$ ; grupa apetytywna  $n=6$ ). B) Reprezentatywne schematy wyładowań komórek dLS SST+ CeL w odpowiedzi na 3-etapowe, zwiększające się natężenie prądu depolaryzującego dla myszy kontrolnej (woda) oraz myszy poddanej treningowi apetytywnemu. C) Schematy wyładowań komórek AC SST+ zaobserwowane w CeM dla grupy kontrolnej oraz apetytywnej.

#### **4.11 Wpływ uczenia apetytywnego na pobudliwość własną i parametry błony neuronów somatostatynowych w CeL i CeM**

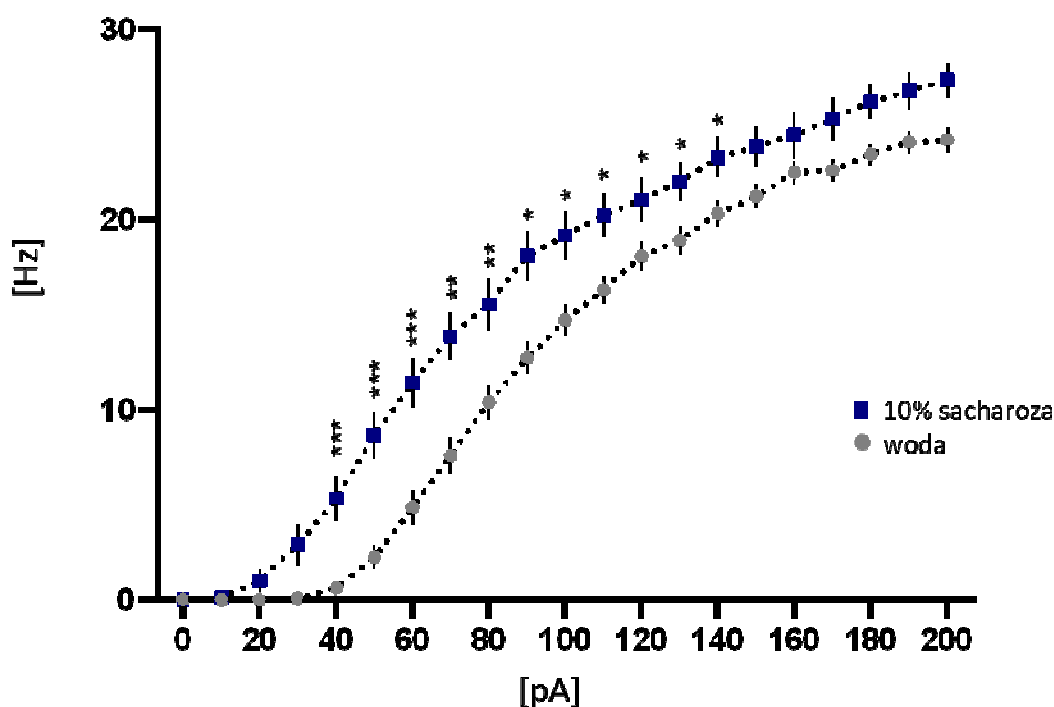
W celu zbadania wpływu uczenia się zdarzeń pozytywnych na powstawanie zmian plastycznych neuronów SST+ zmierzono podstawowe właściwości elektryczne błon tych neuronów, zarówno u zwierząt warunkowanych apetytywnie (n=8), jak i kontrolnych (n=10). Rejestracje dokonywano z komórek SST+ części CeL. Komórki SST+ identyfikowano dzięki fluorescencji białka  $\tau$ Tomato związanego z promotorem somatostatynowym. W przypadku zwierząt pijących wodę dane pochodzą z 24 zarejestrowanych komórek, natomiast w grupie apetytywnej dane przedstawiają rejestracje z 17 komórek. Na Rycinie 31 A przedstawiono przyżyciowe zdjęcie mikroskopowe skrawka mózgu z widoczną elektrodą zlokalizowaną w miejscu rejestracji. Do analizy wybrano dominujący dla CeL typ neuronów SST+, czyli komórki z wzorem wyładowań typu dLS. W przypadku komórek dLS SST+ jądra CeL, warunkowanie apetytywne skutkowało następującymi zmianami parametrów błony komórkowej: obniżenie potencjału spoczynkowego (Mann-Whitney,  $p=0,0010$ ) (Ryc. 31 B), wzrost oporu elektrycznego (niesparowany test t-Studenta,  $p= 0,0254$ ) (Ryc. 31 C) oraz obniżenie elektrycznej pojemności (niesparowany test t-Studenta,  $p=0,0143$ ) (Ryc. 31 D).



**Rycina 31. Wpływ uczenia apetytywnego na parametry błony neuronów somatostatynowych typu dLS w CeL.** A) Zdjęcie mikroskopowe skrawka mózgu z widoczną elektrodą umieszczoną w CeL. B-D) Zmiany podstawowych parametrów błony komórkowej neuronów na skutek uczenia się zdarzeń pozytywnych. Rejestracje przeprowadzono w 24 komórkach należących do zwierząt pijących wodę (n=10 zwierząt, n=24 komórki), oraz w 17 komórkach pochodzących od zwierząt grupy apetytywnej (n=6 zwierząt, n=17 komórek). Przeprowadzony trening apetytywny spowodował: **B)** obniżenie potencjału spoczynkowego błony (Mann-Whitney,  $p=0,0010$ ), **C)** wzrost oporu elektrycznego błony (niesparowany test t-Studenta,  $p=0,0254$ ) oraz **D)** obniżenie elektrycznej pojemności (niesparowany test t-Studenta,  $p=0,0143$ ).

Analiza wykazała również znamiennej wzrost pobudliwości własnej badanych neuronów SST+ na skutek warunkowania apetytywnego (test Kolmogorowa-Smirnowa,  $p=0,0126$ ) (Ryc. 32).

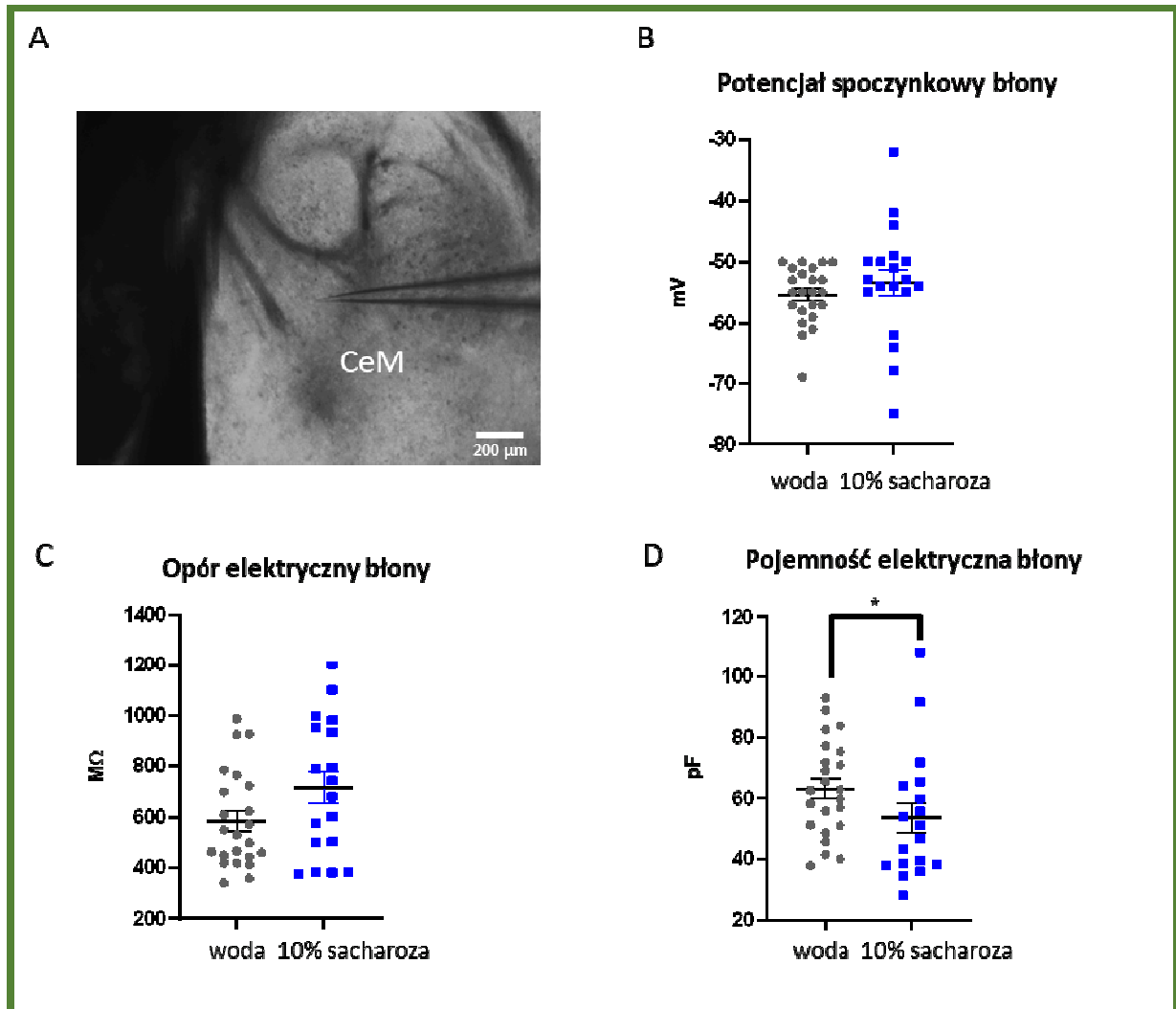
## Pobudliwość własna



**Rycina 32. Wpływ uczenia apetytywnego na pobudliwość własną neuronów somatostatynowych typu dLS w CeL.** Rejestracje przeprowadzono w 24 komórkach należących do zwierząt pijących wodę (n=10 zwierząt, n=24 komórki), oraz w 17 komórkach pochodzących od zwierząt grupy apetytywnej (n=6 zwierząt, n=17 komórek). Uzyskane wyniki wykazują znamienne wzrost pobudliwości własnej badanych neuronów SST+ w jądrze CeL na skutek warunkowania apetytywnego (test Kolmogorowa-Smirnova,  $p=0,0126$ ).

Analogiczne rejestracje elektrofizjologiczne przeprowadzono dla neuronów SST+ typu AC zlokalizowanych w CeM. Na Rycinie 33 A przedstawiono obraz mikroskopowy przyżyciowego skrawka mózgu z widoczną elektrodą w miejscu rejestracji elektrofizjologicznych. Porównywano parametry fizjologiczne błony komórkowej dla grupy zwierząt warunkowanych apetytywnie (n=6) oraz grupy kontrolnej (n=10). Do analizy wybrano komórki, które występowały najliczniej w tej części CeA i charakteryzowały się wzorem wyładowań elektrycznych charakterystycznym dla komórek AC. Zaprezentowane wyniki pochodzą z 23 zarejestrowanych komórek (grupa zwierząt pijących wodę), oraz z 19 komórek zwierząt warunkowanych apetytywnie. W przypadku podtypu AC neuronów SST+

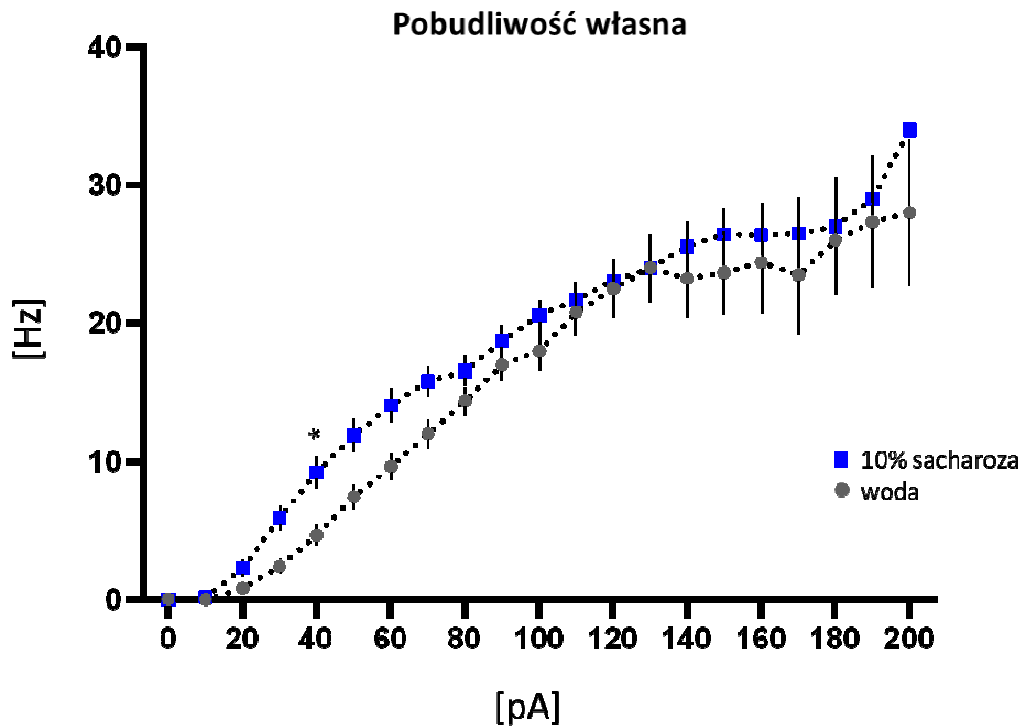
jądra CeM, warunkowanie apetytywne skutkowało spadkiem pojemności elektrycznej błony (Ryc. 33D). Pozostałe parametry błony komórkowej nie wykazały znamienych różnic pomiędzy badanymi grupami (Ryc. 33 B-C)



**Rycina 33. Wpływ uczenia apetytywnego na parametry błony neuronów SST+ typu AC w CeM.** **A)** Zdjęcie mikroskopowe żywego skrawka mózgu z widoczną elektrodą zlokalizowaną w CeM. Rejestracje przeprowadzono w 23 komórkach należących do zwierząt pijących wodę (n=10 zwierząt, n=23 komórki), oraz w 19 komórkach pochodzących od zwierząt grupy apetytywnej (n=6 zwierząt, n=19 komórek. Przeprowadzony trening apetytywny spowodował: **B-D)** Zmiany podstawowych parametrów błony komórkowej neuronów na skutek uczenia się zdarzeń pozytywnych. **B)** Nie zarejestrowano istotnych zmian potencjału spoczynkowego błony **C)** Brak zmian oporu elektrycznego błony **D)** zaobserwowano obniżenie elektrycznej pojemności błony

Analiza nie wykazała istotnych różnic w pobudliwości własnej neuronów SST+ na skutek warunkowania apetytywnego, jednakże jak wynika z wykresu przedstawionego na Rycinie

27E, uzyskane dane wykazują tendencję do wzrostu pobudliwości własnej neuronów SST+ typu AC w CeM w wyniku warunkowania apetytywnego (Ryc. 34).



**Rycina 34. Wpływ uczenia apetytywnego na pobudliwość własną neuronów somatostatynowych typu AC w CeM.** Rejestracje przeprowadzono w 23 komórkach należących do zwierząt pijących wodę (n=10 zwierząt, n=23 komórki), oraz w 19 komórkach pochodzących od zwierząt grupy apetytywnej (n=6 zwierząt, n=19 komórek). Zaobserwowano wzrost pobudliwości własnej badanych neuronów SST+ w jądrze CeM na skutek warunkowania apetytywnego.

Dane uzyskane z tej części doświadczenia, pokazujące zmiany właściwości elektrycznych błony komórkowej oraz wzrost pobudliwości własnej neuronów SST+ CeA po zastosowanym treningu, mogą świadczyć o zachodzących w tych neuronach zmianach plastycznych leżących u podstaw uczenia apetytywnego.

## 5. Dyskusja

Głównym celem badań przedstawionych w niniejszej rozprawie było zbadanie zmian w ekspresji białka c-Fos w uczeniu apetytywnym. c-Fos jest często stosowanym znacznikiem aktywności mózgu prowadzącej do powstania zmian plastycznych podczas uczenia się i tworzenia śladów pamięci. Ekspresja białka c-Fos została wywołana treningiem polegającym na wytworzeniu preferencji miejsca do 10% roztworu sacharozy. Najważniejsze wyniki badań przedstawione w niniejszej rozprawie wskazują na to, że uczenie apetytywne powoduje globalny wzrost poziomu ekspresji białka c-Fos w wielu strukturach mózgu, a strukturą mogącą pełnić kluczową rolę w tym typie uczenia jest jądro środkowe ciała migdałowatego (CeA). Co więcej, z przeprowadzonych badań wynika, że populacją neuronów CeA, potencjalnie zaangażowanych w uczenie apetytywne są neurony SST+, na co wskazuje zwiększona ekspresja c-Fos oraz wzrost pobudliwości tych neuronów w wyniku przeprowadzonego treningu apetytywnego.

### **5.1 Uczenie apetytywne powoduje zwiększoną ekspresję c-Fos w wielu strukturach mózgu.**

Profil zmian ekspresji białka c-Fos w mózgu zachodzący podczas uczenia apetytywnego scharakteryzowano przez zastosowanie zmodyfikowanego protokołu treningu apetytywnego opublikowanego przez Knapską i in., 2006. Trening behawioralny został przeprowadzony w zautomatyzowanym systemie IntelliCage, który jak już wcześniej pokazano (De Hoz i in., 2018; Kiryk i in., 2020; Knapska i in., 2013) jest niezwykle użyteczny w badaniu zachowań zarówno apetytywnych jak i awersyjnych (Knapska i in., 2006). Zastosowany trening to najczęściej używany protokół uczenia się w systemie IntelliCage, czyli uczenie przestrzenne ze wzmocnieniem apetytywnym, nazywane tu nabywaniem preferencji miejsca. W treningu tym oczekuje się, że zwierzę znajdzie nagrodę w jednym z czterech rogów IntelliCage. Nagrodą może być woda (Barlind i in., 2010; Cathomas i in., 2015; Onishchenko i in., 2007) lub woda słodzona (Barlind i in., 2010; Codita i in., 2010; Kiryk i in., 2008, 2011; Knapska i in., 2006). W niniejszych badaniach zastosowano trening, który polegał na wytworzeniu preferencji miejsca do roztworu 10% sacharozy (Knapska i in., 2006). Z przeprowadzonych



doświadczeń wynika, że w trakcie doświadczenia myszy wykształciły preferencję miejsca, o czym świadczy wzrost wizyt i *nosepoke* w kierunku butelki z 10% sacharozą.

W celu identyfikacji neuronów, w których dochodzi do zainicjowania procesów plastyczności neuronalnej wywołanych treningiem apetytywnym, zastosowano immunofluorescencyjne wykrywanie białka c-Fos, które jest czynnikiem transkrypcyjnym aktywowanym w trakcie pewnych form stymulacji neuronów (Kaczmarek i in., 1988; Nikolaev i in., 1992). Uważa się, że modyfikacje transkrypcyjne mają kluczowe znaczenie dla uczenia się i rozwoju uzależnień (Bali i Kenny, 2019; Robison i Nestler, 2012). Zmiany ekspresji genów mogą prowadzić do trwałych modyfikacji aktywności poszczególnych neuronów oraz całych obwodów neuronalnych i ostatecznie prowadzić do utrwalenia zmian w zachowaniu (Mews i in., 2019; Yap i Greenberg, 2019). Warto zauważyć, że we wcześniejszych badaniach zwiększoną ekspresję mRNA *c-fos* obserwowano wyłącznie wtedy, gdy zwierzęta uczyły się nowego zadania, a nie wtedy, gdy wykonywały już wyuczone zadanie (Nikolaev, Werka, i in., 1992). W związku z tym można stwierdzić, że białko c-Fos pojawia się w komórkach nerwowych tylko wtedy, gdy dany neuron jest stymulowany w warunkach czyniących go podatnym na plastyczność synaptyczną (De Hoz i in., 2018). W dostępnej literaturze istnieje wiele doniesień dotyczących ekspresji c-Fos w odrębnych populacjach neuronów. Dostępne badania dostarczają przykładów indukcji ekspresji tego białka w licznych obszarach mózgu wynikających z zastosowania konkretnego warunkowania (Bitto, 2014; Herrera i Robertson, 1996; Robison i Nestler, 2012; Dragunow i Robertson, 1987). Jednakże nadal brakuje globalnego obrazu ekspresji c-Fos w mózgu występującego podczas uczenia się zdarzeń nacechowanych pozytywnie. Aby stworzyć mapę struktur mózgowych, które odpowiadały na zadany trening behawioralny mózgi myszy zostały poddane procedurze oczyszczania optycznego metodą iDISCO+ (Renier i in., 2014), połączoną ze znakowaniem immunofluorescencyjnym białka c-Fos oraz zobrazowania w mikroskopie arkusza światła LSM. Podobne podejście zastosowano w badaniach dotyczących identyfikacji obwodów neuronalnych odpowiedzialnych za mechanizm kierujący poszukiwaniem i konsumpcją pożywienia. W badaniach tych porównywano ekspresję c-Fos u myszy poddanych deprivacji żywieniowej oraz karmionych *ad libitum*. Za pomocą profilowania molekularnego wykazano, że deprivacja pokarmowa powoduje aktywację ekspresji c-Fos w wielu regionach mózgu, takich jak: śródmózgowie, wzgórze oraz niektóre podregiony podwzgórza. Szczególnie wysoki poziom ekspresji c-Fos zaobserwowano w rdzeniowym jądrze szwu, które uznano za ważny węzeł kontrolujący balans energetyczny organizmu (Nectow i in., 2017). Mapowanie ekspresji c-Fos w całym mózgu wykorzystano

również w badaniach dotyczących aktywacji poszczególnych regionów mózgu przez leki obniżające wagę. Związki te wykazały zróżnicowane działanie w obszarach mózgu regulujących homeostazę energetyczną i odżywianie oraz wskazały obszary mózgu i jądra, które mogą stanowić cele dla przyszłych terapii przeciw otyłości (Hansen i in., 2021). Badania prowadzone przez zespół S. Tonegawy dowodzą, że określona pamięć jest rozłożona na wiele, często oddalonych od siebie obszarów mózgu. Obszary te są ze sobą połączone funkcjonalnie i określane jako kompleks engramów, czyli zespołów neuronalnych, które przechowują określoną pamięć. Za pomocą detekcji aktywności c-Fos przedstawiono kompleksową mapę engramów pamięci powstałych podczas reakcji warunkowania strachu (Roy i in., 2022). Zmiany plastyczności neuronalnej na poziomie całego mózgu spowodowanej stresem przedstawiono również w badaniach prowadzonych przez zespół A. Sarabdjitsingh (Bonapersona i in., 2022). Mapując aktywację c-Fos w neuronach, podjęto próbę odpowiedzi na pytanie czy wszystkie neurony w obrębie jednej struktury aktywowane są w równym stopniu i w tym samym czasie po zastosowaniu bodźca awersyjnego (drażnienie prądem). Wykazano, że zastosowanie warunkowania awersyjnego spowodowało aktywację 96% obszarów w mózgu, jednakże aktywacja ta zachodziła w specyficznej dynamice czasowej. Jako pierwsze zostały aktywowane komórki podwzgórza, następnie jądra ciała migdałowatego i hipokamp i na końcu obszary wzgórza. Co więcej zaobserwowano różnice w czasie aktywacji komórek w obrębie jednej struktury. Przykładowo, komórki przedniej części jądra podstawnobocznego ciała migdałowatego aktywowane były wcześniej niż komórki tylnej części tego jądra (Bonapersona i in., 2022). W innych badaniach wykorzystano obrazowanie pojedynczych komórek wykazujących ekspresję c-Fos w całym mózgu aby zidentyfikować aktywność neuronalną występującą w efekcie przerwania przewlekłej ekspozycji na wybrane psychostymulanty. Wykazano, że odstawienie środków psychostymulujących powoduje zmiany w strukturze sieci neuronalnej, w tym wzrost łączności funkcjonalnej między regionami mózgu (Kimbrough i in., 2021). Z przytoczonych powyżej przykładów badań wynika, że mapowanie plastyczności mózgu za pomocą znakowania c-Fos, połączone z obrazowaniem w mikroskopie LSM jest z powodzeniem stosowane w celu wyjaśnienia wielu paradygmatów behawioralnych. Jednakże globalny profil ekspresji c-Fos w mózgu zachodzącej podczas uczenia apetytywnego nie został dotąd dobrze poznany i opisany. Dlatego też badania przedstawione w niniejszej rozprawie dotyczyły scharakteryzowania tego procesu. Uzyskaliśmy wysoką jakość zachowania architektury tkanki podczas procesów oczyszczania i obrazowania, dzięki czemu obrazy 3D mózgu mogły być automatycznie dopasowane do standardowego atlasu anatomicznego mózgu myszy.

Dzięki zastosowaniu algorytmu automatycznego zliczania komórek wykryliśmy aktywowane regiony mózgu w całej półkuli mózgowej z rozdzielczością do pojedynczej komórki. Nasza analiza ujawniła kompletną mapę struktur, które charakteryzowały się różnymi profilami ekspresji c-Fos. Wykazano, że całkowita liczba komórek c-Fos pozytywnych była większa w mózгах zwierząt poddanych treningowi apetytywnemu, niż w mózгах pochodzących od zwierząt kontrolnych. Globalne podejście do profilowania aktywności c-Fos w mózgu dostarcza informacji o poszczególnych strukturach jak i obwodach neuronalnych, które mogą brać udział w procesowaniu zdarzeń apetytywnych. Po określeniu całkowitej liczby komórek c-Fos pozytywnych przeprowadzono analizę ekspresji c-Fos w indywidualnych strukturach mózgu. Niniejsze badanie rozwinęło technikę mapowania tego białka wprowadzając analizę sygnału pochodzącego od c-Fos z dokładniejszymi szczegółami anatomicznymi mózgu, które obejmowały wiele struktur i warstw. Bazując na obrazach mikroskopowych, dopasowanych do atlasu anatomicznego mózgu myszy Allen Brain Atlas, zidentyfikowano około 790 struktur, spośród których 390 wykazywało ekspresję białka c-Fos. Wykazano, że 170 struktur charakteryzowało się zwiększonym poziomem ekspresji białka c-Fos u zwierząt poddanych treningowi apetytywnemu w porównaniu do zwierząt kontrolnych.

W celu wytypowania struktur wykazujących największe różnice w liczbie komórek c-Fos pozytywnych, przeprowadzono dodatkową analizę statystyczną między badanymi grupami zwierząt. Uzyskane dane wskazują, że 54 struktury wykazywały co najmniej 2-krotnie większą liczbę komórek c-Fos pozytywnych w grupie apetytywnej, niż w kontrolnej. Struktury te umiejscowione są w różnych regionach mózgu. Wykazano, wzrost poziomu ekspresji c-Fos dla 12 struktur będących częścią kory nowej, 8 struktur należących do śródmózgowia, 19 struktur należących do jąder wzgórza związanych z polimodalną korą asocjacyjną, 6 struktur należących do jąder wzgórza związanych z korą sensomotoryczną, 5 struktur należących do grupy jąder mostu, 2 struktury należące do podwzgórza, a także 1 strukturę, która jest częścią gałki bladej. Przedstawione wyniki pokazują, że zmiany profilu aktywacji c-Fos, prowadzące do powstania plastyczności neuronalnej wywołanej treningiem apetytywnym następują w wielu obszarach mózgu jednocześnie.

Wśród struktur z największym poziomem ekspresji c-Fos znajdowały się, należące do śródmózgowia: jądro tylne przedpokrywy (PPT), wzgórek górny (SCig-c) oraz brzuszne pole nakrywki (VTA). Z dostępnych danych literaturowych wynika, że jądro tylne przedpokrywy (PPT) związane jest przetwarzaniem sygnałów somatosensorycznych. Kontroluje ono zachowania łowieckie, a także jest związane z otyłością (Antinucci i in., 2019; Shang i in., 2019; Timshel i in., 2020). Wzgórek górny (SCig-c) bierze udział w reakcjach obronnych

polegających na przekazywaniu informacji podczas wizualnej stymulacji strachu (Liu i in., 2022). Aktywację tego obszaru opisano niedawno również podczas nadmiernego spożywania alkoholu u szczurów (Rapp i in., 2022). SCig-c należy do jednej z najważniejszych struktur mózgu odpowiedzialnej za kontrolę wzrokową uwagi przestrzennej. Jego rola w modulacji aktywności neuronalnej związanej z uwagą jest szeroko badana (Cavanaugh i Wurtz, 2004; Herman i in., 2018; Lovejoy i Krauzlis, 2010; Yu i in., 2022). Ponadto zaobserwowano udział wzgórka górnego w uczeniu i zapamiętywaniu zdarzeń nacechowanych pozytywnie. W badaniach tych przeprowadzono warunkowanie polegające na samodzielnym podawaniu granulek słodkiego pokarmu poprzez naciskanie na dźwignię przez szczura. Warunkowanie to zostało sprzężone z pojawiającym się sygnałem świetlnym. Zastosowanie sygnałów świetlnych ułatwiło uczenie się i utrwalanie pamięci długotrwałej. Wzgórek górny szczurów eksponowanych na sygnał świetlny wykazywał zwiększoną aktywność neuronalną, rozbudowane rozgałęzienia dendrytyczne oraz ekspresję białka i mRNA czynnika neurotroficznego pochodzenia mózgowego (BDNF) (Lin i in., 2014). Jako obszar wykazujący wysoki poziom c-Fos po treningu apetytywnym zidentyfikowano również pole brzuszne nakrywki. Jak wiadomo, jest to część śródmózgowia wchodząca w skład układu nagrody, zbudowana w większości z neuronów dopaminowych. Obszar brzusznej nakrywki (VTA) charakteryzuje się występowaniem silnych projekcji dopaminergicznych do regionów przodomózgowia, które według wielu dostępnych doniesień pełnią kluczową rolę w regulacji nagrody (Bouarab i in., 2019; Taniguchi i in., 2011) oraz motywacji i procesów poznawczych (Kim i in., 2021; McLaughlin i Floresco, 2007). Co więcej, udział VTA opisywane jest również w rozwoju uzależnień (Authement i in., 2016; Lüscher i Malenka, 2011).

W kolejnej grupie znajdowały się struktury należące do grupy jąder wzgórza związanych z polimodalną korą asocjacyjną: jądro śródbłonkowe wzgórza grzbietowego (ILM), jądro przyśrodkowo- grzbietowe (MD), Perireunensis nucleus (PR), jądro podprzyśrodkowe (SMT). Są to regiony odpowiedzialne za funkcje poznawcze (Parnaudeau i in., 2019), kodowanie i odzyskiwanie pamięci skojarzeniowej (Geier i in., 2020) oraz synchronizację działań instrumentalnych (Lusk i in., 2020). Do ostatniej grupy struktur wykazujących wysoką ekspresję c-Fos w odpowiedzi na trening apetytywny należą struktury wchodzące w skład jąder wzgórza związanych z korą sensomotoryczną: jądro podprzypęczkowe (SPFm) oraz ciało kolankowate (MG). Z dostępnej literatury wynika, że SPFm związane jest z zachowaniami seksualnymi (Balfour i in., 2006; Hamson i Watson, 2004). Ponadto wykazano, że podczas warunkowania strachu dochodzi do zwiększonej ekspresji c-Fos w tej

strukturze (du Plessis i in., 2022). Z kolei MG służy nie tylko jako ważny składnik szlaków słuchowych prowadzących ze śródmózgowia do kory słuchowej, ale także integruje różne sygnały wejściowe przed projekcją do kory mózgowej (Mansour i in., 2021). Warto zauważyć, że wymienione wyżej struktury pełnią wiele zróżnicowanych funkcji, a tylko część z nich jest zaangażowana w procesy uczenia i zapamiętywania. Jednakże, większość z nich nie była zbadana w kontekście uczenia apetytywnego.

Struktury, które wykazały najwyższą aktywność c-Fos w efekcie uczenia apetytywnego należą do różnych części mózgu, często położonych od siebie w dużej odległości i niejednokrotnie pełniących odmienne funkcje. Koncepcja, że pamięć jest przechowywana nie tylko w pojedynczym zespole komórek engramowych, ale w wywołanych przez uczenie się trwałych zmianach w wielu funkcjonalnie połączonych zespołach neuronów została zaproponowana przez R. Semona i D. Hebbą (Semon, 1921; Hebb, 1949). Eksperymentalne dowody na poparcie tej koncepcji uzyskano dzięki obserwacji, że ekspresja genów zachodząca podczas warunkowania strachu zachodzi w rozległych, zdefiniowanych behawioralnie obwodach neuronalnych (Helmstetter i in., 2008). Dzięki wynikom uzyskanym w ramach tej pracy można wnioskować, że uczenie apetytywne powoduje przebudowę funkcjonalnej architektury mózgu. Wysoce prawdopodobne jest, że nawet odległe struktury, w odpowiedzi na trening uczenia apetytywnego tworzą nowe sieci funkcjonalne niezbędne do powstania śladów pamięciowych.

Techniki mapowania całego mózgu pozwalają na uzyskanie dużych zbiorów danych dotyczących aktywności anatomicznej i funkcjonalnej. Niewątpliwą zaletą przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy badań jest to, że uzyskane wyniki wnoszą niedostępne wcześniej w zwierzęcych modelach informacje o globalnej aktywności mózgu pod wpływem uczenia apetytywnego, które znacznie przekraczają rozdzielczość strukturalną w badaniach prowadzonych z udziałem ludzi. Większość skanerów MRI używanych do celów medycznych może osiągnąć typową rozdzielczość około  $1,5 \times 1,5 \times 4 \text{ mm}^3$  w urządzeniach 3T i 0,5 w rzadziej dostępnych urządzeniach 7-T. Przejście na wyższą rozdzielczość jest jednak nadal wyzwaniem, w związku z występowaniem wyraźnych biologicznych efektów ubocznych: ludzie mogą doświadczać zawrotów i bólów głowy podczas poruszania się w i poza skanerem (Nowogrodzki, 2018). Ponadto badania na ludziach są ograniczone przez względy etyczne (np. ponowna ekspozycja na alkohol u pacjentów uzależnionych). Globalne profilowanie plastyczności mózgu w modelach zwierzęcych uzupełnia badania na ludziach. Dzięki niemu zidentyfikowano struktury przypuszczalnie kluczowe w procesie uczenia się zdarzeń nacechowanych pozytywnie. Biorąc pod uwagę podobieństwo procesu uczenia

apetytywnego do procesu powstawania uzależnień, zidentyfikowanie określonych obszarów neuronalnych może być potencjalnie wykorzystane do leczenia za pomocą technik stymulacji mózgu.

## **5.2 Udział środkowego jądra ciała migdałowatego w obwodach neuronalnych kontrolujących reakcje apetytywne**

Przeprowadzona w ramach niniejszych badań analiza *in silico* polegająca na zidentyfikowaniu połączeń neuronalnych pomiędzy strukturami, wykazała że spośród 54 najsilniej aktywowanych uczeniem apetytywnym struktur, najwięcej połączeń neuronalnych posiada jądro środkowe ciała migdałowatego (CeA). Analiza wykazała, że CeA otrzymuje projekcje z 30 aktywowanych treningiem apetytywnym struktur. Zidentyfikowano również połączenia wychodzące z CeA do 17 spośród 54 analizowanych struktur. Ponadto, spośród analizowanych struktur zidentyfikowano 11, które charakteryzowały się tym, że zarówno wysyłają projekcje, jak również otrzymują projekcje z CeA.

Ciało migdałowate to zespół jąder wchodzących w skład układu limbicznego. Z wielu dostępnych danych wynika, że jest to niejednorodna pod względem morfologicznym, anatomicznym a także histochemicznym struktura. Co ważne, struktura ta charakteryzuje się zarówno licznymi połączeniami doprowadzającymi jak i wyprowadzającymi (Swanson i Petrovich, 1998). Liczne badania donoszą, że CeA zaangażowane jest w kontrolę zachowań emocjonalnych (Gallagher i Chiba 1996; Robbins i in., 2003). Warto wspomnieć, że dotychczasowa większość badań skupiała się przede wszystkim na udziale CeA w obwodach awersyjnych, przetwarzających reakcje związane ze stresem (Goldstein i in., 1996; LeDoux i in., 1988; Wilensky i in., 2006). Jak wiadomo, pobudzenie ciała migdałowatego zachodzi głównie dzięki projekcjom pochodzącym ze wzgórza. Informacje w tej ścieżce sygnałowej przesyłane są na dwa różne sposoby. Pierwszy z nich to droga bezpośrednia (droga dolna), która dostarcza informacje bezpośrednio ze wzgórza. Uważa się, że są to zwykle niedokładne sygnały czuciowe, informujące o nadchodzącym niebezpieczeństwie. Dzięki temu możliwe jest podjęcie natychmiastowej reakcji (wycofanie się, ucieczka) na potencjalnie awersyjny bodziec, a tym samym uniknięcie zagrożenia. Z kolei, drugi sposób to droga pośrednia, inaczej nazywana drogą górną. W tym przypadku sygnał docierający do ciała migdałowatego przechodzi ze wzgórza przez korę mózgu.

W związku z powyższym, ta ścieżka sygnałowa jest znacznie dłuższa a dotarcie sygnału do CeA wymaga zdecydowanie więcej czasu. Jednakże sygnały drogi górnej docierające do CeA są już częściowo przetworzone i poddane wstępnej analizie, co w efekcie umożliwia bardziej świadomą ocenę sytuacji i większe prawdopodobieństwo podjęcia właściwej reakcji (LeDoux i in., 1984). CeA posiada także bogate połączenia wychodzące do regionów pnia mózgu oraz podwzgórza, które także pośredniczą w określonych oznakach strachu i niepokoju. Warto wspomnieć, że regiony te odpowiedzialne są za występowanie reakcji motorycznych związanych ze stresem, m.in. reakcja zamierania (ang. *freezing*) (Knapp i Pohorecky, 1995). Ponadto, CeA posiada połączenia ze śródmózgowiem a jednymi z najsilniejszych połączeń, jakie tworzy ta część ciała migdałowatego są te z przyśrodkowym podwzgórzem, rejonem przedwzrostowym, przegrodą, opuszkami węchowymi oraz różnymi ośrodkami podstawy mózgu. Dodatkowo z piśmiennictwa wynika, że CeA może wywierać bezpośredni wpływ na podstawowe funkcje wzgórza - reguluje ciśnienie tętnicze krwi, akcję serca czy też aktywność przewodu pokarmowego (Hopkins i Holstege, 1978; Saha, 2005). Z przytoczonych danych wynika, że większość badań dotyczących CeA skupiało się na udziale tej struktury w obwodach neuronalnych odpowiedzialnych za regulację reakcji stresowych. Natomiast, udział CeA w obwodach związanych z zachowaniami apetytywnym pozostawał słabo zdefiniowany. Istnieją dowody, że CeA zaangażowane jest w odżywianie i reakcje związane z nagrodą, ale neurony i mechanizmy obwodowe, które pozytywnie regulują te zachowania, pozostają niejasne. Jednakże, poznanie tych mechanizmów jest niezwykle istotne ponieważ, te złożone zachowania są integralną częścią sprzyjającą przetrwaniu organizmu.

W ostatnim czasie można zaobserwować wzrost zainteresowania zaangażowaniem CeA w obwodach neuronalnych kontrolujących reakcje apetytywne. Na przykład, wykazano, że CeA wysyła silne projekcje hamujące do bocznej istoty czarnej (SNL), które przyczyniają się do uczenia apetytywnego u myszy (Steinberg i in., 2020). Kolejne badania wykazały udział CeA w obwodach leżących u podstaw poszukiwania i konsumpcji nagrody (Douglass i in., 2017). Przeprowadzona w ramach niniejszej pracy analiza *in silico* projekcji występujących między strukturami wykazującymi wysoki poziom ekspresji c-Fos podczas uczenia apetytywnego wskazuje na liczne połączenia CeA z różnymi strukturami opisywanymi wcześniej jako kluczowe dla układu nagrody i uczenia. Na przykład, zidentyfikowano połączenia wchodzące i wychodzące do brzuszno pole nakrywki (VTA), gałki bladej (GPi) - obszarów mózgu, których rola opisywana jest w kontekście przetwarzania i kodowania nagrody (Carta i in. 2019; Rossi i in. 2017). Ponadto, przedstawiona analiza wskazuje na połączenia CeA ze strukturami pełniącymi odmienne funkcje, np. jądro

podpęczkowe (SPA) opisywane jako biorące udział w kontroli procesów rozrodczych i odbieraniu bodźców słuchowych (Wang i in., 2006) oraz jądro okołonasadowe (PP) odpowiedzialne za pobudzenie i uwagę, karmienie, picie i zachowania seksualne (Zrinzo i in., 2007). Podsumowując, przedstawione w tej części wyniki sugerują, że interakcje CeA z innymi strukturami wykazującymi silną aktywację c-Fos podczas uczenia apetytywnego mogą potwierdzać wcześniej niedoceniany udział CeA w sieciach neuronalnych regulujących zachowania apetytywne.

### **5.3 CeA jako kluczowa struktura w uczeniu apetytywnym a nie awersyjnym**

Globalne mapowanie ekspresji c-Fos w mózgu podczas uczenia apetytywnego oraz wykonana w następnym kroku analiza *in silico* projekcji między strukturami wykazały, że strukturą, która może pełnić ważną rolę w kontroli procesów apetytywnych jest CeA. Dlatego też, w kolejnych doświadczeniach skupiono się na bardziej szczegółowym poznaniu udziału tej struktury w przetwarzaniu zdarzeń pozytywnych. Ciało migdałowe składa się z wielu połączonych ze sobą jąder, położonych głęboko w płacie skroniowym (Sah i in., 2003). W niniejszym badaniu przeprowadzono doświadczenie polegające na porównaniu profilu ekspresji białka c-Fos w ciele migdałowatym wywołanej treningiem behawioralnym o różnym zabarwieniu emocjonalnym. Analizie poddano następujące części tej struktury: jądro podstawno-boczne (BLA) oraz jądro (CeA; składające się z części bocznej (CeL) i przyśrodkowej (CeM)). Jak wiadomo, ciało migdałowe związane jest z regulowaniem wielu procesów poznawczych. Procesy te przeważnie związane są z różnego rodzaju emocjami a także uczeniem się, zapamiętywaniem, uwagą i percepcją. Większość obecnych koncepcji dotyczących funkcji CeA podkreśla jego rolę w przetwarzaniu negatywnych emocji, takich jak strach, oraz w łączeniu negatywnych emocji z innymi aspektami poznawczymi, takimi jak uczenie się i pamięć (Davis i Whalen, 2001; Gallagher i Chiba, 1996). W związku z tym, w niniejszej pracy przy użyciu immunofluorescencyjnego znakowania c-Fos, przeprowadzono profilowanie plastyczności neuronalnej w CeA i BLA po uczeniu apetytywnym i awersyjnym. W przypadku uczenia apetytywnego zastosowano taką samą procedurę jak w poprzednim doświadczeniu, polegającą na wykształceniu preferencji miejsca do rogu zawierającego butelki z 10% roztworem sacharozy. Procedura uczenia awersyjnego opracowana była na podstawie dostępnej literatury (Knapska i in., 2006). Zastosowany trening polegał na wykształceniu umiejętności unikania najczęściej



uczęszczanego rogu klatki, po zastosowaniu w tym rogu bodźca awersyjnego, czyli dmuchnięcia sprężonym powietrzem. Uzyskane w niniejszej pracy wyniki wskazują, że myszy nabyły umiejętność unikania miejsca warunkowanego negatywnie, o czym świadczył spadek udziału odpowiedzi (zarówno wizyt, jak i *nosepoke*) w miejscu warunkowanym awersyjnie w stosunku do ogólnej liczby odpowiedzi we wszystkich rogach. Poziom ekspresji c-Fos w ciele migdałowatym został wzmocniony przez zachowania motywowane zarówno awersyjnie, jak i apetytywnie, jednak wzorzec aktywacji jąder ciała migdałowatego różnił się w zależności od nacechowania bodźca warunkującego. Analiza poziomu ekspresji białka c-Fos na skrawkach mózgowych wykazała, że w przypadku CeA wzrost ekspresji białka c-Fos nastąpił jedynie podczas uczenia apetytywnego. Nie zaobserwowano zmiany poziomu c-Fos w CeA podczas uczenia awersyjnego. Z kolei, poziom ekspresji c-Fos w BLA został zwiększony tylko na skutek treningu awersyjnego. Wyniki dostępnych badań przeprowadzonych w kontekście roli BLA w uczeniu i zapamiętywaniu są zgodne z wynikami uzyskanymi w niniejszej pracy. Warte przytoczenia są badania, w których wykazano, że w trakcie warunkowania strachu, w wyniku ekspozycji zwierzęcia na neutralny bodziec słuchowy zaobserwowano wytworzenie potencjałów czynnościowych w neuronach znajdujących się w obszarze BLA (Quirk i in., 1995). Ponadto, usunięcie tej części jądra ciała migdałowatego powoduje zaburzenia w powstawaniu skojarzeń między bodźcem warunkowym a bodźcem awersyjnym (Blanchard i Blanchard, 1972; LeDoux, 2000; Quirk i in., 1995). Wiele przykładów zaangażowania BLA w przetwarzaniu emocji negatywnych wykazano stosując metody oparte na optogenetyce. Na przykład w badaniach prowadzonych na myszach zasugerowano, że stymulacja neuronów wysyłających projekcje z BLA do hipokampa wywołuje wzmocnienie reakcji lękowych. Co więcej, zahamowanie zakończeń tych neuronów znacząco zwiększyło interakcje społeczne między osobnikami (Felix-Ortiz i Tye, 2014). Uważa się, że BLA jest ważnym miejscem plastyczności neuronalnej, w którym podczas warunkowania awersyjnego przechowywane są wspomnienia dotyczące skojarzenia bodźca warunkowego z bodźcem awersyjnym (Maren i Quirk, 2014). Ciekawym odkryciem było wykazanie, że ekspozycja szczurów na bodziec słuchowy połączona ze optogenetyczną stymulacją neuronów znajdujących się w obszarze BLA skutkuje zainicjowaniem warunkowej reakcji strachu (Johansen i in., 2010). Natomiast w badaniach polegających na fotoinhibicji projekcji włókien glutaminianergicznnych wysyłanych z BLA do kory śródwęczowej wykazano, że u zwierząt tych nastąpiło zaburzenie nabywania reakcji strachu (Sparta i in., 2014; Stamatakis i in., 2015). W podobnym paradigmatcie behawioralnym polegającym na wytworzeniu umiejętności unikania miejsca,

Frenois i wsp. (2005) wykazali, że ponowna ekspozycja szczurów na środowisko sparowane z bodźcem awersyjnym powodowała zmniejszenie ekspresji c-Fos w CeA, ale zwiększenie odpowiedzi w BLA (Frenois i in., 2005). Z zaprezentowanych wyżej danych literaturowych wynika, że BLA bierze udział w przetwarzaniu zdarzeń nacechowanych negatywnie, co jest spójne z wynikami otrzymanymi w niniejszej rozprawie. Analiza aktywacji białka c-Fos wykazała, wzrost ekspresji c-Fos w CeA podczas uczenia apetytywnego. Uczenie awersyjne nie spowodowało zmiany poziomu c-Fos w tej strukturze. Z wielu dotychczasowych badań nad funkcją CeA wynikało, że struktura ta pośredniczy w przetwarzaniu reakcji na bodziec podczas warunkowania apetytywnego (Cardinal i in., 2002; Holland i Gallagher, 1993; Parkinson i in., 2000). Sugerowano również, że aktywowana jest tylko w odpowiedzi na nowe, bądź właśnie zmodyfikowane bodźce (Gallagher i Holland, 1994). Pomimo tego większość dotychczasowych badań skupia się na udziale CeA w przetwarzaniu zdarzeń o negatywnym charakterze. Badania w celu wykazania zaangażowania tej struktury w odpowiedzi na bodźce awersyjne przeprowadzono za pomocą różnorodnych paradygmatów behawioralnych i z wykorzystaniem wielu gatunków zwierząt. Przykładowo, wielokrotnie wykazywano, że usunięcie CeA upośledza motoryczną reakcję zamierania (ang. *freezing*), która jest charakterystycznym przejawem zachowań obronnych, pozwalających na przykład na ukrycie się przed drapieżnikiem (Ciochi i in., 2010; Fadok i in., 2017; Isosaka i in., 2015). Warto przytoczyć doświadczenia prowadzone przez zespół Davidson i wsp., które wskazały, że małpy z obustronnym uszkodzeniem CeA wykazywały zmniejszony poziom hormonów stresowych w osoczu (Kalin i in., 2004). Co więcej, Goosens i Maren w swoich badaniach wykazali, że usunięcie CeA powodowało zaburzenia w nabywaniu reakcji strachu. Z przeprowadzonych doświadczeń wynikało również, że u zwierząt wyciszona została wokalizacja ultradźwiękowa o częstotliwości 22KHz, która służy do komunikowania nadchodzącego zagrożenia (Goosens i Maren, 2001).

Najczęściej używanym paradygmatem behawioralnym wykorzystywanym do badania neuronalnych mechanizmów nabywania reakcji obronnych jest warunkowanie strachu zapoczątkowane przez Iwana Pawłowa. Polega ono na wytworzeniu asocjacji pomiędzy bodźcem neutralnym, np. sygnał świetlny lub dźwięk a bodźcem negatywnym, takim jak drażnienie prądem. W wyniku powstania tej asocjacji zwierzę zaczyna reagować strachem na bodziec neutralny, pomimo tego, że nie towarzyszy mu bodziec negatywny (Pawłow, 1927). W badaniach przeprowadzonych z udziałem ludzi wykazano, wzrost aktywności CeA podczas warunkowania strachu (Cheng i in., 2006; Knight i Smith, 2004). Udział CeA w odpowiedzi na warunkowanie strachu wykazano w badaniach prowadzonych z udziałem myszy przez

Namburi i wsp. (2015). W wyniku zastosowanego warunkowania awersyjnego zaobserwowano wzmożenie procesów plastyczności synaptycznej w obrębie CeA. Ponadto w badaniach tych wykazano, że zastosowanie optogenetycznej stymulacji neuronów CeA spowodowało wykształcenie umiejętności unikania miejsca (Namburi i in., 2015). Wynik uzyskany w niniejszej pracy nie jest spójny z rezultatami opublikowanymi przez innych badaczy, ponieważ z przytoczonych wyżej przykładów wynika, że rola CeA związana jest głównie z przetwarzaniem zdarzeń związanych ze strachem. Jednakże, w ostatnich latach dzięki badaniom Koo i wsp. (2004), w których zastosowano neurotoksyczne uszkodzenia włókien nerwowych, wykazano, że w procesie kształtowania warunkowanego strachu biorą udział głównie projekcje przebiegające przez CeA do dalszych struktur odpowiedzialnych za reakcje związane ze strachem, a nie samo CeA (Koo i in., 2004). Robinson i wsp. (2014) niedawno wykazali, że szczury wytrenowane do naciskania dźwigni w celu otrzymania nagrody, naciskały dźwignie częściej, gdy podawanie nagrody zostało połączone z równoczesną stymulacją CeA, co sugeruje, że CeA wzmacnia zewnętrzną wartość nagrody (Robinson i in., 2014). W tym miejscu należy również wspomnieć, że brak zaangażowania CeA w awersyjnym warunkowaniu instrumentalnym sugerowali Duncan i wsp. (1996) oraz Savonenko i wsp. (1999), którzy nie odnotowali ekspresji c-Fos w CeA podczas nabywania umiejętności unikania miejsca (Duncan i in., 1996; Savonenko i in., 1999). Wyniki uzyskiwane głównie za pomocą metod leżyjnych i elektrofizjologicznych sugerowały, że podregiony ciała migdałowego, odpowiedzialne za podstawy uczenia apetytywnego i awersyjnego, są zasadniczo takie same (Belova i in., 2007; Cardinal i in., 2002; Schoenbaum i in., 1998). Jednak, obrazowanie molekularne w rozdzielczości komórkowej sugeruje, że specyficzne części ciała migdałowego są odmiennie aktywowane, w sposób specyficzny dla zachowania (Knapska i in., 2006; Savonenko i in., 1999). W badaniach przeprowadzonych przez Knapską i wsp. (2006) zauważono, że zarówno u szczurów, jak i myszy, aktywacja CeA, mierzona poprzez zwiększony poziom ekspresji c-Fos, występuje tylko po apetytywnym warunkowaniu instrumentalnym, ale nie awersyjnym (Knapska i in., 2006). W innych badaniach wykazano również, że ekspresja c-Fos jest powiązana z plastycznością synaptyczną, uczeniem się i pamięcią, ponieważ istnieje coraz więcej dowodów na to, że neurony wyrażające c-Fos ulegają zmianom plastycznym (Condorelli i in., 1993; Guez-Barber i in., 2011; Mattson i in., 2008). Jak wiadomo, c-Fos wchodzi w skład czynnika transkrypcyjnego AP-1, który na poziomie transkrypcyjnym uczestniczy w regulacji genów kodujących białka MMP-9 (ang. *matrix metalloproteinase 9*) i TIMP-1 (ang. *tissue inhibitor of metalloproteinases 1*) również w aktywowanych neuronach (Ganguly i in., 2013; Jaworski

i in., 1999; Kuzniewska i in., 2013; Rylski i in., 2009; Szklarczyk i in., 2002). W tym miejscu należy zaznaczyć, że zarówno TIMP-1, jak i MMP-9 składają się na zewnątrzkomórkowy system enzymatyczny działający na macierz zewnątrzkomórkową i cząsteczki adhezyjne komórek. Dowiedziono, że ekspresja ww. białek powoduje zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych, a tym samym wpływając na plastyczność synaptyczną, uczenie się i pamięć (Nagy i in., 2007; Rivera i in., 2010). Co istotne, w badaniach przeprowadzonych przez Knapską i wsp. wykazano, że zahamowanie aktywności białka MMP-9 w CeA spowodowało zaburzenia apetytywnego uczenia się i pamięci, jednocześnie nie wywierając wpływu na uczenie i pamięć awersyjną (Knapska i in., 2013). Najnowsze badania pokazują, że przewlekłe leczenie fluoksetyną (lek przeciwdepresyjny) zmniejszało aktywność MMP-9 w CeA, czemu towarzyszyło poważne upośledzenie uczenia się położenia nagrody i osłabienie motywacji. Ponadto, badanie to wykazało, że zwierzęta przewlekłe leczone fluoksetyną miały wyższy odsetek niedojrzałych kolców dendrytycznych (Puścian i in., 2021). Ponadto, w ostatnim czasie przeprowadzono również badania, w których za pomocą wektorów lentiwirusowych zablokowano ekspresję genu *c-fos* w CeA. Następnie, zwierzęta zostały poddane warunkowaniu apetytywnemu oraz awersyjnemu, które polegało na wytworzeniu asocjacji pomiędzy miejscem położenia butelki a jej zawartością. W przypadku warunkowania apetytywnego zastosowano 10% roztwór sacharozy, natomiast w treningu awersyjnym roztwór chininy. Doświadczenie wykazało, że u myszy z wyciszoną ekspresją *c-fos* w CeA nastąpiło upośledzenie uczenia położenia nagrody. Co ważne, obniżenie poziomu białka c-Fos nie wpłynęło na proces uczenia awersyjnego (T. Lebitko, praca doktorska). Zrozumienie funkcji poszczególnych jąder ciała migdałowatego w procesie uczenia się stanowi duże wyzwanie. Istnieją dowody potwierdzające rolę CeA zarówno w przetwarzaniu emocji pozytywnych, jak i negatywnych, w tym w uczeniu się odpowiedzi na bodźce o pozytywnej wartości. Większość literatury na temat ciała migdałowatego obejmuje analizę roli CeA za pomocą różnych miar strachu wykorzystując techniki obejmujące uszkodzenia mechaniczne i chemiczne, stymulację elektryczną oraz miejscową infuzję różnych związków. Jednakże rezultaty opierające się na molekularnych zmianach zachodzących w tej strukturze wskazują na jej udział uczeniu apetytywnym. Ponadto, wyniki zaprezentowane w niniejszej rozprawie sugerują również, że w CeA dochodzi do zainicjowania procesów związanych z plastycznością neuronalną jedynie podczas uczenia zdarzeń nacechowanych pozytywnie, a nie podczas uczenia zdarzeń negatywnych. Wyjaśnienie specyficznej roli CeA w kontroli zdarzeń związanych z nagrodą może stanowić podstawę do lepszego zrozumienia licznych procesów, na które wpływa

nagroda, w tym uczenie się i pamięć, a także uzależnienia i mechanizmy odpowiedzialnych za motywację i działania ukierunkowanego na cel.

#### **5.4 Neurony SST+ CeA wykazują ekspresję białka c-Fos podczas uczenia apetytywnego**

CeA cieszy się rosnącym zainteresowaniem ze względu na jego rozległe funkcje w pośredniczeniu we wrodzonych, jak również wyuczonych, adaptacyjnych i nieadaptacyjnych zachowaniach. CeA jest strukturą niejednorodną, podzieloną na zróżnicowane anatomicznie części. Podział CeA na podregiony nie jest jednak jednoznaczny. W pierwotnych badaniach CeA dzielono na dwie części: część boczną (CeL) i przyśrodkową (CeM) (Brodal, 1947) i do dziś w wielu pracach badawczych, stosuje się właśnie taki podział (Cai, 2015; S. Duvarci i in., 2011; Jüngling i in., 2015; McCullough i in., 2018). Ze względu na występujące nieścisłości w wyodrębnianiu poszczególnych części CeA w niniejszej rozprawie zastosowano zaproponowany pierwotnie podział tej struktury na część boczną (CeL) i przyśrodkową (CeM). Warto zauważyć, że w piśmiennictwie wielokrotnie sugerowano, że różne części CeA wykazują różnice nie tylko na poziomie anatomicznym, ale również na poziomie funkcjonalnym (Carlsen i Heimer, 1988; Sah i in., 2003). Co ciekawe, przeprowadzone w niniejszej pracy badania pokazują, że zarówno część boczna (CeL) jak i część przyśrodkowa (CeM), wykazywały zwiększoną ekspresję c-Fos podczas uczenia apetytywnego. W badaniach prowadzonych przez Knapską i wsp. (2006) wykazano, że uczenie się położenia nagrody powoduje aktywację białka c-Fos w neuronach w obszarze CeM, a nie CeL (Knapska i in., 2006). W prawdzie, CeM uznawane jest za część wyjściową ciała migdałowatego, wysyłającą wiele projekcji do regionów istotnych dla behawioralnych i fizjologicznych reakcji na zdarzenia emocjonalnie (Hopkins i Holstege, 1978; Pape i Pare, 2010). Jednak nowsze dane pokazują, że neurony CeL wysyłają również projekcje GABAergiczne do behawioralnych i fizjologicznych regionów efektorowych (Penzo i in., 2014). W ostatnich badaniach wykazano jednak aktywację zarówno neuronów CeL jak i CeM występująca podczas głodu narkotykowego (Venniro i in., 2020). Należy zauważyć, że funkcje CeA badano przy użyciu różnych metod elektrycznej stymulacji mózgu, neurochemicznych iniekcji, czy też lezji całej struktury. Biorąc pod uwagę niejednorodność anatomiczną ciała migdałowatego, najważniejsze wnioski, dotyczące udziału poszczególnych podregionów CeA w przetwarzaniu różnorodnych informacji można wyciągnąć stosując techniki molekularnego znakowania połączone z wysokiej jakości obrazowaniem.

Dane literaturowe potwierdzają, że CeA składa się z niejednorodnej populacji z natury odrębnych neuronów (Dumont i in., 2002; Duvarci, 2014; Schiess i in., 1999). Jednak funkcjonalna organizacja tych podtypów neuronalnych występujących w CeA pozostaje słabo poznana. Szereg badań dowodzi, że modulacja zachowań w CeA jest specyficzna dla danego typu komórek, przy tym wiele badań skupia się na funkcji genetycznie odrębnych komórek (Kim i in., 2017; Tye i Janak, 2007). Prawdopodobnie, w modulowanie aktywności poszczególnych części CeA zaangażowane są znajdujące się wewnątrz nich, podobne do kolczastych neuronów prążkowiec, neurony GABA-ergiczne. Neurony te tworzą lokalne obwody hamujące, które, jak wykazano, wpływają w istotny sposób na przetwarzanie odbieranych bodźców przez CeA (Duvarci, 2014). Jednakże, w dotychczasowych badaniach udział poszczególnych typów neuronów w uczeniu zdarzeń pozytywnych pozostaje niejasny. Aby wypełnić tę lukę, w niniejszych badaniach postanowiono scharakteryzować neurony CeA, w których mogło dojść do zainicjowania procesów plastycznych wywołanych treningiem motywowanym nagrodą. W tym celu sprawdzono aktywację białka c-Fos zachodzącą podczas uczenia apetytywnego w 3 typach neuronów hamujących znajdujących się w CeA: neuronach somatostatynowych (SST+), neuronach wazoaktywnego polipeptydu jelitowego (VIP+) oraz neuronach parwalbuminowych (PV+). Ekspresję białka c-Fos indukowano poprzez poddanie myszy treningowi preferencji miejsca w klatce IntelliCage. Wykazano, że ponad połowa neuronów wykazujących ekspresję c-Fos należała do grupy neuronów SST+, a tylko nieliczne do PV+ i VIP+. Z opublikowanych w ostatnim czasie danych literaturowych wynika, że neurony CeA SST+ mogą być zaangażowane w przetwarzanie nagrody. Na przykład, aktywacja CeL SST+ została powiązana z zależną od abstynencji ekspresją głodu metamfetaminy, gdy podczas okresu odstawienia pojawiły się sygnały związane z substancją uzależniającą (Venniro i in., 2020). Rola neuronów CeA SST+ w procesach związanych z regulacją zachowania została również zasugerowana w niedawnym badaniu pokazującym, że ich hamowanie skutkuje zachowaniem podobnym do depresji w mysim modelu przewlekłego bólu (Zhou i in., 2019). Ponadto, neurony CeA SST+ wysyłają projekcje do jądra drogi samotnej i jądra parabrachalnego (Bartonjo i Lundy, 2020). Struktury te modulują reakcje wywołane smakiem i unerwiają jądro półleżące, które odpowiedzialne jest m.in. za odczuwanie przyjemności (Aylward i Totterdell, 1993). Można więc wnioskować, że pod względem anatomicznym neurony SST+ CeA są usytuowane w sposób odpowiedni by modulować reakcje związane z nagrodą. Na podstawie uzyskanych wyników oraz po przeanalizowaniu dostępnych danych literaturowych można stwierdzić, że zwiększenie poziomu ekspresji c-Fos w neuronach SST+ CeA prawdopodobnie prowadzi

do zapoczątkowania procesów plastycznych w obrębie synaps tych neuronów oraz powoduje powstanie długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (Stawarski i in., 2014). Podsumowując, uzyskane wyniki wskazują na to, że neurony SST+ zlokalizowane w CeA, mogą pełnić istotną rolę w uczeniu się zdarzeń apetytywnych.

### **5.5 CeA zawiera odrębne podtypy neuronów SST+**

Wiele dotychczasowych badań wykazało, że neurony SST+ stanowią niejednorodną grupę komórek zarówno pod względem morfologicznym, molekularnym (Gonchar & Burkhalter, 1997; Kawaguchi i Kubota, 1996), jak również elektrofizjologicznym (Cauli i in., 1997; Kawaguchi i Kubota, 1996). Różnorodność neuronów SST+ obserwowana jest nie tylko pomiędzy poszczególnymi obszarami czy strukturami w mózgu, ale również pomiędzy warstwami tej samej struktury (Xu i in., 2006). Większość przeprowadzonych badań skupia się na charakterystyce neuronów SST+ zlokalizowanych w korze mózgowej. Przykładowo, zaobserwowano znaczące różnice w parametrach elektrofizjologicznych pomiędzy neuronami SST+ zlokalizowanymi w IV warstwie kory baryłkowej a pozostałymi warstwami. W badaniach tych wykazano, że neurony SST+ warstwy IV charakteryzowały się niższym potencjałem spoczynkowym błony i niższą opornością wejścia, a także wyższą częstotliwością wywoływania potencjałów czynnościowych (Xu i in., 2013).

W związku z otrzymanymi w poprzedniej części doświadczeń wynikami, pokazującymi zwiększoną ekspresję białka c-Fos w neuronach SST+ zlokalizowanych w CeA podczas uczenia apetytywnego postanowiono przeprowadzić charakterystykę elektrofizjologiczną tej grupy neuronów w obu częściach CeA – CeL i CeM. Właściwości elektrofizjologiczne badanych neuronów scharakteryzowano za pomocą pomiarów podstawowych parametrów elektrycznych ich błony komórkowej oraz analizy wzorów generowanych przez nie potencjałów czynnościowych w odpowiedzi na podawany prąd. Parametry te zostały wyznaczone z tkanki zwierząt niepodlegających żadnej procedurze behawioralnej.

Na podstawie parametrów elektrofizjologicznych stwierdziliśmy, że populacja neuronów SST+ zlokalizowanych w obszarze CeA (zarówno w części CeL, jak i CeM) jest niejednorodna i zawiera co najmniej dwie odrębne podgrupy, które prawdopodobnie mogą odgrywać różne role w przetwarzaniu informacji przez CeA. Pierwsza grupa to neurony

o wzorze wyładowań typu accomodating spiking (AC), natomiast druga to neurony generujące potencjały czynnościowe o wzorze nazywanym delayed spiking (dLS). Wyniki te, znajdują potwierdzenie w ostatnio opublikowanych danych, w których wykazano, że neurony SST+ znajdujące się w obszarze CeL składają się z dwóch elektrofizjologicznie odrębnych podtypów (Mork i in., 2022). W piśmiennictwie brakuje jednak danych na temat właściwości neuronów SST+ w drugiej części CeA – CeM. W niniejszych badaniach wykazaliśmy, że w przypadku CeM dominującą podgrupą neuronów SST+ są komórki typu AC. Natomiast w części CeL przeważały komórki typu dLS. Co więcej wykazaliśmy, że podgrupy te różnią się między sobą parametrami opisującymi właściwości błony komórkowej. Komórki typu AC wykazywały niższy potencjał spoczynkowy i mniejszą pojemność elektryczną niż komórki typu dLS, zarówno w CeL jak i CeM. Natomiast, zarówno komórki typu AC jak i dLS charakteryzowały się podobnym poziomem oporności elektrycznej błony w obu częściach CeA. Wyniki te korespondują z licznymi badaniami donoszącymi o różnorodnej elektrofizjologicznej i molekularnej tożsamości neuronów zlokalizowanych w CeA (Dumont i in., 2002; Haubensak i in., 2010; Hunt i in., 2017; Li i Sheets, 2018; Penzo i in., 2014; Schiess i in., 1999). Wyniki uzyskane w ramach niniejszej pracy podkreślają złożoność anatomiczną i funkcjonalną CeA i sugerują, że poszczególne grupy komórek zidentyfikowane przy użyciu wykorzystanych metod elektrofizjologicznych, mogą uczestniczyć w wielu obwodach i kontrolować wiele typów zachowań. Biorąc pod uwagę różnice w wywoływanych potencjałach czynnościowych po wstrzyknięciu prądu depolaryzującego, a także niejednorodną morfologię komórek SST+ dalsze badania przeprowadzane w celu ujawnienia potencjalnej różnorodności populacji neuronów SST+ w CeA, powinny w znacznym stopniu łączyć podejścia elektrofizjologiczne, morfologiczne i molekularne.

## **5.6 Uczenie apetytywne powoduje wzrost pobudliwości neuronów SST+ w CeA**

Zależna od doświadczenia plastyczność neuronalna jest podstawowym podłożem uczenia się i powstawania śladów pamięciowych. Różne formy uczenia mogą wywoływać lokalne i globalne zmiany poprzez modulowanie wewnętrznych właściwości neuronów, w tym kanałów jonowych zależnych od napięcia, prowadząc w ten sposób do zmian w pobudliwości wewnętrznej. Pobudliwość wewnętrzna jest formą plastyczności neuronalnej, która może ulegać zmianom podczas procesu uczenia się. Ukazuje ona wzorce odpowiedzi neuronalnej



w odpowiedzi na bodźce zewnętrzne (np. uczenie się lub stymulacje synaptyczne). Wzorzec neuronalnej reakcji na bodźce można zaobserwować, mierząc liczbę potencjałów czynnościowych generowanych w odpowiedzi na wzbudzenie (Yousuf i in., 2021). W dotychczasowych badaniach wielokrotnie przedstawiano, jak różnorakie paradygmaty behawioralne modulują pobudliwość wewnętrzną neuronów. Wykazano, że zarówno warunkowanie instrumentalne (Saar i in., 1998; Zelcer i in., 2006) jak i klasyczne (Disterhoft i in., 1986; Kaczorowski i Disterhoft, 2009; Moyer i in., 2000; M. Oh & Disterhoft, 2016) może prowadzić do zmian pobudliwości neuronów. Zrozumienie pobudliwości wewnętrznej jest zatem kluczowym elementem analizy mechanizmów uczenia się i pamięci.

W licznych doniesieniach naukowych wykazano, że zmiany pobudliwości wewnętrznej, następujące w wyniku różnych form uczenia się i pamięci występują w wielu różnych strukturach mózgu. Przykładowo wykazano, że na skutek warunkowania dochodzi do modulacji wewnętrznej pobudliwości w hipokampie (Moyer i in., 1996; Oh i in., 2003; Zelcer i in., 2006), w korze gruszkowatej (Cohen-Matsliah i in., 2009; Saar i in., 1998) a także w korze infralimbicznej (Santini i in., 2008, 2012). Jednym z paradygmatów uczenia się, któremu poświęcono wiele uwagi ze względu na jego rolę w związanych z uczeniem się zmianach wewnętrznej pobudliwości, jest klasyczne warunkowanie strachu. Wykazano, że prowadzi ono do wyraźnych zmian wewnętrznej pobudliwości w regionach mózgu integralnych z obwodami odpowiedzialnymi za przetwarzanie bodźców stresowych. Na przykład wykazano, że warunkowanie strachu moduluje pobudliwość neuronów w hipokampie i korze podlimbicznej (Kaczorowski i Disterhoft, 2009; McKay i in., 2009; Santini i in., 2008; Song i in., 2012). Większość przeprowadzonych badań skupia się na wyjaśnieniu procesów związanych z warunkowaniem strachu, w związku z tym znacznie mniej wiadomo na temat modulacji pobudliwości wewnętrznej zachodzącej podczas przetwarzania emocji pozytywnych.

W badaniach przeprowadzonych w ramach niniejszej rozprawy zmierzono pobudliwość wewnętrzną neuronów SST+, zlokalizowanych w CeA następującą po treningu apetytywnym. Jak już wcześniej wspomniano, CeA składa się z odrębnych populacji hamujących neuronów GABA-ergicznymi. Od dawna uważa się, że hamowanie odgrywa kluczową rolę w pośredniczeniu w różnych, zależnych od doświadczenia modyfikacji synaptycznych w mózgu, które zachodzą aby optymalnie przetwarzać dostarczane bodźce i reagować na otaczający świat (Baroncelli i in., 2011; Feldman, 2000; Nys i in., 2015). Właściwa równowaga pobudzenia/hamowania ma kluczowe znaczenie dla prawidłowego rozwoju mózgu oraz funkcjonowania i kontrolowania plastyczności mózgowej przez całe życie (Dao i

in., 2021). Wiedza na temat tego, w jaki sposób sieć hamująca przyczynia się do plastyczności mózgu, pozostaje jednak niekompletna. Neurony SST+ wydają się odgrywać rolę w procesach związanych z formowaniem pamięci i uczeniem się, ponieważ wykazano, że ich aktywność jest modulowana w obszarach mózgu, które związane są właśnie z tymi procesami. Dotychczasowe badania wykazały specyficzny udział neuronów SST+ w plastyczności indukowanej uczeniem się w kilku obszarach korowych, takich jak kora słuchowa (Mork i in., 2022), kora somatosensoryczna (Posluszny i in., 2013) lub kora ruchowa (Chen i in., 2015). Jednakże, udział neuronów SST+ zlokalizowanych w CeA, w procesie uczenia i zapamiętywania pozostaje niejasny.

Aby określić rolę neuronów w procesach fizjologicznych lub patofizjologicznych, ważne jest ustalenie, czy reprezentują one jednorodną populację komórek (Halabisky i in., 2022). Biorąc pod uwagę zróżnicowanie typów komórek występujących w CeA, w niniejszych badaniach do analizy zmian pobudliwości wewnętrznej neuronów wybrano dominujące dla poszczególnych części CeA podgrupy neuronów SST+ (CeM – neurony SST+ typu AC, CeL – neurony SST+ typu dLS). Badania wykazały znamienne wzrost pobudliwości wewnętrznej neuronów SST+ typu dLS zlokalizowanych w CeL, wywołany treningiem apetytywnym. W przypadku części CeM również zaobserwowano, że znajdujące się tam neurony SST+ typu AC zwiększyły swoją pobudliwość na skutek uczenia apetytywnego, jednakże zmiana ta nie była tak wyraźna jak w przypadku CeL. Ponadto, w wyniku zastosowanego treningu zmianie uległy podstawowe właściwości błony komórkowej tych neuronów. Z piśmiennictwa wynika, że wewnętrzna pobudliwość jest często specyficzna dla uczenia się (tj. nie występuje u zwierząt, które się nie uczą), przejściowa (tj. trwa przez krótki okres czasu po zdarzeniu uczenia się) i może być obserwowana w określonych subpopulacjach neuronów, które prawdopodobnie odzwierciedlają ślad pamięciowy (Yousuf i in., 2021). W związku z tym można przypuszczać, że w neuronach SST+ CeA w wyniku uczenia apetytywnego zostały zainicjowane procesy związane plastycznością neuronalną.

Dotychczasowe badania wskazują na występującą korelację między zmianami pobudliwości komórek SST+ zlokalizowanych w CeA a przetwarzaniem strachu i regulacją zachowań związanych z bólem (Yu i in., 2016). Wykazano, że neurony SST+ reagują zwiększeniem swojej aktywności na bodziec związany z zagrożeniem. Z kolei, w przypadku regulacji bólu zaobserwowano, że w odpowiedzi na uporczywy ból po uszkodzeniu nerwu, pobudliwość neuronów SST+ uległa zmniejszeniu (Wilson i in., 2019). Jednakże, w przeprowadzonych niedawno badaniach z wykorzystaniem mysiego modelu bólu neuropatycznego wykazano, że uszkodzenie nerwu indukuje wzrost pobudliwości neuronów

PKC $\delta$ <sup>+</sup> (odrębna grupa neuronów CeA), ale nie wpływa na pobudliwość komórek SST<sup>+</sup> (Adke i in., 2021). Co ciekawe, w ostatnich badaniach z zastosowaniem warunkowania apetytywnego zasugerowano, że aktywność neuronów SST<sup>+</sup> CeA związana jest z kodowaniem informacji związanych ze spożywaniem pokarmu. W badaniach tych zaproponowano, że neurony SST<sup>+</sup> CeA mogą być niezbędne do powiązania kontekstu lub bodźca sensorycznego z fizycznymi właściwościami żywności (np. smakiem, konsystencją itp.) (Douglass i in., 2017). Ponadto, istnieją doniesienia, w których wykazano zmiany pobudliwości wewnętrznej neuronów SST<sup>+</sup> zlokalizowanych w korze przedlimbiczej, u myszy spożywających alkohol. W badaniach tych, zasugerowano, że neurony SST<sup>+</sup> mogą wchodzić w skład mikrobrodu związanego z poszukiwaniem nagrody i zachowaniami emocjonalnymi (Dao i in., 2021).

Biorąc pod uwagę wyniki uzyskane w ramach niniejszej rozprawy oraz przedstawione dane literaturowe można wnioskować, że w neuronach SST<sup>+</sup> zlokalizowanych w CeA dochodzi do zainicjowania procesów plastyczności neuronalnej, o czym świadczy zarówno wzrost pobudliwości wewnętrznej tych neuronów, jak i zmiana podstawowych parametrów elektrycznych ich błony komórkowej.

## 6. Podsumowanie i wnioski

1. Uczenie apetytywne wywołuje globalny wzrost plastyczności synaptycznej w całym mózgu oraz przebudowę architektoniczną sieci funkcjonalnych o czym świadczy wzrost ekspresji białka c-Fos w wielu, często znacznie od siebie oddalonych strukturach mózgowych.
2. Jądro środkowe ciała migdałowatego (CeA) może pełnić istotną rolę w przetwarzaniu zdarzeń apetytywnych poprzez liczne połączenia neuronalne z innymi aktywowanymi uczeniem apetytywnym strukturami.
3. Populacją neuronów CeA potencjalnie zaangażowanych w uczenie apetytywne są neurony SST+, które w wyniku treningu wykazują zwiększoną ekspresję c-Fos. Ponadto, wykazano że pod wpływem uczenia się zdarzeń pozytywnych zwiększa się pobudliwość neuronów SST+ zlokalizowanych w CeA.

## 7. Spis rycin

Rycina 1. Schemat przedstawiający wewnętrzne szlaki komórkowe prowadzące do ekspresji c-fos oraz indukcji czynnika transkrypcyjnego AP-1 .....	16
Rycina 2. Podział metod oczyszczania optycznego tkanek .....	22
Rycina 3. Schemat budowy mikroskopu opartego na arkuszu światła LSM.....	23
Rycina 4. Klatka IntelliCage.. .....	27
Rycina 5. Schemat treningu preferencji miejsca przeprowadzonego w klatce IntelliCage.. ...	29
Rycina 6. Schemat treningu unikania miejsca przeprowadzonego w klatce IntelliCage.....	31
Rycina 7. Schemat treningu apetytywnego przeprowadzonego w klatce domowej z wykorzystaniem myszy SST-Ai14.....	32
Rycina 8. Półkule mózgowe oczyszczone metodą iDISCO+. .....	37
Rycina 9. Mikroskop LSM zaprojektowany i skonstruowany przez dr Monikę Pawłowską w Pracowni Neurobiologii Instytutu Nenckiego.....	38
Rycina 10. Etapy obróbki obrazów w celu uzyskania trójwymiarowych map aktywacji c-Fos w mózgu .....	40
Rycina 11. Schemat doświadczenia elektrofizjologicznego.. .....	42
Rycina 12. Schemat klatki IntelliCage podczas treningu apetytywnego .....	44
Rycina 13. Uczenie apetytywne w klatce IntelliCage.....	46
Rycina 14. Schemat doświadczenia mapowania ekspresji c-Fos w mózgu po treningu apetytywnym. ....	48
Rycina 15. Efekt segmentacji obrazu i rekonstrukcja mózgu 3D .....	49
Rycina 16. Tworzenie mapy aktywności mózgu wywołanej treningiem apetytywnym.....	50
Rycina 17. Liczba komórek c-Fos w mózgach zwierząt po treningu apetytywnym.....	51
Rycina 18. Struktury wykazujące największe zmiany w poziomie ekspresji c-Fos po treningu apetytywnym. ....	52
Rycina 19. Podział struktur wykazujących wzrost ekspresji c-Fos po treningu apetytywnym w różnych regionach mózgu .....	57
Rycina 20. Połączenia neuronalne CeA z innymi strukturami wykazującymi ekspresję białka c-Fos na skutek uczenia apetytywnego. ....	58
Rycina 21. Projekcje neuronalne wysyłane do CeA .....	60
Rycina 22. Schemat treningu awersyjnego w klatce IntelliCage.. .....	62
Rycina 23. Uczenie awersyjne w klatce IntelliCage.....	64
Rycina 24. Schemat przygotowania skrawków mózgowych obejmujących obszar CeA.....	65

Rycina 25. Udział jąder ciała migdałowatego w uczeniu apetytywnym i awersyjnym.....	67
Rycina 26. Udział CeL i CeM jądra środkowego ciała migdałowatego w uczeniu apetytywnym. . . . .	69
Rycina 27. Neurony hamujące (VIP, PV, SST) w poszczególnych częściach jądra środkowego ciała migdałowatego oraz ekspresja c-Fos wywołana warunkowaniem apetytywnym ...	71
Rycina 28. Identyfikacja neuronów zaangażowanych w proces uczenia apetytywnego w środkowym jądrze ciała migdałowatego.. . . . .	73
Rycina 29. Elektrofizjologiczna charakterystyka komórek somatostatynowych w CeA.. . . .	76
Rycina 30. Wpływ uczenia apetytywnego na pobudliwość własną i parametry błony neuronów somatostatynowych w CeA. . . . .	78
Rycina 31. Wpływ uczenia apetytywnego na parametry błony neuronów somatostatynowych typu dLS w CeL. . . . .	80
Rycina 32. Wpływ uczenia apetytywnego na pobudliwość własną neuronów somatostatynowych typu dLS w CeL.....	81
Rycina 33. Wpływ uczenia apetytywnego na parametry błony neuronów SST+ typu AC w CeM.....	82
Rycina 34. Wpływ uczenia apetytywnego na pobudliwość własną neuronów somatostatynowych typu AC w CeM.....	83

## 8. Spis Piśmiennictwa

1. Adke, A. P., Khan, A., Ahn, H. S., Becker, J. J., Wilson, T. D., Valdivia, S., Sugimura, Y. K., Gonzalez, S. M., Carrasquillo, Y. (2021). Cell-type specificity of neuronal excitability and morphology in the central Amygdala. *eNeuro*, 8(1), 1–28.
2. Albert-Smet, I., Marcos-Vidal, A., Vaquero, J. J., Desco, M., Muñoz-Barrutia, A., Ripoll, J. (2019). Applications of light-sheet microscopy in microdevices. *Frontiers in Neuroanatomy*, 13(1), 1–15.
3. Andreatta, M., Pauli, P. (2015). Appetitive vs. Aversive conditioning in humans. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 9(5), 1–8.
4. Antinucci, P., Folgueira, M., Bianco, I. H. (2019). Pretectal neurons control hunting behaviour. *eLife*, 8, 1–34.
5. Authement, M. E., Langlois, L. D., Kassis, H., Gouty, S., Dacher, M., Shepard, R. D., Cox, B. M., Nugent, F. S. (2016). Morphine-induced synaptic plasticity in the VTA is reversed by HDAC inhibition. *Journal of Neurophysiology*, 116, 1093–1103.
6. Aylward, R. L. M., Totterdell, S. (1993). Neurons in the ventral subiculum, amygdala and entorhinal cortex which project to the nucleus accumbens: Their input from somatostatin-immunoreactive boutons. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 6(1), 31–42.
7. Bading, H., Segal, M. M., Sucher, N. J., Dudek, H., Lipton, S. A., Greenberg, M. E. (1995). N-methyl-d-aspartate receptors are critical for mediating the effects of glutamate on intracellular calcium concentration and immediate early gene expression in cultured hippocampal neurons. *Neuroscience*, 64(3), 653–664.
8. Bailey, R., Hillman, C., Arent, S., Petitpas, A. (2013). Physical activity: An underestimated investment in human capital? *Journal of Physical Activity and Health*, 10(3), 289–308.
9. Bakin, A. V., & Curran, T. (1999). Role of DNA 5-methylcytosine transferase in cell transformation by fos. *Science*, 283(5400), 387–390.
10. Balfour, M. E., Brown, J. L., Yu, L., Coolen, L. M. (2006). Potential contributions of efferents from medial prefrontal cortex to neural activation following sexual behavior in the male rat. *Neuroscience*, 137, 1259–1276.
11. Bali, P., Kenny, P. J. (2019). Transcriptional mechanisms of drug addiction. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 21(4), 379–387.
12. Barberini, C. L., Morrison, S. E., Saez, A., Lau, B., Salzman, C. D. (2012).

- Complexity and competition in appetitive and aversive neural circuits. *Frontiers in Neuroscience*, 6(11), 1–13.
13. Barlind, A., Karlsson, N., Isgaard, T. B. J. (2010). Decreased cytogenesis in the granule cell layer of the hippocampus and impaired place learning after irradiation of the young mouse brain evaluated using the IntelliCage platform. *Experimental Brain Research*, 201 781–787.
  14. Baroncelli, L., Braschi, C., Spolidoro, M., Begenisic, T., Maffei, L., Sale, A. (2011). Brain plasticity and disease: A matter of inhibition. *Neural Plasticity*, 2011.
  15. Bartonjo, J. J., Lundy, R. F. (2020). Distinct Populations of Amygdala Somatostatin-Expressing Neurons Project to the Nucleus of the Solitary Tract and Parabrachial Nucleus. *Chemical Senses*, 45(8), 687–698.
  16. Baudonnat, M., Guillou, J. L., Husson, M., Vandesquille, M., Corio, M., Decorte, L., Faugère, A., Porte, Y., Mons, N., David, V. (2011). Disrupting effect of drug-induced reward on spatial but not cue-guided learning: Implication of the striatal protein kinase A/cAMP response element-binding protein pathway. *Journal of Neuroscience*, 31(46), 16517–16528.
  17. Belova, M. A., Paton, J. J., Morrison, S. E., & Salzman, C. D. (2007). Expectation Modulates Neural Responses to Pleasant and Aversive Stimuli in Primate Amygdala. *Neuron*, 55(6), 970–984.
  18. Bito, H. (2014). A new era for functional labeling of neurons : activity-dependent promoters have come of age. *Frontiers in Neural Circuits*, 8(4), 1–9.
  19. Blanchard, D. C., Blanchard, R. J. (1972). Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 81(2), 281–290.
  20. Blumenfeld, H. (2007). Functional MRI studies of animal models in epilepsy. *Epilepsia*, 48(4), 18–26.
  21. Bonapersona, V., Schuler, H., Damsteegt, R., Adolfs, Y., Pasterkamp, R. J., van den Heuvel, M. P., Joëls, M., Sarabdjitsingh, R. A. (2022). The mouse brain after foot shock in four dimensions: Temporal dynamics at a single-cell resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(8), 1–9.
  22. Bouarab, C., Thompson, B., Polter, A. M. (2019). VTA GABA Neurons at the Interface of Stress and Reward. *Frontiers in Neural Circuits*, 13(12), 1–12.
  23. Bradie, M. (1986). Assessing evolutionary epistemology. *Biology and Philosophy*, 1(4), 401–459.



24. Brodal, A. (1947). The amygdaloid nucleus in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 87(1), 1–16.
25. Brydges, N. M., Whalley, H. C., Jansen, M. A., Merrifield, G. D., Wood, E. R., Lawrie, S. M., Wynne, S. M., Day, M., Fleetwood-Walker, S., Steele, D., Marshall, I., Hall, J., Holmes, M. C. (2013). Imaging Conditioned Fear Circuitry Using Awake Rodent fMRI. *PLoS ONE*, 8(1).
26. Bullitt, E. (1990). Expression of C-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 296(4), 517–530.
27. Cai H., Haubensak W., Anthony T., Anderson D.J. (2015). Central amygdala PKC- $\delta$ + neurons mediate the influence of multiple anorexigenic signals. *Nat Neurosci.*, 17(9), 1240–1248.
28. Canazza, A., Minati, L., Boffano, C., Parati, E., Binks, S. (2014). Experimental models of brain ischemia: A review of techniques, magnetic resonance imaging, and investigational cell-based therapies. *Frontiers in Neurology*, 5(2), 1–15.
29. Cardinal, R. N., Parkinson, J. A., Hall, J., Everitt, B. J. (2002). Emotion and motivation: The role of the amygdala, ventral striatum, and prefrontal cortex. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 26(3), 321–352.
30. Carlsen, J., Heimer, L. (1988). The basolateral amygdaloid complex as a cortical-like structure. *Brain Research*, 441(1–2), 377–380.
31. Carretta, D., Hervé-Minvielle, A., Bajo, V. M., Villa, A. E. P., Rouiller, E. M. (1999). c-Fos expression in the auditory pathways related to the significance of acoustic signals in rats performing a sensory-motor task. *Brain Research*, 841(1–2), 170–183.
32. Carta, I., Chen, C. H., Schott, A. L., Dorizan, S., Khodakhah, K. (2019). Cerebellar modulation of the reward circuitry and social behavior. *Science*, 363(6424).
33. Cassell, M. D., Gray, T. S., Kiss, J. Z. (1986). Neuronal architecture in the rat central nucleus of the amygdala: A cytological, hodological, and immunocytochemical study. *Journal of Comparative Neurology*, 246(4), 478–499.
34. Cathomas, F., Fuertig, R., Sigrist, H., Newman, G. N., Bizzozzero, M., Mueller, A., Luippold, A., Ceci, A., Hengerer, B., Seifritz, E., Fontana, A., Pryce, C. R. (2015). CD40-TNF activation in mice induces extended sickness behavior syndrome coincident with but not dependent on activation of the kynurenine pathway. *Brain, Behavior, and Immunity*, 50(11), 125–140.
35. Cauli, B., Audinat, E., Lambolez, B., Angulo, M. C., Ropert, N., Tsuzuki, K., Hestrin,

- S., Rossier, J. (1997). Molecular and physiological diversity of cortical nonpyramidal cells. *Journal of Neuroscience*, *17*(10), 3894–3906.
36. Cavanaugh, J., Wurtz, R. H. (2004). Subcortical modulation of attention counters change blindness. *Journal of Neuroscience*, *24*(50), 11236–11243.
  37. Chan, K. C., Xing, K. K., Cheung, M. M., Zhou, I. Y., Wu, E. X. (2010). Functional MRI of postnatal visual development in normal and hypoxic-ischemic-injured superior colliculi. *NeuroImage*, *49*(3), 2013–2020.
  38. Chaudhuri, A., Zangenehpour, S., Rahbar-Dehgan, F., Ye, F. (2000). Molecular maps of neural activity and quiescence. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, *60*(3), 403–410.
  39. Chen, S. X., Kim, A. N., Peters, A. J., Komiyama, T. (2015). Subtype-specific plasticity of inhibitory circuits in motor cortex during motor learning. *Nature Neuroscience*, *18*(8), 1109–1117.
  40. Cheng, D. T., Knight, D. C., Smith, C. N., Helmstetter, F. J. (2006). Human amygdala activity during the expression of fear responses. *Behavioral Neuroscience*, *120*(6), 1187–1195.
  41. Cheung, M. M., Lau, C., Zhou, I. Y., Chan, K. C., Cheng, J. S., Zhang, J. W., Ho, L. C., Wu, E. X. (2012). BOLD fMRI investigation of the rat auditory pathway and tonotopic organization. *NeuroImage*, *60*(2), 1205–1211.
  42. Ciocchi, S., Herry, C., Grenier, F., Wolff, S. B. E., Letzkus, J. J., Vlachos, I., Ehrlich, I., Sprengel, R., Deisseroth, K., Stadler, M. B., Müller, C., Lüthi, A. (2010). Encoding of conditioned fear in central amygdala inhibitory circuits. *Nature*, *468*(7321), 277–282.
  43. Codita, A., Gumucio, A., Lannfelt, L., Gellerfors, P., Winblad, B., Mohammed, A. H., Nilsson, L. N. G. (2010). Impaired behavior of female tg-ArcSwe APP mice in the IntelliCage: A longitudinal study. *Behavioural Brain Research*, *215*(1), 83–94.
  44. Cohen-Matsliah, S. I., Rosenblum, K., Barkai, E. (2009). Olfactory-learning abilities are correlated with the rate by which intrinsic neuronal excitability is modulated in the piriform cortex. *European Journal of Neuroscience*, *30*(8), 1339–1348.
  45. Condorelli, D. F., Dell’Albani, P., Amico, C., Kaczmarek, L., Nicoletti, F., Lukasiuk, K., Stella, A. M. G. (1993). Induction of Primary Response Genes by Excitatory Amino Acid Receptor Agonists in Primary Astroglial Cultures. *Journal of Neurochemistry*, *60*(3), 877–885.
  46. Curran, T., Franza, B. R. (1988). Fos and jun: The AP-1 connection. *Cell*, *55*(3), 395–

397.

47. Curran, T., Morgan, J. I. (1987). Memories of fos. *BioEssays*, 7(6), 255–258.
48. Curran, T., Teich, N. M. (1982). Identification of a 39,000-dalton protein in cells transformed by the FBJ murine osteosarcoma virus. *Virology*, 116(1), 221–235.
49. Dao, N. C., Brockway, D. F., Suresh Nair, M., Sicher, A. R., Crowley, N. A. (2021). Somatostatin neurons control an alcohol binge drinking prelimbic microcircuit in mice. *Neuropsychopharmacology*, 46(11), 1906–1917.
50. Davis, M., Whalen, P. J. (2001). The amygdala: Vigilance and emotion. *Molecular Psychiatry*, 6(1), 13–34.
51. De Hoz, L., Gierej, D., Lioudyno, V., Jaworski, J., Blazejczyk, M., Cruces-Solís, H., Beroun, A., Lebitko, T., Nikolaev, T., Knapska, E., Nelken, I., Kaczmarek, L. (2018). Blocking c-Fos Expression Reveals the Role of Auditory Cortex Plasticity in Sound Frequency Discrimination Learning. *Cerebral Cortex*, 28(5), 1645–1655.
52. Deng, W., Mayford, M., Gage, F. H. (2013). Selection of distinct populations of dentate granule cells in response to inputs as a mechanism for pattern separation in mice. *eLife*, 2013(2), 1–21.
53. Disterhoft, J. F., Coulter, D. A., Alkon, D. L. (1986). Conditioning-specific membrane changes of rabbit hippocampal neurons measured in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(8), 2733–2737.
54. Douglass, A. M., Kucukdereli, H., Ponserre, M., Markovic, M., Gründemann, J., Strobel, C., Alcalá Morales, P. L., Conzelmann, K. K., Lüthi, A., Klein, R. (2017). Central amygdala circuits modulate food consumption through a positive-valence mechanism. *Nature Neuroscience*, 20(10), 1384–1394.
55. Dragunow, M., & Robertson, H. A. (1987). Kindling stimulation induces c-fos protein(s) in granule cells of the rat dentate gyrus. *Nature*, 329(6138), 441–442.
56. Dragunow M., Robertson H.A. (1987). Generalized seizures induce c-fos protein ( s ) in mammalian neurons. *Neuroscience Letters*, 82(2), 157–161.
57. Du Plessis, K. C., Basu, S., Rumbell, T. H., Lucas, E. K. (2022). Sex-Specific Neural Networks of Cued Threat Conditioning: A Pilot Study. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 16, 1-11.
58. Dumont, É. C., Martina, M., Samson, R. D., Drolet, G., Paré, D. (2002). Physiological properties of central amygdala neurons: Species differences. *European Journal of Neuroscience*, 15(3), 545–552.
59. Duncan, G. E., Knapp, D. J., Breese, G. R. (1996). Neuroanatomical characterization

- of Fos induction in rat behavioral models of anxiety. *Brain Research*, 713(1–2), 79–91.
60. Duvarci, S. P. D. (2014). Amygdala microcircuits controlling learned fear. *Bone*, 23(1), 1–7.
  61. Duvarci, S., Popa, D., Paré, D. (2011). Central amygdala activity during fear conditioning. *Journal of Neuroscience*, 31(1), 289–294.
  62. Engelbrecht C.J., and Stelzer E.H., (2006). Resolution enhancement in a light-sheet-based microscope (SPIM)," *Optic Letters*, 31, 1477-1479.
  63. Escande, P., Weiss, P., Zhang, W. (2017). A Variational Model for Multiplicative Structured Noise Removal. *Journal of Mathematical Imaging and Vision*, 57(1), 43–55.
  64. Eshel, N., & Roiser, J. P. (2010). Reward and punishment processing in depression. *Biological Psychiatry*, 68(2), 118–124.
  65. Everitt B.J., Cardinal R.N., Parkinson J.A., Robbins, T.W., (2003). Impact of Amygdala-Dependent Mechanisms of Emotional Learning. *New York Academy of Science*, 985,233-250.
  66. Fadok, J. P., Krabbe, S., Markovic, M., Courtin, J., Xu, C., Massi, L., Botta, P., Bylund, K., Müller, C., Kovacevic, A., Tovote, P., Lüthi, A. (2017). A competitive inhibitory circuit for selection of active and passive fear responses. *Nature*, 542(7639)
  67. Feldman, D. E. (2000). Inhibition and plasticity. *Nature Neuroscience*, 3(4), 303–304.
  68. Felix-Ortiz, A. C., Tye, K. M. (2014). Amygdala inputs to the ventral hippocampus bidirectionally modulate social behavior. *Journal of Neuroscience*, 34(2), 586–595.
  69. Flavell, S. W., Greenberg, M. E. (2008). Signaling mechanisms linking neuronal activity to gene expression and plasticity of the nervous system. *Annual Review of Neuroscience*, 31, 563–590.
  70. Franklin, K.B.J., Paxinos, G. (2008). *The Mouse brain: in stereotaxic coordinates* (San Diego: Academic Press).
  71. Frenois, F., Stinus, L., Di Blasi, F., Cador, M., Le Moine, C. (2005). A specific limbic circuit underlies opiate withdrawal memories. *Journal of Neuroscience*, 25(6), 1366–1374.
  72. Frost, W. N., Clark, G. A., Kandel, E. R. (1988). Parallel processing of short-term memory for sensitization in *Aplysia*. *Journal of Neurobiology*, 19(4), 297–334.
  73. Gallagher, M., Chiba, A. A. (1996). The amygdala and emotion. *Current Opinion in*

*Neurobiology*, 6(2), 221–227.

74. Gallagher, M., Holland, P. C. (1994). The amygdala complex: Multiple roles in associative learning and attention. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(25), 11771–11776.
75. Gallo, F. T., Katche, C., Morici, J. F., Medina, J. H., Weisstaub, N. V. (2018). Immediate early genes, memory and psychiatric disorders: Focus on c-Fos, Egr1 and Arc. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 12(4), 1–16.
76. Ganguly, K., Rejmak, E., Mikosz, M., Nikolaev, E., Knapska, E., Kaczmarek, L. (2013). Matrix metalloproteinase (MMP) 9 transcription in mouse brain induced by fear learning. *Journal of Biological Chemistry*, 288(29), 20978–20991.
77. Geier, K. T., Buchsbaum, B. R., Parimoo, S., Olsen, R. K. (2020). The role of anterodorsal thalamus in associative memory encoding and retrieval. *Neuropsychologia*, 148(9), 107623.
78. Goldstein, L. E., Rasmusson, A. M., Bunney, B. S., Roth, R. H. (1996). Role of the amygdala in the coordination of behavioral, neuroendocrine, and prefrontal cortical monoamine responses to psychological stress in the rat. *Journal of Neuroscience*, 16(15), 4787–4798.
79. Gonchar, Y., Burkhalter, A. (1997). Three distinct families of GABAergic neurons in rat visual cortex. *Cerebral Cortex*, 7(4), 347–358.
80. Goosens, K. A., Maren, S. (2001). Contextual and auditory fear conditioning are mediated by the lateral, basal, and central amygdaloid nuclei in rats. *Learning and Memory*, 8(3), 148–155.
81. Gore, F., Schwartz, E. C., Daniel Salzman, C. (2015). Manipulating neural activity in physiologically classified neurons: Triumphs and challenges. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1677).
82. Grimm, R., Tischmeyer, W. (1997). Complex patterns of immediate early gene induction in rat brain following brightness discrimination training and pseudotraining. *Behavioural Brain Research*, 84(1–2), 109–116.
83. Guez-Barber, D., Fanous, S., Golden, S. A., Schrama, R., Koya, E., Stern, A. L., Bossert, J. M., Harvey, B. K., Picciotto, M. R., Hope, B. T. (2011). FACS identifies unique cocaine-induced gene regulation in selectively activated adult striatal neurons. *Journal of Neuroscience*, 31(11), 4251–4259.
84. Halabisky, B., Shen, F., Huguenard, J. R., Prince, D. A., (2006). Electrophysiological Classification of Somatostatin-Positive Interneurons in Mouse Sensorimotor Cortex.

*Journal of Neurophysiology*, 96(2), 834–845.

85. Hamson, D. K., Watson, N. V. (2004). Regional brainstem expression of Fos associated with sexual behavior in male rats. *Brain Research*, 1006(2), 233–240.
86. Hansen, H. H., Perens, J., Roostalu, U., Skytte, J. L., Salinas, C. G., Barkholt, P., Thorbek, D. D., Rigbolt, K. T. G., Vrang, N., Jelsing, J., Hecksher-Sørensen, J. (2021). Whole-brain activation signatures of weight-lowering drugs. *Molecular Metabolism*, 47(1), 101171.
87. Haubensak, W., Kunwar, P. S., Cai, H., Cioocchi, S., Wall, N. R., Ponnusamy, R., Biag, J., Dong, H. W., Deisseroth, K., Callaway, E. M., Fanselow, M. S., Lüthi, A., Anderson, D. J. (2010). Genetic dissection of an amygdala microcircuit that gates conditioned fear. *Nature*, 468(7321), 270–276.
88. Hebb D.O. (1949) The organization of behavior, a neuropsychological theory. New York: Wiley.
89. Helmchen, F., Denk, W. (2005). Deep tissue two-photon microscopy. *Nature Methods*, 2(12), 932–940.
90. Helmstetter, F. J., Parsons, R. G., Gafford, G. M. (2008). Macromolecular synthesis, distributed synaptic plasticity, and fear conditioning. *Neurobiology of Learning and Memory*, 89(3), 324–337.
91. Herman, J. P., Katz, L. N., & Krauzlis, R. J. (2018). Midbrain activity can explain perceptual decisions during an attention task. *Nature Neuroscience*, 21(12), 1651–1655.
92. Herrera, D. G., & Robertson, H. A. (1996). Activation of c-fos in the brain. *Progress in Neurobiology*, 50(2–3), 83–107.
93. Hess, U. S., Lynch, G., Gall, C. M. (1995). Regional patterns of c-fos mRNA expression in rat hippocampus following exploration of a novel environment versus performance of a well-learned discrimination. *Journal of Neuroscience*, 15(12), 7796–7809.
94. Holland, P. C., Gallagher, M. (1993). Amygdala Central Nucleus Lesions Disrupt Increments, But Not Decrements, in Conditioned Stimulus Processing. *Behavioral Neuroscience*, 107(2), 246–253.
95. Hopkins, D. A., Holstege, G. (1978). Amygdaloid projections to the mesencephalon, pons and medulla oblongata in the cat. *Experimental Brain Research*, 32(4), 529–547.
96. Hörl, D., Rojas Rusak, F., Preusser, F., Tillberg, P., Randel, N., Chhetri, R. K., Cardona, A., Keller, P. J., Harz, H., Leonhardt, H., Treier, M., Preibisch, S. (2019).

- BigStitcher: reconstructing high-resolution image datasets of cleared and expanded samples. *Nature Methods*, 16(9), 870–874.
97. Hu, E., Mueller, E., Oliviero, S., Papaioannou, V. P., Johnson, R., Spiegelman, B. M. (1994). Targeted disruption of the c-fos gene demonstrates c-fos-dependent and -independent pathways for gene expression stimulated by growth factors or oncogenes. *EMBO Journal*, 13(13), 3094–3103.
  98. Huisken, J., Swoger, J., Del Bene, F., Wittbrodt, J., Stelzer, E. H. K. (2004). Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy. *Science*, 305(5686), 1007–1009.
  99. Hunt, S. P., Pini, A., Evan, G. (1988). Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature*, 328(6131), 632–634.
  100. Hunt, S., Sun, Y., Kucukdereli, H., Klein, R., Sah, P. (2017). Intrinsic circuits in the lateral central amygdala. *eNeuro*, 4(1), 1–18.
  101. Iman, I. N., Yusof, N. A. M., Talib, U. N., Ahmad, N. A. Z., Norazit, A., Kumar, J., Mehat, M. Z., Jayabalan, N., Muthuraju, S., Stefaniuk, M., Kaczmarek, L., Muzaimi, M. (2021). The IntelliCage System: A Review of Its Utility as a Novel Behavioral Platform for a Rodent Model of Substance Use Disorder. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 15(6), 1–13.
  102. Isosaka, T., Matsuo, T., Yamaguchi, T., Funabiki, K., Nakanishi, S., Kobayakawa, R., Kobayakawa, K. (2015). Htr2a-Expressing Cells in the Central Amygdala Control the Hierarchy between Innate and Learned Fear. *Cell*, 163(5), 1153–1164.
  103. Jaworski, J., Biedermann, I. W., Lapinska, J., Szklarczyk, A., Figiel, I., Konopka, D., Nowicka, D., Filipkowski, R. K., Hetman, M., Kowalczyk, A., Kaczmarek, L. (1999). Neuronal excitation-driven and AP-1-dependent activation of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 gene expression in rodent hippocampus. *Journal of Biological Chemistry*, 274(40), 28106–28112.
  104. Jaworski, J., Kalita, K., Knapska, E. (2018). C-Fos and neuronal plasticity: The aftermath of kaczmarek's theory. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 78(4), 287–296.
  105. Johansen, J. P., Tarpley, J. W., Ledoux, J. E., Blair, H. T. (2010). Neural substrates for expectation-modulated fear learning in the amygdala and periaqueductal gray. *Nature Neuroscience*, 13(8), 979–986.
  106. Josselyn, S. A., Köhler, S., Frankland, P. W. (2017). Heroes of the engram. *Journal of Neuroscience*, 37(18), 4647–4657.

107. Jüngling, K., Lange, M. D., Szkudlarek, H. J., Lesting, J., Erdmann, F. S., Doengi, M., Kügler, S., Pape, H. C. (2015). Increased GABAergic efficacy of central amygdala projections to neuropeptide s neurons in the brainstem during fear memory retrieval. *Neuropsychopharmacology*, *40*(12), 2753–2763.
108. Kaczmarek, L. (1993). Molecular biology of vertebrate learning: Is c-fos a new beginning? *Journal of Neuroscience Research*, *34*(4), 377–381.
109. Kaczmarek, L. (2018). From c-Fos to MMP-9: In control of synaptic plasticity to produce healthy and diseased mind, a personal view. *Postepy biochemii*, *64*(2), 101–109.
110. Kaczmarek, L., Chaudhuri, A. (1997). Sensory regulation of immediate-early gene expression in mammalian visual cortex: Implications for functional mapping and neural plasticity. *Brain Research Reviews*, *23*(3), 237–256.
111. Kaczmarek, L., Kamińska, B. (1989). Molecular biology of cell activation. *Experimental Cell Research*, *183*(1), 24–35.
112. Kaczmarek, L., Siedlecki, J. A., Danysz, W. (1988). Proto-oncogene c-fos induction in rat hippocampus. *Molecular Brain Research*, *3*(2), 183–186.
113. Kaczorowski, C. C., Disterhoft, J. F. (2009). Memory deficits are associated with impaired ability to modulate neuronal excitability in middle-aged mice. *Learning and Memory*, *16*(6), 362–366.
114. Kalin, N. H., Shelton, S. E., Davidson, R. J. (2004). The role of the central nucleus of the amygdala in mediating fear and anxiety in the primate. *Journal of Neuroscience*, *24*(24), 5506–5515.
115. Kaliszewska, A., Bijata, M., Kaczmarek, L., Kossut, M. (2012). Experience-dependent plasticity of the barrel cortex in mice observed with 2-DG brain mapping and c-Fos: Effects of MMP-9 KO. *Cerebral Cortex*, *22*(9), 2160–2170.
116. Kawaguchi, Y., Kubota, Y. (1996). Yasuo Kawaguchi and Yoshiyuki Kubota. *The Journal of Neuroscience*, *76*(8), 2701–2715.
117. Keller, P. J., Ahrens, M. B. (2015). Visualizing whole-brain activity and development at the single-cell level using light-sheet microscopy. *Neuron*, *85*(3), 462–483.
118. Kim, D. H., Choi, B. R., Jeon, Y. J., Jang, Y. S., Han, J. S. (2021). Engagement of lateral habenula in the extinction of the appetitive conditioned responses. *Behavioural Brain Research*, *415*, 113516.
119. Kim, J., Zhang, X., Muralidhar, S., LeBlanc, S. A., Tonegawa, S. (2017). Basolateral to Central Amygdala Neural Circuits for Appetitive Behaviors. *Neuron*, *93*(6), 1464–



120. Kimbrough, A., Kallupi, M., Smith, L. C., Simpson, S., Collazo, A., George, O. (2021). Characterization of the brain functional architecture of psychostimulant withdrawal using single-cell whole-brain imaging. *eNeuro*, 8(6).
121. Kiryk, A., Aida, T., Tanaka, K., Banerjee, P., Wilczyński G.M., Meyza K., Knapska E., Filipkowski R.K., Kaczmarek L., Danysz W. (2008). Behavioral Characterization of GLT1 (+/-) Mice as a Model of Mild Glutamatergic Hyperfunction. *Neurotoxicity Research*, 13(1), 19–30.
122. Kiryk, A., Janusz, A., Zglinicki, B., Turkes, E., Knapska, E., Konopka, W., Lipp, H. P., Kaczmarek, L. (2020). IntelliCage as a tool for measuring mouse behavior – 20 years perspective. W *Behavioural Brain Research* (T. 388). Elsevier B.V.
123. Kiryk, A., Mochol, G., Filipkowski, R. K., Wawrzyniak, M., Liudyno, V., Knapska, E., Gorkiewicz, T., Balcerzyk, M., Leski, S., Leuven, F. Van, Lipp, H., Wojcik, D. K., Kaczmarek, L. (2011). Cognitive Abilities of Alzheimer ' s Disease Transgenic Mice are Modulated by Social Context and Circadian Rhythm. *Current Alzheimer Research*, 8(8),883–892.
124. Knapp, D. J., Pohorecky, L. A. (1995). An air-puff stimulus method for elicitation of ultrasonic vocalizations in rats. *Journal of Neuroscience Methods*, 62(1–2), 1–5.
125. Knapska, E., Liudyno, V., Kiryk, A., Mikosz, M., Górkiewicz, T., Michaluk, P., Gawlak, M., Chaturvedi, M., Mochol, G., Balcerzyk, M., Wojcik, D. K., Wilczynski, G. M., Kaczmarek, L. (2013). Reward learning requires activity of matrix metalloproteinase-9 in the central amygdala. *Journal of Neuroscience*, 33(36), 14591–14600.
126. Knapska, E., Walasek, G., Nikolaev, E., Neuhäusser-Wespy, F., Lipp, H. P., Kaczmarek, L., Werka, T. (2006). Differential involvement of the central amygdala in appetitive versus aversive learning. *Learning and Memory*, 13(2), 192–200.
127. Knight, D. C., Smith, C. N. (2004). *Amygdala and hippocampal activity during acquisition and extinction of human fear conditioning*. 4(3), 317–325.
128. Koo, J. W., Han, J. S., Kim, J. J. (2004). Selective neurotoxic lesions of basolateral and central nuclei of the amygdala produce differential effects on fear conditioning. *Journal of Neuroscience*, 24(35), 7654–7662.
129. Konorski, J. (1948). *Conditioned reflexes and neuron organization*. New York, NY, US, Cambridge University Press.

130. Kostowski, W. (2006). Podstawowe mechanizmy i teorie uzależnień Basic mechanisms and theories of addictions. *Alkoholizm i Narkomania* (T. 19).
131. Kuzniewska, B., Rejmak, E., Malik, A. R., Jaworski, J., Kaczmarek, L., Kalita, K. (2013). Brain-Derived Neurotrophic Factor Induces Matrix Metalloproteinase 9 Expression in Neurons via the Serum Response Factor/c-Fos Pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 33(11), 2149–2162.
132. Lau, C., Pienkowski, M., Zhang, J. W., McPherson, B., Wu, E. X. (2015). Chronic exposure to broadband noise at moderate sound pressure levels spatially shifts tone-evoked responses in the rat auditory midbrain. *NeuroImage*, 122, 44–51.
133. Lau, C., Zhang, J. W., Xing, K. K., Zhou, I. Y., Cheung, M. M., Chan, K. C., Wu, E. X. (2011). BOLD responses in the superior colliculus and lateral geniculate nucleus of the rat viewing an apparent motion stimulus. *NeuroImage*, 58(3), 878–884.
134. Lau, C., Zhou, I. Y., Cheung, M. M., Chan, K. C., & Wu, E. X. (2011). BOLD temporal dynamics of rat superior colliculus and lateral geniculate nucleus following short duration visual stimulation. *PLoS ONE*, 6(4).
135. Lawrence, S. J. D., Formisano, E., Muckli, L., de Lange, F. P. (2019). Laminar fMRI: Applications for cognitive neuroscience. *NeuroImage*, 197(July 2017), 785–791.
136. Ledoux, J. E. (2000). Circuits in the. *New York*, 155–184.
137. LeDoux, J. E., Iwata, J., Cicchetti, P., & Reis, D. J. (1988). Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. *Journal of Neuroscience*, 8(7), 2517–2529.
138. LeDoux, J.E., Sakaguchi, A., i Reis, D.J. (1984). Subcortical efferent projections of the medial geniculate nucleus mediate emotional responses conditioned to acoustic stimuli. *Journal of Neuroscience*. 4, 683–698.
139. Li, J. N., & Sheets, P. L. (2018). The central amygdala to periaqueductal gray pathway comprises intrinsically distinct neurons differentially affected in a model of inflammatory pain. *Journal of Physiology*, 596(24), 6289–6305.
140. Liang, S., Wu, Y. (2022). *Anhedonia in Depression and Schizophrenia : Brain Reward and Aversion Circuits*. July, 1385–1396.
141. Liu, D., Li, S., Ren, L., Li, X., Wang, Z. (2022). The superior colliculus/lateral posterior thalamic nuclei in mice rapidly transmit fear visual information through the theta frequency band. *Neuroscience*, 496, 230–240.
142. Logothetis, N. K. (2008). What we can do and what we cannot do with fMRI. *Nature*, 453, 869-878.

143. Lovejoy, L. P., Krauzlis, R. J. (2010). Inactivation of primate superior colliculus impairs covert selection of signals for perceptual judgments. *Nature Neuroscience*, *13*(2), 261–266.
144. Lüscher, C., & Malenka, R. C. (2011). Drug-Evoked Synaptic Plasticity in Addiction: From Molecular Changes to Circuit Remodeling. *Neuron*, *69*(4), 650–663.
145. Lusk, N., Meck, W. H., Yin, H. H. (2020). *Mediodorsal Thalamus Contributes to the Timing of Instrumental Actions*.
146. Madisen, L., Zwingman, T. A., Sunkin, S. M., Oh, S. W., Zariwala, H. A., Gu, H., Ng, L. L., Palmiter, R. D., Hawrylycz, M. J., Jones, A. R., Lein, E. S., Zeng, H., Hatim, A., Gu, H., Ng, L. L., Palmiter, R. D., Hawrylycz, M. J., Allan, R., Lein, E. S., Zeng, H. (2010). A robust and high-throughput Cre Repointing and characterization. *Nat Neurosci*, *13*(1), 133–140.
147. Magnowska, M., Gorkiewicz, T., Suska, A., Wawrzyniak, M., Rutkowska-Włodarczyk, I., Kaczmarek, L., Włodarczyk, J. (2016). Transient ECM protease activity promotes synaptic plasticity. *Scientific Reports*, *6*, 1–14.
148. Mansour, Y., Ahmed, S. N., Kulesza, R. (2021). Abnormal morphology and subcortical projections to the medial geniculate in an animal model of autism. *Experimental Brain Research*, *239*(2), 381–400.
149. Maren S, Quirk GJ. (2004). Neuronal signalling of fear memory. *Nature Review Neuroscience*. *5*:844–52
150. Markicevic, M., Savvateev, I., Grimm, C., Zerbi, V. (2021). Emerging imaging methods to study whole-brain function in rodent models. *Translational Psychiatry*, *11*(1).
151. Martin-Soelch, C., Linthicum, J., Ernst, M. (2007). Appetitive conditioning: Neural bases and implications for psychopathology. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *31*(3), 426–440.
152. Martin, S. J., Grimwood, P. D., Morris, R. G. M. (2000). Synaptic Plasticity and Motor Learning. *Neurosci.*, *23*(Hebb 1949), 60456.
153. Martinez, R. C. R., Gupta, N., Lazaro-Munoz, G., Sears, R. M., Kim, S., Moscarello, J. M., LeDoux, J. E., Cain, C. K. (2013). Active vs. reactive threat responding is associated with differential c-Fos expression in specific regions of amygdala and prefrontal cortex. *Learning and Memory*, *20*(8), 446–452.
154. Mattson, B. J., Koya, E., Simmons, D. E., Mitchell, T. B., Berkow, A., Crombag, H. S., Hope, B. T. (2008). Context-specific sensitization of cocaine-induced locomotor

- activity and associated neuronal ensembles in rat nucleus accumbens. *European Journal of Neuroscience*, 27(1), 202–212.
155. McCullough, K. M., Morrison, F. G., Hartmann, J., Carlezon, W. A., Ressler, K. J. (2018). Quantified coexpression analysis of central amygdala subpopulations. *eNeuro*, 5(1), 1–12.
  156. McDonald, A. J. (1982). Cytoarchitecture of the central amygdaloid nucleus of the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 208(4), 401–418.
  157. McKay, B. M., Matthews, E. A., Oliveira, F. A., Disterhoft, J. F. (2009). Intrinsic neuronal excitability is reversibly altered by a single experience in fear conditioning. *Journal of Neurophysiology*, 102(5), 2763–2770.
  158. McLaughlin, R. J., Floresco, S. B. (2007). The role of different subregions of the basolateral amygdala in cue-induced reinstatement and extinction of food-seeking behavior. *Neuroscience*, 146(4), 1484–1494.
  159. Mews, P., Calipari, E. S., (2017). Cross-talk between the epigenome and neural circuits in drug addiction. *Progress in Brain Research*, 235(12) 19–63.
  160. Michaluk, P., Wawrzyniak, M., Alot, P., Szczot, M., Wyrembek, P., Mercik, K., Medvedev, N., Wilczek, E., De Roo, M., Zuschratter, W., Muller, D., Wilczynski, G. M., Mozrzymas, J. W., Stewart, M. G., Kaczmarek, L., Wlodarczyk, J. (2011). Influence of matrix metalloproteinase MMP-9 on dendritic spine morphology. *Journal of Cell Science*, 124(19), 3369–3380.
  161. Morris, R., Hitch, G., Graham, K., Bussey, T. (2006). Learning and Memory. Cognitive systems: Information processing meets brain science. *Elsevier Academic Press*, 193–235.
  162. Morgan, J. I., Cohen, D. R., Hempstead, J. L., Curran, T. (1987). Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. *Science*, 237(4811), 192–197.
  163. Morgan, J. I., & Curran, T. (1991). Stimulus-transcription coupling in the nervous system: Involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annual Review of Neuroscience*, 14, 421–451.
  164. Morgan, J. I., Curran, T. (1995). Review : The Immediate-Early Gene Response and Neuronal Death and Regeneration. *The Neuroscientist*, 1(2), 68–75.
  165. Morgan, P. F., & Linnoila, M. (b.d.). *morgan1991.pdf*.
  166. Mork, B. E., Lamerand, S. R., Zhou, S., Taylor, B. K., Sheets, P. L. (2022). Sphingosine-1-phosphate receptor 1 agonist SEW2871 alters membrane properties of

- late-firing somatostatin expressing neurons in the central lateral amygdala. *Neuropharmacology*, 203, 1–26.
167. Moyer, J. R., Power, J. M., Thompson, L. T., Disterhoft, J. F. (2000). Increased excitability of aged rabbit CA1 neurons after trace eyeblink conditioning. *Journal of Neuroscience*, 20(14), 5476–5482.
168. Moyer, J. R., Thompson, L. T., Disterhoft, J. F. (1996). Trace Eyeblink Conditioning Increases CA1 Excitability in a Transient and Learning-Specific Manner. *Journal of Neuroscience*, 16(17), 5536–5546.
169. Murphy, M. C., Nau, A. C., Fisher, C., Kim, S. G., Schuman, J. S., Chan, K. C. (2016). Top-down influence on the visual cortex of the blind during sensory substitution. *NeuroImage*, 125, 932–940.
170. Murphy, M. C., Poplawsky, A. J., Vazquez, A. L., Chan, K. C., Kim, S. G., Fukuda, M. (2016). Improved spatial accuracy of functional maps in the rat olfactory bulb using supervised machine learning approach. *NeuroImage*, 137, 1–8.
171. Nagy, V., Bozdagi, O., Huntley, G. W. (2007). The extracellular protease matrix metalloproteinase-9 is activated by inhibitory avoidance learning and required for long-term memory. *Learning and Memory*, 14(10), 655–664.
172. Namburi, P., Beyeler, A., Yorozu, S., Calhoon, G. G., Halbert, S. A., Wichmann, R., Holden, S. S., Mertens, K. L., Anahtar, M., Felix-Ortiz, A. C., Wickersham, I. R., Gray, J. M., Tye, K. M. (2015). A circuit mechanism for differentiating positive and negative associations. *Nature*, 520(7549), 675–678.
173. Nectow, A. R., Schneeberger, M., Zhang, H., Field, B. C., Renier, N., Azevedo, E., Patel, B., Liang, Y., Mitra, S., Tessier-Lavigne, M., Han, M. H., Friedman, J. M. (2017). Identification of a Brainstem Circuit Controlling Feeding. *Cell*, 170(3), 429–442.
174. Nikolaev, E., Kaminska, B., Tischmeyer, W., Matthies, H., Kaczmarek, L. (1992). Induction of expression of genes encoding transcription factors in the rat brain elicited by behavioral training. *Brain Research Bulletin*, 28(3), 479–484.
175. Nikolaev, E., Tischmeyer, W., Krug, M., Matthies, H., Kaczmarek, L. (1991). c-fos Protooncogene expression in rat hippocampus and entorhinal cortex following tetanic stimulation of the perforant path. *Brain Research*, 560(1–2), 346–349.
176. Nikolaev, E., Werka, T., Kaczmarek, L. (1992). C-fos protooncogene expression in rat brain after long-term training of two-way active avoidance reaction. *Behavioural Brain Research*, 48(1), 91–94.

177. Nord, C. L., Lawson, R. P., Huys, Q. J. M., Pilling, S., Roiser, J. P. (2018). Depression is associated with enhanced aversive Pavlovian control over instrumental behaviour. *Scientific Reports*, 8(1), 1–10.
178. Nowogrodzki, A. (2018). The Strongest Scanners - Researchers are pushing non-invasive brain imaging to new limits. *Scientific American*, 1(23), 3–3.
179. Nys, J., Smolders, K., Laramée, M. E., Hofman, I., Hu, T. T., Arckens, L. (2015). Regional specificity of GABAergic regulation of cross-modal plasticity in mouse visual cortex after unilateral enucleation. *Journal of Neuroscience*, 35(32), 11174–11189.
180. O'Brien, C. P., Childress, A. R., Ehrman, R., Robbins, S. J. (1998). Conditioning factors in drug abuse: Can they explain compulsion? *Journal of Psychopharmacology*, 12(1), 15–22.
181. Oh, M., Disterhoft, J. F. (2016). Increased excitability of both principle neurons and interneurons during associative learning. *Physiology & behavior*, 176(3), 139–148.
182. Oh, M. M., Kuo, A. G., Wu, W. W., Sametsky, E. A., Disterhoft, J. F., (2003). Watermaze Learning Enhances Excitability of CA1 Pyramidal Neurons. *Journal of Neurophysiology*, 90(4), 2171–2179.
183. Onishchenko, N., Tamm, C., Vahter, M., Ho, T., Johnson, J. A., Johnson, D. A., Ceccatelli, S. (2007). Developmental Exposure to Methylmercury Alters Learning and Induces Depression-like Behavior in Male Mice. *Toxicological Sciences*, 97(2), 428–437.
184. Paban, V., Alescio-Lautier, B., Devigne, C., Soumireu-Mourat, B. (1999). Fos protein expression induced by intracerebroventricular injection of vasopressin in unconditioned and conditioned mice. *Brain Research*, 825(1–2), 115–131.
185. Pape, H. C., Pare, D. (2010). Plastic synaptic networks of the amygdala for the acquisition, expression, and extinction of conditioned fear. *Physiological Reviews*, 90(2), 419–463.
186. Parkinson, J. A., Robbins, T. W., Everitt, B. J. (2000). Dissociable roles of the central and basolateral amygdala in appetitive emotional learning. *European Journal of Neuroscience*, 12(1), 405–413.
187. Parnaudeau, S., Bolkan, S. S., Kellendonk, C. (2019). *Cortex for Cognition*. 83(8), 648–656.
188. Pawłowska, M., Stefaniuk, M., Legutko, D., Kaczmarek L. (2019). Light-Sheet Microscopy for Whole-Brain Imaging. *Springer Nature Singapore Pte Ltd*, Chapter 3,

- 69-81.
189. Pavlov, I.P. (1927) *Conditioned Reflexes: An Investigation of the Physiological Activity of the Cerebral Cortex*. Translated and Edited by G. V. Anrep. Oxford University Press, London, 142.
  190. Penzo, M. A., Robert, V., Li, B. (2014). Fear conditioning potentiates synaptic transmission onto long-range projection neurons in the lateral subdivision of central amygdala. *Journal of Neuroscience*, *34*(7), 2432–2437.
  191. Posluszny, A., Nowak, K., Siucinska, E., Kossut, M. (2013). Interneurons containing somatostatin are affected by learning-induced cortical plasticity. *Neuroscience*, *254*, 18–25.
  192. Puścian, A., Winiarski, M., Łęski, S., Charzewski, Ł., Nikolaev, T., Borowska, J., Dzik, J. M., Bijata, M., Lipp, H. P., Dziembowska, M., Knapska, E. (2021). Chronic fluoxetine treatment impairs motivation and reward learning by affecting neuronal plasticity in the central amygdala. *British Journal of Pharmacology*, *178*(3), 672–688.
  193. Quirk, G. J., Repa, J. C., LeDoux, J. E. (1995). Fear conditioning enhances short-latency auditory responses of lateral amygdala neurons: Parallel recordings in the freely behaving rat. *Neuron*, *15*(5), 1029–1039.
  194. Ramirez, S., Liu, X., MacDonald, C. J., Moffa, A., Zhou, J., Redondo, R. L., Tonegawa, S. (2015). Activating positive memory engrams suppresses depression-like behaviour. *Nature*, *522*(7556), 335–339.
  195. Rapp, C., Hamilton, J., Richer, K., Sajjad, M., Yao, R., Thanos, P. K. (2022). Alcohol binge drinking decreases brain glucose metabolism and functional connectivity in adolescent rats. *Metabolic Brain Disease*, 1901–1908.
  196. Reijmers, L. G., Perkins, B. L., Matsuo, N., Mayford, M. (2007). Localization of a stable neural correlate of associative memory. *Science*, *317*(5842), 1230–1233.
  197. Renier, N., Adams, E. L., Kirst, C., Wu, Z., Azevedo, R., Kohl, J., Autry, A. E., Kadiri, L., Umadevi Venkataraju, K., Zhou, Y., Wang, V. X., Tang, C. Y., Olsen, O., Dulac, C., Osten, P., Tessier-Lavigne, M. (2016). Mapping of Brain Activity by Automated Volume Analysis of Immediate Early Genes. *Cell*, *165*(7), 1789–1802.
  198. Renier, N., Wu, Z., Simon, D. J., Yang, J., Ariel, P., Tessier-Lavigne, M. (2014). IDISCO: A simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging. *Cell*, *159*(4), 896–910.
  199. Richardson, D. S., Lichtman, J. W. (2015). Clarifying Tissue Clearing. *Cell*, *162*(2), 246–257.

200. Rivera, S., Khrestchatsky, M., Kaczmarek, L., Rosenberg, G. A., Jaworski, D. M. (2010). Metzincin proteases and their inhibitors: Foes or friends in nervous system physiology? *Journal of Neuroscience*, *30*(46), 15337–15357.
201. Rizvi, S. J., Pizzagalli, D. A., Sproule, B. A., Kennedy, S. H. (2017). Assessing anhedonia in depression: Potentials and pitfalls Sakina. *Physiology & behavior*, *176*(12), 139–148.
202. Robinson, M. J. F., Warlow, S. M., Berridge, K. C. (2014). Optogenetic excitation of central amygdala amplifies and narrows incentive motivation to pursue one reward above another. *Journal of Neuroscience*, *34*(50), 16567–16580.
203. Robinson, O. J., Charney, D. R., Overstreet, C., Vytal, K., Grillon, C. (2012). The adaptive threat bias in anxiety: Amygdala-dorsomedial prefrontal cortex coupling and aversive amplification. *NeuroImage*, *60*(1), 523–529.
204. Robinson, T. E., Berridge, K. C. (1993). The neural basis of drug craving: An incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Research Reviews*, *18*(3), 247–291.
205. Robison, A. J., Nestler, E. J. (2012). *NIH Public Access*. *12*(11), 623–637.
206. Rossi, P. J., Peden, C., Castellanos, O., Foote, K. D., Gunduz, A., Okun, M. S. (2017). The human subthalamic nucleus and globus pallidus internus differentially encode reward during action control. *Human Brain Mapping*, *38*(4), 1952–1964.
207. Roy, D. S., Park, Y. G., Kim, M. E., Zhang, Y., Ogawa, S. K., DiNapoli, N., Gu, X., Cho, J. H., Choi, H., Kametsky, L., Martin, J., Mosto, O., Aida, T., Chung, K., Tonegawa, S. (2022). Brain-wide mapping reveals that engrams for a single memory are distributed across multiple brain regions. *Nature Communications*, *13*(1).
208. Ruff, D. A., & Cohen, M. R. (2013). Pursuing the Link between Neurons and Behavior. *Neuron*, *79*(1), 6–9.
209. Rylski, M., Amborska, R., Zybura, K., Michaluk, P., Bielinska, B., Konopacki, F. A., Wilczynski, G. M., Kaczmarek, L. (2009). JunB is a repressor of MMP-9 transcription in depolarized rat brain neurons. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *40*(1), 98–110.
210. Saar, D., Grossman, Y., Barkai, E. (1998). Reduced after-hyperpolarization in rat piriform cortex pyramidal neurons is associated with increased learning capability during operant conditioning. *European Journal of Neuroscience*, *10*(7), 1518–1523.
211. Saffen, D. W., Cole, A. J., Worley, P. F., Christy, B. A., Ryder, K., Baraban, J. M. (1988). Convulsant-induced increase in transcription factor messenger RNAs in rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of*



- America*, 85(20), 7795–7799.
212. Sah, P., Faber, E. S. L., De Armentia, M. L., Power, J. (2003). The amygdaloid complex: Anatomy and physiology. *Physiological Reviews*, 83(3), 803–834.
  213. Saha, S. (2005). Role of the central nucleus of the amygdala in the control of blood pressure: Descending pathways to medullary cardiovascular nuclei. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 32(5–6), 450–456.
  214. Salcedo, E., Zhang, C., Kronberg, E., Restrepo, D. (2005). Analysis of training-induced changes in ethyl acetate odor maps using a new computational tool map the Glomerular layer of the olfactory bulb. *Chemical Senses*, 30(7), 615–626.
  215. Santini, E., Quirk, G. J., Porter, J. T. (2008). Fear conditioning and extinction differentially modify the intrinsic excitability of infralimbic neurons. *Journal of Neuroscience*, 28(15), 4028–4036.
  216. Santini, E., Sepulveda-orengo, M., Porter, J. T. (2012). Muscarinic Receptors Modulate the Intrinsic Excitability of Infralimbic Neurons and Consolidation of Fear Extinction. *Neuropsychopharmacology*, 37(9), 2047–2056.
  217. Savonenko, A., Filipkowski, R. K., Werka, T., Zielinski, K., Kaczmarek, L. (1999). Defensive conditioning-related functional heterogeneity among nuclei of the rat amygdala revealed by c-Fos mapping. *Neuroscience*, 94(3), 723–733.
  218. Schiess, M. C., Callahan, P. M., Zheng, H. (1999). Characterization of the electrophysiological and morphological properties of rat central amygdala neurons in vitro. *Journal of Neuroscience Research*, 58(5), 663–673.
  219. Schneider, C. A., Rasband, W. S., Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675.
  220. Schneider, C., Palomba, D., Flor, H. (2004). Pavlovian conditioning of muscular responses in chronic pain patients: Central and peripheral correlates. *Pain*, 112(3), 239–247.
  221. Schoenbaum, G., Chiba, A. A., Gallagher, M. (1998). Orbitofrontal cortex and basolateral amygdala encode expected outcomes during learning. *Nature Neuroscience*, 1(2), 155–159.
  222. Schultz, W. (1998). Predictive reward signal of dopamine neurons. *Journal of Neurophysiology*, 80(1), 1–27.
  223. Semon, Richard (1921). *Engraphic Action of Stimuli on the Individual*". The Mneme. Chapter II. London: George Allen & Unwin. p. 24; trans by Louis Simon.
  224. Seymour, B., Singer, T., Dolan, R. (2007). The neurobiology of punishment. *Nature*

- Reviews Neuroscience*, 8(4), 300–311.
225. Shang, C., Liu, A., Li, D., Xie, Z., Chen, Z., Huang, M., Li, Y., Wang, Y., Shen, W. L., Cao, P. (2019). A subcortical excitatory circuit for sensory-triggered predatory hunting in mice. *Nature Neuroscience*, 22(6), 909–920.
  226. Siedentopf, H., Zsigmondy, R. (1903). Über Sichtbarmachung und Grössenbestimmung ultramikroskopischer Teilchen. *Annalen der Physik*, 4(1), 1–39.
  227. Silvestri, L., Costantini, I., Sacconi, L., Pavone, F. S. (2016). Clearing of fixed tissue: a review from a microscopist's perspective. *Journal of Biomedical Optics*, 21(8), 081205.
  228. Skup M. (2020). Jerzy konorski (1903–1973) – eksperymentator i teoretyk: od badań odruchów warunkowych do koncepcji jednostek gnostycznych. *Kosmos*, 1(326), 5-16.
  229. Slijepcevic, P. (2021). Principles of Information Processing and Natural Learning in Biological Systems. *Journal for General Philosophy of Science*, 52(2), 227–245.
  230. Song, C., Detert, J. A., Sehgal, M., Moyer, J. R. (2012). Trace fear conditioning enhances synaptic and intrinsic plasticity in rat hippocampus. *Journal of Neurophysiology*, 107(12), 3397–3408.
  231. Sonnenberg, J. L., Macgregor-Leon, P. F., Carrant, T., Morgant, J. I. (1989). Dynamic alterations occur in the levels and composition of transcription factor AP-1 complexes after seizure. *Neuron*, 3(3), 359–365.
  232. Sparta, D. R., Smithuis, J., Stamatakis, A. M., Jennings, J. H., Kantak, P. A., Ung, R. L., Stuber, G. D. (2014). Inhibition of projections from the basolateral amygdala to the entorhinal cortex disrupts the acquisition of contextual fear. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8(5), 6–11.
  233. Stamatakis, A. M., Sparta, D. R., Jennings, J. H., Mcelligott, Z. A., Decot, H., Stuber, G. D. (2015). Implications for addiction-related behaviors. *Neuropharmacology*, 76(0), 1–22.
  234. Stawarski, M., Rutkowska-Wlodarczyk, I., Zeug, A., Bijata, M., Madej, H., Kaczmarek, L., Wlodarczyk, J. (2014). Genetically encoded FRET-based biosensor for imaging MMP-9 activity. *Biomaterials*, 35(5), 1402–1410.
  235. Steinberg, E. E., Gore, F., Heifets, B. D., Taylor, M. D., Norville, Z. C., Beier, K. T., Földy, C., Lerner, T. N., Luo, L., Deisseroth, K., Malenka, R. C. (2020). Amygdala-Midbrain Connections Modulate Appetitive and Aversive Learning. *Neuron*, 106(6), 1026-1043.
  236. Swanson, L. W., Petrovich, G. D. (1998). What is the amygdala? *Trends in*

- Neurosciences*, 21(8), 323–331.
237. Szklarczyk, A., Lapinska, J., Rylski, M., McKay, R. D. G., Kaczmarek, L. (2002). Matrix metalloproteinase-9 undergoes expression and activation during dendritic remodeling in adult hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 22(3), 920–930.
  238. Taniguchi, H., He, M., Wu, P., Kim, S., Paik, R., Sugino, K., Kvitsiani, D., Fu, Y., Lu, J., Lin, Y., Miyoshi, G., Shima, Y., Fishell, G., Nelson, S. B., Huang, Z. J. (2011). A resource of cre driver lines for genetic targeting of GABAergic neurons in cerebral cortex. *Neuron*, 72(6), 1091.
  239. Tayler, K. K., Tanaka, K. Z., Reijmers, L. G., Wiltgen, B. J. (2013). Reactivation of neural ensembles during the retrieval of recent and remote memory. *Current Biology*, 23(2), 99–106.
  240. Timshel, P. N., Thompson, J. J., Pers, T. H. (2020). Genetic mapping of etiologic brain cell types for obesity. *eLife*, 9, 1–45.
  241. Turner, R. (2016). Uses, misuses, new uses and fundamental limitations of magnetic resonance imaging in cognitive science. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371(1705).
  242. Tye, K. M., & Janak, P. H. (2007). Amygdala neurons differentially encode motivation and reinforcement. *Journal of Neuroscience*, 27(15), 3937–3945.
  243. van der Schaaf, M. E., Schmidt, K., Kaur, J., Gamer, M., Wiech, K., Forkmann, K., Bingel, U. (2022). Acquisition learning is stronger for aversive than appetitive events. *Communications Biology*, 5(1), 1–10.
  244. Venniro, M., Russell, T. I., Ramsey, L. A., Richie, C. T., Lesscher, H. M. B., Giovanetti, S. M., Messing, R. O., Shaham, Y. (2020). Abstinence-dependent dissociable central amygdala microcircuits control drug craving. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(14), 8126–8134.
  245. Wang, X. Bin, Bozdagi, O., Nikitczuk, J. S., Zu, W. Z., Zhou, Q., Huntley, G. W. (2008). Extracellular proteolysis by matrix metalloproteinase-9 drives dendritic spine enlargement and long-term potentiation coordinately. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(49), 19520–19525.
  246. Wang, J., Palkovits, M., Usdin, T. B., & Dobolyi, A. (2006). Afferent connections of the subparafascicular area in rat. *Neuroscience*, 138(1), 197–220.
  247. Whitten, L. (2012). Functional Magnetic Resonance Imaging (fMRI): An Invaluable Tool in Translational Neuroscience. *RTI Press publication No. OP-0010-1212, December*, 1–31.

248. Wilensky, A. E., Schafe, G. E., Kristensen, M. P., LeDoux, J. E. (2006). Rethinking the fear circuit: The central nucleus of the amygdala is required for the acquisition, consolidation, and expression of pavlovian fear conditioning. *Journal of Neuroscience*, 26(48), 12387–12396.
249. Wilson, T. D., Valdivia, S., Khan, A., Ahn, H. S., Adke, A. P., Gonzalez, S. M., Sugimura, Y. K., Carrasquillo, Y. (2019). Dual and Opposing Functions of the Central Amygdala in the Modulation of Pain. *Cell Reports*, 29(2), 332-346.e5.
250. Xiao, W., Jiao, Z. L., Senol, E., Yao, J., Zhao, M., Zhao, Z. D., Chen, X., Cao, P., Fu, Y., Gao, Z., Shen, W. L., Xu, X. H. (2022). Neural circuit control of innate behaviors. *W Science China Life Sciences* (T. 65, Numer 3, ss. 466–499). Science Press (China).
251. Xu, H., Jeong, H. Y., Tremblay, R., Rudy, B. (2013). Neocortical Somatostatin-Expressing GABAergic Interneurons Disinhibit the Thalamorecipient Layer 4. *Neuron*, 77(1), 155–167.
252. Xu, X., Roby, K. D., Callaway, E. M. (2006). Age-Dependent Effect of Nitric Oxide on Subventricular Zone and Olfactory Bulb. *Journal of Comparative Neurology*, 346(October 2007), 339–346.
253. Yap, E., Greenberg, M. E. (2018). Activity-regulated transcription: Bridging the gap between neural activity and behavior. *Neuron*. 100(2), 330–348.
254. Yousuf, H., Ehlers, V. L., Sehgal, M., Song, C., Moyer, J. R., Angeles, L. (2021). *within the Fear Conditioning Circuit*. 414, 1–33.
255. Yu, G., Herman, J. P., Katz, L. N., Krauzlis, R. J. (2022). Microsaccades as a marker not a cause for attention-related modulation. *eLife*, 11, 1–14.
256. Yu, K., da Silva, P. G., Albeanu, D. F., Li, B. (2016). Central amygdala somatostatin neurons gate passive and active defensive behaviors. *Journal of Neuroscience*, 36(24), 6488–6496.
257. Zelcer, I., Cohen, H., Richter-levin, G., Lebiosn, T. Grossberger T., Barakai E. (2006). A Cellular Correlate of Learning-induced Metaplasticity in the Hippocampus. *Cerebral Cortex*, 16(4). 460-468.
258. Zelikowsky, M., Hersman, S., Chawla, M. K., Barnes, C. A., Fanselow, M. S. (2014). Neuronal ensembles in amygdala, hippocampus, and prefrontal cortex track differential components of contextual fear. *Journal of Neuroscience*, 34(25), 8462–8466.
259. Zhou, W., Jin, Y., Meng, Q., Zhu, X., Bai, T., Tian, Y., Mao, Y., Wang, L., Xie, W., Zhong, H., Zhang, N., Luo, M. H., Tao, W., Wang, H., Li, J., Li, J., Qiu, B. S., Zhou,

- J. N., Li, X., Zhang, Z. (2019). A neural circuit for comorbid depressive symptoms in chronic pain. *Nature Neuroscience*, 22(10).
260. Zittel, T. T., Glatzle, J., Kreis, M. E., Starlinger, M., Eichner, M., Raybould, H. E., Becker, H. D., Jehle, E. C. (1999). C-fos protein expression in the nucleus of the solitary tract correlates with cholecystokinin dose injected and food intake in rats. *Brain Research*, 846(1), 1–11.
261. Zrinzo, L., Zrinzo, L. V., Hariz, M. (2007). The peripeduncular nucleus: A novel target for deep brain stimulation? *NeuroReport*, 18(12), 1301–1302.

## 9. Spis publikacji własnych

1. Puścian A., Winiarski M., Borowska J., Łęski S., Górkiewicz T., Chaturvedi M., **Nowicka K.**, Wołyniak M., Chmielewska JJ., Nikolaev T., Meyza K., Dziembowska M., Kaczmarek L., Knapska E. (2022). Targeted therapy of cognitive deficits in fragile X syndrome. *Molecular Psychiatry*. 27(6):2766-2776.
2. Salamian A., Legutko D., **Nowicka K.**, Badyra B., Kaźmierska-Grębowska P., Caban B., Kowalczyk T., Kaczmarek L., Beroun A. (2021). Inhibition of Matrix Metalloproteinase 9 Activity Promotes Synaptogenesis in the Hippocampus. *Cerebral Cortex*, 31:6.
3. Lenart J., **Kogut K.**, Salinska E., (2017). Lateralization of housekeeping genes in the brain of one-day old chicks. *Gene Expression Patterns*. 25-26:85-91.

## 10. Źródło finansowania

Praca finansowana ze środków Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej - TEAM6-2016 (POIR.04.04.00-00-1ACA/16-00)

Pursuing addiction: appetitive learning and synaptic plasticity in the amygdala.

Kierownik projektu: prof. dr hab. Leszek Kaczmarek

2016-2022

## 11. Załączniki

Struktura	Poziom istotności (p<0.005)	Struktura	Poziom istotności (p< 0.005)	Struktura	Poziom istotności (p< 0.005)	Struktura	Poziom istotności (p< 0.005)
VTA	0.00104	STN	0.00569	VM	0.0127	VLPO	0.0262
ORBm6a	0.00109	VISli6b	0.00582	SSs6b	0.0127	COAp	0.0264
MRN	0.00112	SCig-b	0.00598	TEa	0.0128	P	0.0269
MOs5	0.00121	ND	0.00607	Isocortex	0.013	RH	0.0269
TEa6a	0.00127	LS	0.00611	CTXpl	0.0131	FC	0.0271
SCm	0.00138	NPC	0.00623	IA	0.0133	VISC6a	0.0272
VPMpc	0.0014	SCig-a	0.00623	IV	0.0134	SLD	0.0286
AUDpo5	0.00146	ADP	0.00637	MOp1	0.0139	PALd	0.029
SCig	0.00153	VISpor5	0.00638	RSPd6b	0.0141	MOB	0.0306
LHA	0.00159	SSp-bfd1	0.00646	IAM	0.0142	SSp-un6b	0.0317
PL5	0.00163	Alv6b	0.00683	HPF	0.0143	TMv	0.0323
DP	0.00167	SSp-m6b	0.00686	SGN	0.0145	LSv	0.0332
AUDv6b	0.00176	MOs6b	0.00713	CP	0.0148	SSp-n4	0.0333
SSp-ul5	0.00188	SSp-bfd6b	0.00718	STRd	0.0148	SCiw	0.0336
ACAd6a	0.00189	AD	0.0073	ACAd5	0.015	ORBvl6a	0.0342
LPO	0.00191	GPI	0.00753	SSs1	0.0151	CA1	0.0352
STR	0.00209	AUDd1	0.00772	AUDp6b	0.0154	CL	0.0352
RR	0.00214	PL	0.00789	ATN	0.0157	RSPv	0.0356
FRP6a	0.00229	PIR	0.00813	GU6b	0.0157	AUDd6b	0.0357
AUDp	0.00233	LSr	0.00821	LAT	0.0157	Alp5	0.0358
AUDv6a	0.00235	SSp-ul1	0.00828	COA	0.0164	TRN	0.0362
P-sat	0.00238	PRNr	0.00834	PALc	0.0167	AM	0.0364
sAMY	0.00238	APN	0.00844	BST	0.0172	MEV	0.0366
ORBI5	0.00241	SSp-un1	0.00848	LD	0.0172	HB	0.037
ORBI	0.00258	MBsta	0.00868	MBO	0.0172	SSp-II5	0.0371
AUDp6a	0.00273	VPL	0.00873	RE	0.0174	SCsg	0.0373
IAD	0.00279	SUB	0.00881	SSp-II6b	0.0174	DR	0.0373
ORBvl5	0.00291	BLAa	0.00917	SSp-n6b	0.0174	SSp-un6a	0.0373
CUN	0.00306	PT	0.00948	PCN	0.0176	SUT	0.0374
ORBI6b	0.00337	CTX	0.00989	NLOT3	0.0178	BLAp	0.0385
NB	0.00338	VISpor	0.0101	PAA	0.0179	SSp-II	0.0386
LSX	0.00339	BLA	0.0102	MM	0.0181	NTB	0.0405
CLA	0.00352	LA	0.0102	Alp	0.0183	VISal6b	0.0406
Ald6b	0.00352	VTN	0.0102	IMD	0.0184	VISli5	0.041
LP	0.00362	ILA6b	0.0103	SSp-II1	0.0195	IGL	0.0419
PSTN	0.00366	SSs6a	0.0104	HY	0.0197	PF	0.0428
CH	0.00378	MOp6b	0.0105	CM	0.0197	SSp-m1	0.0428
NOT	0.00378	LH	0.0106	GU4	0.0215	NDB	0.0432
ORBI6a	0.00386	AUD	0.0108	ORBvl6b	0.022	PH	0.0444
PPN	0.00389	CS	0.0108	CA	0.0228	GPe	0.0451
STRv	0.00402	AT	0.011	TT	0.0229	MOs1	0.0454
VISpor6a	0.00427	ORBm5	0.0111	TU	0.0233	Alp6a	0.0456
ILA5	0.00428	SPA	0.0119	CA3	0.0236	DG-sg	0.0459
ILA	0.00434	PB	0.0119	TR	0.0238	VISC6b	0.0459
PST	0.00448	RSPv1	0.012	MEA	0.0241	MPO	0.0463
ACB	0.00477	SSp-II6a	0.0124	ZI	0.0246	POR	0.0465
PP	0.00538	SSp-ul	0.0124	SAG	0.0251	ORBm6b	0.0478
ORB	0.0054	VISa1	0.0125	SUM	0.0255		
BLAv	0.00547						

**Załącznik 1** Lista struktur wykazujących zwiększoną ekspresję białka c-Fos u zwierząt poddanych treningowi apetytywnemu w porównaniu do zwierząt kontrolnych (niesparowany test t-Studenta, p<0,05).

Skrót	Pełna nazwa struktury	(ang.)
AD	Jądro przednio-grzbietowe wzgórza	Anterodorsal nucleus
AId6b	Jądro przednie podwzgórza	Anterior hypothalamic nucleus
Alv6b	Jądro węchowe przednie	Anterior olfactory nucleus
CL	Jądro środkowo-boczne wzgórza	Central lateral nucleus of the thalamus
CM	Jądro przyśrodkowe wzgórza	Central medial nucleus of the thalamus
CS	Jądro środkowe szwu	Superior central nucleus raphe
DORpm	Jądra wzgórza związane z asocjacyjną korą polimodalną	Thalamus, polymodal association cortex related
DR	Jądro grzbietowo-przyśrodkowe podwzgórza	Dorsomedial nucleus of the hypothalamus
GPI	Gałka biała	Globus pallidus
IAD	Jądro międzyprzodo-grzbietowe wzgórza	Interanterodorsal nucleus of the thalamus
IAM	Jądro międzyprzednio-przyśrodkowe wzgórza	Interanteromedial nucleus of the thalamus
ILA6b	Obszar infralimbiczny	Infralimbic area
ILM	Jądra śródblaszkowe wzgórza	Intralaminar nuclei of the dorsal thalamus
IMD	Jądra między-przyśrodkowe wzgórza	Intermediodorsal nucleus of the thalamus
IV	Jądro nerwu błotkowego	Trochlear nucleus
LAT	Jądra boczne wzgórza grzbietowego	Lateral group of the dorsal thalamus
LP	Jądro boczno-tyłne wzgórza	Lateral posterior nucleus of the thalamus
MBO	Ciało sutkowe	Mammillary body
MD	Jądro przyśrodkowe wzgórza	Mediodorsal nucleus of thalamus
MED	Grupa jąder przyśrodkow-grzbietowych wzgórza	Medial group of the dorsal thalamus



Skrót	Pełna nazwa struktury	(ang.)
MEV	Jądro trójdzielne śródmózgowia	Midbrain trigeminal nucleus
MG	Przyśrodkowe ciało kolankowate	Medial geniculate complex
MIM	Jądro przyśrodkowe wzgórza	Mediodorsal nucleus of thalamus
MOp1	Kora ruchowa, warstwa 1	Primary motor area, layer 1
ND	Jądro spoidła tylnego	Nucleus of Darkschewitsch
ORBm6b	Obszar oczodołowy, część środkowa, warstwa 6b	Orbital area, medial part, layer 6b
P-sat	Jądra mostu	Pons nuclei
PCN	Jądro okołośrodkowe	Paracentral nucleus
PF	Jądro przypęczkowe	Parafascicular nucleus
POR	Jądro górne oliwki	Superior olivary complex, perolivary complex
PP	Jądro okołonasadowe	Peripeduncular nucleus
PPT	Jądro przedpokrywowe tylne	Posterior pretectal nucleus
PR	Jądro perireunensis	Perireunensis nucleus
RE	Jądro łączące wzgórza	Nucleus of reuniens
RH	Jądro równoległoboczne	Rhomboid nucleus
RT	Jądro siatkowate wzgórza	Reticular nucleus of the thalamus
SCig-c	Wzgórek górny	Superior colliculus
SGN	Jądro nadkolankowe	Suprageniculate nucleus
SLD	Jądro boczno-grzbietowe nakrywki	Sublaterodorsal nucleus
SMT	Jądro podprzyśrodkowe wzgórza	Submedial nucleus of the thalamus
SPA	Obszar popowięziowy	Subparafascicular area
SPFm	Jądro podprzyśrodkowe	Subparafascicular nucleus
SSp-bfd1	Kora somatosensoryczna, pole baryłkowe, warstwa 1	Primary somatosensory area, barrel field, layer 1
SSp-II1	Kora somatosensoryczna, kończyna dolna, warstwa 1	Primary somatosensory area, lower limb, layer 1
SSp-m1	Kora somatosensoryczna, jama ustna, warstwa 1	Primary somatosensory area, mouth, layer 1

Skrót	Pełna nazwa struktury	(ang.)
SSp-m6b	Kora somatosensoryczna, jama ustna, warstwa 6b	Primary somatosensory area, mouth, layer 6b
SSp-ul1	Kora somatosensoryczna, kończyna górna, warstwa 1	Primary somatosensory area, upper limb, layer 1
SUT	Jądro nadtrigeminalne	Supratrigeminal nucleus
VISa1	Przednio-boczne pole wzrokowe, warstwa 1	Anterolateral visual area, layer 1
VM	Jądro brzuszno-przyśrodkowe wzgórza	Ventral medial nucleus of the thalamus
VPMpc	Jądro brzuszne tylnoprzyśrodkowe wzgórza, część drobnokomórkowa	Ventral posteromedial nucleus of the thalamus, parvicellular part
VTA	Pole brzuszne nakrywki	Ventral tegmental area
VTN	Jądro brzuszne nakrywkowe	Ventral tegmental nucleus

**Załącznik 2** Rozwinięcie akronimów nazw struktur, które wykazywały co najmniej 2-krotnie większą liczbę komórek pozytywnych względem c-Fos w grupie apetytywnej, niż w kontrolnej.