

**Łukasz Bijoch**

**Przetwarzanie informacji o nagrodach  
naturalnych i farmakologicznych w mózgu myszy**

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

**PROMOTOR:**  
**prof. dr hab. Leszek Kaczmarek**

**PROMOTOR POMOCNICZY:**  
**dr Anna Beroun**

## **Podziękowania**

*Chciałbym serdecznie podziękować moim promotorom i mentorom, dr Annie Beroun oraz prof. Leszkowi Kaczmarkowi, za ich nieocenione wsparcie na różnych etapach realizacji mojego doktoratu i stworzenia warunków do rozwoju naukowego.*

*Nie mogę też zapomnieć o wdzięczności wobec moich kolegów i koleżanek z Pracowni Neurobiologii oraz Pracowni Plastyczności Neuronalnej. Szczególne podziękowania kieruję do tych, z którymi miałem przyjemność najczęściej współpracować: mgr Joannie Klos, mgr farm. Martynie Pękale, dr Monice Pawłowskiej, mgr Dianie Legutko oraz lek. wet. Justynie Wiśniewskiej.*

*Wasza pomoc i zaangażowanie były nieocenione, a wasza przyjaźń była motorem napędowym mojego doktoratu. Dziękuję Wam wszystkim.*

Badania opisane w pracy doktorskiej zostały zrealizowane dzięki funduszom z Narodowego Centrum Nauki (PRELUDIUM 2020/37/N/NZ4/02888) oraz Fundacji na rzecz Nauki Polskiej (HOMING o numerze Homing/2016-1/10 oraz Międzynarodowe Agendy Badawcze: BRAINCITY Centrum Doskonałości Badań nad Plastycznością Neuronalną i Chorobami Mózgu MAB 8/2017).



N A R O D O W E   C E N T R U M   N A U K I



**Fundacja na rzecz  
Nauki Polskiej**



# SPIS TREŚCI

STRESZCZENIE .....	9
ABSTRACT .....	11
WYKAZ NAJCZĘŚCIEJ STOSOWANYCH SKRÓTÓW .....	13
1. WPROWADZENIE .....	16
1.1. Substancje o charakterze nagradzającym .....	16
1.1.1. Nagrody naturalne .....	16
1.1.2. Nagrody farmakologiczne .....	18
1.1.3. Kokaina .....	19
1.1.3.A Molekularne mechanizmy działania kokainy .....	20
1.2. Układ nagrody .....	21
1.2.1. Rola dopaminy w przetwarzaniu nagród .....	22
1.2.2. Inne funkcje dopaminy w mózgu .....	22
1.2.3. Układ dopaminergiczny a uzależnienia .....	23
1.2.4. Receptory wrażliwe na dopaminę .....	25
1.3. Ciało migdałowe .....	27
1.3.1. Jądro podstawno-boczne ciała migdałowego .....	29
1.3.1.A Anatomia jądra podstawno-bocznego ciała migdałowego .....	29
1.3.1.B Funkcje jądra podstawno-bocznego ciała migdałowego .....	29
1.3.2. Jądra wtrącone .....	30
1.3.3. Jądro środkowe ciała migdałowego .....	31
1.3.3.A Funkcje jądra środkowego ciała migdałowego .....	31
1.3.3.B Rola części przyśrodkowej i bocznej jądra środkowego ciała migdałowego w mózgu .....	32
1.4. Systemowe spojrzenie na mózg .....	34
1.4.1. Systemy w mózgu przetwarzające informację o kokainie .....	34
1.4.2. Objętościowe metody obrazowania mózgu .....	34
1.4.2.A Optyczne oczyszczanie tkanek .....	35
1.4.2.B Wykorzystanie technik optycznego oczyszczania tkanek w neurobiologii .....	37
1.5. Plastyczność synaptyczna .....	37
1.5.1. Plastyczność synaptyczna a tworzenie śladu pamięciowego .....	38
1.5.2. Mechanizmy plastyczności synaptycznej .....	39
1.5.2.A Strukturalne zmiany towarzyszące plastyczności synaptycznej .....	41
1.5.2.B Zmiany elektrofizjologiczne towarzyszące plastyczności synaptycznej .....	42
1.5.2.C Zmiany ekspresji genów towarzyszące plastyczności synaptycznej .....	44
1.5.3. Nagrody a plastyczność synaptyczna .....	45
1.5.3.A Uzależnienia a plastyczność synaptyczna .....	45
2. CELE PRACY .....	47

3. MATERIAŁY I METODY .....	48
3.1. Odczynniki i leki .....	48
3.2. Mysie modele badawcze .....	51
3.2.1. Linie myszy doświadczalnych stosowane w badaniach .....	51
3.2.2. Ekspozycja myszy na nagrody .....	52
3.2.3. Monitorowanie zachowania zwierząt eksponowanych na nagrody.....	54
3.2.4. Chemogenetyczna manipulacja aktywnością neuronów jądra środkowego ciała migdałowego .....	56
3.3. Pomiary elektrofizjologiczne .....	57
3.3.1. Przygotowanie skrawków do badań elektrofizjologicznych .....	57
3.3.2. Pomiary elektrofizjologiczne.....	57
3.3.2.A Pomiary milczących synaps .....	59
3.3.2.B Pomiary kinetyki prądów zależnych od NMDAR.....	60
3.3.2.C Pomiary spontanicznej aktywności neuronalnej.....	61
3.3.2.D Pomiary długotrwałego osłabienia postsynaptycznego.....	62
3.3.2.E Pomiary pobudliwości komórek .....	62
3.4. Utrwalanie tkanek i ich przygotowanie do dalszej analizy .....	63
3.4.1. Wypełnianie neuronów biocytyną i ich utrwalanie po pomiarach elektrofizjologicznych...63	
3.4.2. Utrwalanie perfuzyjne .....	63
3.4.3. Przygotowanie skrawków mózgowych przy użyciu wibratomu .....	64
3.5. Barwienia immunohistochemiczne skrawków tkanki mózgowej, ich obrazowanie mikroskopowe oraz dalsza analiza.....	64
3.5.1. Analiza rozmieszczenia komórek wrażliwych na dopaminę w CeA.....	64
3.5.1.A Barwienia komórek wrażliwych na dopaminę .....	64
3.5.1.B Obrazowanie komórek wrażliwych na dopaminę w CeA .....	65
3.5.1.C Analiza rozmieszczenia komórek wrażliwych na dopaminę w CeA.....	65
3.5.2. Analiza lokalizacji c-Fos .....	65
3.5.2.A Barwienia białka c-Fos.....	65
3.5.2.B Obrazowanie białka c-Fos .....	66
3.5.2.C Analiza poziomu białka c-Fos .....	67
3.5.3. Analiza poziomu i lokalizacji białka Arc .....	67
3.5.3.A Barwienia białka Arc.....	67
3.5.3.B Obrazowanie białka Arc .....	68
3.5.3.C Analiza poziomu białka Arc .....	68
3.5.4. Analiza obecności podjednostki GluN2b receptora NMDA .....	68
3.5.4.A Barwienia podjednostki GluN2b .....	68
3.5.4.B Obrazowanie podjednostki GluN2b .....	69
3.5.4.C Analiza ilościowa podjednostki GluN2b .....	70

3.5.5. Analiza kolców dendrytycznych .....	70
3.5.5.A Barwienia kolców dendrytycznych .....	70
3.5.5.B Obrazowanie kolców dendrytycznych.....	70
3.5.5.C Analiza liczby kolców dendrytycznych.....	71
3.6. Oczyszczanie mózgow i ich obrazowanie.....	71
3.6.1. Oczyszczanie oraz wybarwienie mózgow techniką iDISCO+ .....	71
3.6.2. Obrazowanie oczyszczonych mózgow .....	72
3.6.3. Formatowanie obrazów oczyszczonych mózgow .....	73
3.6.4. Przyporządkowywanie obrazów do atlasu mózgu i określanie liczby komórek c-Fos-pozytywnych .....	73
3.7. Analiza statystyczna.....	76
3.7.1. Analiza statystyczna danych z eksperymentów behawioralnych .....	76
3.7.2. Analiza statystyczna danych z mikroskopii konfokalnej oraz elektrofizjologii .....	76
3.7.3. Analiza statystyczna danych z mikroskopii arkusza światła .....	77
4. WYNIKI.....	79
4.1. Analiza behawioru zwierząt eksponowanych na nagrody.....	79
4.2. Analiza aktywności mózgow myszy eksponowanych na nagrody.....	81
4.2.1. Analiza struktur w mózgu aktywowanych ekspozycją myszy na nagrody .....	81
4.2.2. Analiza wzoru aktywności mózgowej myszy eksponowanej na nagrody .....	85
4.2.2.A Analiza korelacji aktywności pomiędzy strukturami .....	85
4.2.2.B Analiza modułowości mózgu .....	87
4.2.3. Współczynnik wzrostu aktywności mózgu dla jedno- i kilkukrotnej ekspozycji na nagrody .....	90
4.2.4. Pomiar liczby komórek c-Fos+ w poszczególnych strukturach mózgowych myszy eksponowanych na cukier lub kokainę.....	93
4.3. Analiza zmian plastycznych w środkowym jądrze ciała migdałowatego po ekspozycji zwierzęcia na nagrody .....	102
4.3.1. Analiza ekspresji genów wczesnej odpowiedzi w jądrze środkowym ciała migdałowatego u myszy eksponowanej na nagrody .....	102
4.3.1.A Analiza i lokalizacja komórek c-Fos-pozytywnych .....	102
4.3.1.B Analiza poziomu Arc.....	105
4.3.2. Analiza plastyczności synaptycznej w jądrze środkowym ciała migdałowatego .....	107
4.3.2.A Analiza poziomu milczących synaps w jądrze środkowym ciała migdałowatego .....	107
4.3.2.B Analiza kinetyki prądów zależnych od receptora dla NMDA w jądrze środkowym ciała migdałowatego .....	109
4.3.2.C Analiza obecności podjednostki GluN2B receptora NMDA w jądrze środkowym ciała migdałowatego .....	110
4.3.2.D Analiza spontanicznej aktywności neuronów w jądrze środkowym ciała migdałowatego po ekspozycji zwierzęcia na kokainę .....	113

4.3.2.E Analiza długotrwałego osłabienia postsynaptycznego w bocznej części jądra środkowego ciała migdałowego myszy eksponowanych na kokainę.....	115
4.3.2.F Analiza pobudliwości neuronów jądra środkowego ciała migdałowego u myszy eksponowanych na kokainę.....	116
4.4. Analiza roli środkowego jądra ciała migdałowego w behawioralnej odpowiedzi zwierzęcia na nagrody.....	121
4.4.1. Wpływ manipulacji aktywnością neuronów środkowego jądra ciała migdałowego na odpowiedź zwierzęcia na słodką wodę.....	126
4.4.1.A Wpływ manipulacji aktywnością neuronów środkowego jądra ciała migdałowego na poziom c-Fos w CeA myszy eksponowanych na słodką wodę.....	128
4.4.2. Wpływ manipulacji aktywnością neuronów środkowego jądra ciała migdałowego na odpowiedź zwierzęcia na kokainę .....	129
4.4.2.A Wpływ manipulacji aktywnością neuronów środkowego jądra ciała migdałowego na c-Fos w CeA myszy eksponowanych na kokainę .....	131
4.5. Analiza roli komórek wrażliwych na dopaminę w jądrze środkowym ciała migdałowego w odpowiedzi na nagrody .....	132
4.5.1. Analiza anatomiczna rozmieszczenia receptorów wrażliwych na dopaminę w jądrze środkowym ciała migdałowego .....	133
4.5.2. Analiza poziomu c-Fos w komórkach DRD1- oraz DRD2-pozytywnych u myszy eksponowanych na nagrody naturalne i farmakologiczne.....	135
4.5.3. Analiza aktywności spontanicznej komórek DRD1- oraz DRD2-pozytywnych w CeM myszy eksponowanych na nagrody naturalne lub farmakologiczne.....	138
4.5.3.A Analiza aktywności spontanicznej komórek DRD1- oraz DRD2-pozytywnych w CeM myszy eksponowanych na cukier.....	139
4.5.3.B Analiza aktywności spontanicznej komórek DRD1- oraz DRD2-pozytywnych w CeM myszy eksponowanych na kokainę .....	141
4.5.4. Analiza gęstości kolców dendrytycznych neuronów DRD1- oraz DRD2-pozytywnych myszy eksponowanych na nagrody .....	143
5. DYSKUSJA .....	145
5.1. Badanie efektów behawioralnych ekspozycji na słodką wodę oraz na kokainę .....	145
5.2. Aktywność mózgu myszy po ekspozycji na nagrody .....	146
5.2.1. Wzrost poziomu c-Fos po ekspozycji myszy na nagrody .....	146
5.2.2. Aktywacja rozległych części mózgu w odpowiedzi na nagrody .....	147
5.2.3. Rozproszone kodowanie informacji o nagrodach w mózgu myszy .....	148
5.2.4. Zmieniona modułowość mózgu myszy po ekspozycjach na nagrody.....	149
5.3. Zmiany plastyczne w jądrze środkowym ciała migdałowego po ekspozycji myszy na cukier lub kokainę .....	151
5.3.1. Poziom Arc w neuronach ciała migdałowego myszy eksponowanych na nagrody .....	151
5.3.2. Markery zmian plastycznych w jądrze środkowym ciała migdałowego podczas przetwarzania nagród.....	151
5.4. Manipulowanie aktywnością przyśrodkowej części jądra środkowego ciała migdałowego zmienia odpowiedź myszy na nagrody .....	153

5.5. Neurony DRD1- i DRD2-pozytywne w jądrze środkowym ciała migdałowatego w mózgu myszy .....	156
5.5.1. Rozmieszczenie przestrzenne neuronów DRD1- i DRD2-pozytywnych w jądrze środkowym ciała migdałowatego w mózgu myszy.....	156
5.5.2. Plastyczność neuronów DRD1- i DRD2-pozytywnych w jądrze środkowym ciała migdałowatego .....	157
6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI .....	160
7. BIBLIOGRAFIA .....	163
8. DOROBEK NAUKOWY DOKTORANTA.....	178



## STRESZCZENIE

Odpowiednie reagowanie na bodźce apetytywne w środowisku jest dla zwierząt kluczową umiejętnością, umożliwiającą im przetrwanie i reprodukcję. Niektóre substancje psychoaktywne też wywołują przyjemne doznania, ale ich działanie jest związane z farmakologicznym wpływem na neurony. Stąd wyróżnia się dwa rodzaje bodźców apetytywnych: nagrody naturalne oraz farmakologiczne.

Z nagrodami farmakologicznymi związane jest uzależnienie, u którego podstaw stoją wywołane przez daną substancję zmiany w jakości i liczbie połączeń neuronalnych, zwane zmianami plastycznymi. Procesy plastyczne występują też fizjologicznie w mózgu i są uznawane za molekularną podstawę śladu pamięciowego. Podejrzewa się, że farmakologicznie wywołane zmiany plastyczne występują w rejonach mózgu przetwarzających nagrody naturalne, gdzie kodują patologicznie trwałe wspomnienia o narkotyku.

Stosując dwa mysie modele ekspozycji na nagrody, sprawdziłem czy informacje o nich rzeczywiście przetwarzane są przez te same części mózgu. W przypadku nagrody naturalnej, myszy miały przez dwie godziny dziennie dostęp do słodkiego roztworu sacharozy. Nagrodą farmakologiczną były zastrzyki z roztworu kokainy. Zwierzęta były eksponowane na te nagrody jednokrotnie lub przez siedem kolejnych dni.

By sprawdzić jakie struktury mózgowe angażuje każda z nagród, w całym mózgu sprawdziłem poziom c-Fos, który jest białkiem związanym ze zwiększoną aktywnością neuronalną i plastycznością synaptyczną. Wykorzystując optyczne oczyszczanie tkanek i mikroskopię arkusza światła ustaliłem, że obie nagrody angażowały struktury w rozległych częściach mózgu. Wzór podwyższonej aktywności częściowo pokrywał się ze sobą dla obu nagród, ale w przypadku wielu obszarów był specyficzny tylko dla ekspozycji na kokainę lub cukier. Analizując wzrost poziomu c-Fos po jednokrotnej i kilkukrotnej ekspozycji zwierząt na słodką wodę zauważyłem, że jest on wyższy w przypadku jednokrotnego podania. W przypadku kokainy, efekt ten był odwrotny i po siedmiu dniach podawania narkotyku ponad połowa struktur w mózgu wykazywała zmienioną aktywność.

Przetwarzanie informacji o cukrze i kokainie badałem też na poziomie pojedynczych neuronów w obrębie jądra środkowego ciała migdałowatego (CeA). CeA przetwarza bodźce o znaczeniu emocjonalnym i składa się z dwóch części: przyśrodkowej (CeM) i bocznej (CeL). Technikami elektrofizjologicznymi zbadałem zmiany plastyczne wywołane nagrodami

w obrębie CeA i w CeM zaobserwowałem je u zwierząt zarówno po ekspozycji na cukier, jak i na kokainę. Analiza wykazała, że skutkowały one wzmocnieniem siły synaps dochodzących do CeM. Zmiany plastyczne w CeL dotyczyły tylko zwierząt eksponowanych na kokainę i skutkowały osłabieniem siły synaps tamtejszych neuronów.

Zaangażowanie CeA w przetwarzanie obu typów nagród potwierdziłem poprzez badanie zachowania zwierząt ze zmienioną aktywnością CeM. Stosując metody inżynierii chemogenetycznej zablokowałem motywację zwierząt do picia słodkiej wody oraz opóźniłem wystąpienie niektórych skutków behawioralnych wywołanych przez kokainę.

W CeA odkryłem też populacje wrażliwych na dopaminę neuronów o dwóch typach receptorów: DRD1 oraz DRD2. Określiłem, że neurony w CeL ekspresują tylko DRD2, a w CeM mają na swojej powierzchni albo DRD1 albo DRD2. Okryłem, że kokaina i cukier różnie modulują aktywność tych neuronów w CeM. Kokaina zwiększa spontaniczną aktywność neuronów z receptorami DRD1, a zmniejsza tych z DRD2. Cukier z kolei zwiększa spontaniczną aktywność neuronów z DRD2, a zmniejsza z DRD1.

Podsumowując, wyniki badań wskazują, że informacje o cukrze i o kokainie są różnie przetwarzane w mózgu. Odrębność tych nagród sprawia, że wymagają one scharakteryzowania indywidualnych modeli układu nagrody. Informacje dotyczące cukru i kokainy są także różnorodnie przetwarzane przez neurony CeA, jednak dokładne zrozumienie tych mechanizmów wymaga uwzględnienia roli różnych populacji neuronów.

## ABSTRACT

Appropriate response to appetitive stimuli in the environment is a crucial skill for animals, enabling their survival and reproduction. While some psychoactive substances also induce pleasurable sensations, their actions rely on the pharmacological influence on neurons. Hence, two types of appetitive stimuli are distinguished: natural and pharmacological rewards.

Pharmacological rewards are associated with addiction, and at the core of substance dependence are changes in the quantity and quality of neuronal connections induced by psychoactive substances, known as plastic changes. Plastic changes also occur physiologically in the brain and are considered as the molecular bases of memorizing. It is suspected that the plastic changes induced by pharmacological rewards occur in brain regions that usually process natural rewards, encoding pathologically persistent memories of the drug.

Using two mouse models of reward exposure, I investigated whether information about them is indeed processed by the same brain regions. As natural reward, mice had access to a sweet sucrose solution for two hours daily. As pharmacological reward, mice received intraperitoneal injections of a cocaine saline solution. Animals were exposed to these rewards either once or for seven consecutive days.

To investigate brain structures engaged by these rewards, I examined the level of c-Fos (a protein associated with neuronal activity and synaptic plasticity) throughout the entire brain. Utilizing optical tissue clearing and light sheet microscopy, I found that both rewards engaged structures in extensive brain regions. The pattern of increased activity partially overlapped for both rewards, but in the case of many areas it was specific only to exposure to cocaine or sugar. By analyzing the increase of c-Fos level after single vs. multiple exposures of animals to sweet water, I observed that it was higher after a single administration. In the case of cocaine, these effects were opposite, and after seven days of drug administration, over half of brain structures showed altered activity.

I also examined the processing of information about sugar and cocaine at the level of individual neurons within the central nucleus of the amygdala (CeA). CeA processes emotionally significant stimuli and consists of two parts: medial (CeM) and lateral (CeL). Using electrophysiological techniques, I investigated plastic changes induced by rewards in CeA. I found that both sugar and cocaine induce plastic changes in CeM. Electrophysiological analysis showed that these plastic changes resulted in enhanced synaptic strength reaching

CeM. On the other hand, plastic changes in CeL were observed only in animals exposed to cocaine, and they resulted in a weakening of synaptic strength.

I confirmed the involvement of CeA in processing both rewards by studying the behavior of animals with altered CeM activity. With chemogenetic tools, I blocked the motivation of animals to sweet water and delayed the onset of some behavioral effects induced by cocaine.

I also discovered in CeA a population of dopamine sensitive neurons with two types of receptors: DRD1 and DRD2. I found that neurons in CeL express only DRD2, while in CeM, they have either DRD1 or DRD2 on their surface. I found that cocaine and sugar differently modulate the activity of these neurons in CeM. Cocaine increases the spontaneous activity of neurons with DRD1 and decreases those with DRD2. Sugar, on the other hand, increases the spontaneous activity of neurons with DRD2 and decreases those with DRD1.

In summary, the results of the study indicate that information about sugar and cocaine is processed differently in the brain. The distinct nature of these rewards requires the characterization of individual reward system models. Information about sugar and cocaine is also variably processed by CeA neurons, but a precise understanding of these mechanisms requires consideration of the roles of different neuron populations.

## WYKAZ NAJCZĘŚCIEJ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

*W wykazie umieszczono tylko skróty używane w tekście. Wykaz wszystkich struktur mózgowych znajduje się na rycinie 28.*

AAV – (ang. *adeno-associated viruses*) wektory wyprowadzone z wirusów zależnych od adenowirusów

ACB – (ang. *nucleus accumbens*) jądro pólleżące

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

AHP – (ang. *afterhyperpolarization*) potencjał hiperpolaryzacyjny następczy

AMPA – (ang. *α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor*) receptor dla kwasu α-amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowego

BLA – (ang. *basolateral amygdalar nucleus*) jądro podstawno-boczne ciała migdałowatego

Ca<sup>2+</sup> – (ang. *calcium ions*) jony wapnia

cAMP – (ang. *cyclic adenosine monophosphate*) cykliczny adenozy-3',5'-monofosforan

CC – (ang. *current clamp*) w trybie ustalonego natężenia

CeA – (ang. *central amygdalar nucleus*) jądro środkowe ciała migdałowatego

CeL – (ang. *lateral part of central amygdalar nucleus*) boczne jądro środkowe ciała migdałowatego

CeM – (ang. *medial part of central amygdalar nucleus*) przyśrodkowe jądro środkowe ciała migdałowatego

c-Fos+ – (ang. *c-Fos positive*) c-Fos-pozytywny

CNO – (ang. *clozapine-N-oxide*) N-tlenek klozapiny

CPP – (ang. *conditioned place preference*) test warunkowej preferencji miejsca

Da – (ang. *dopamine*) dopamina

DAT – (ang. *dopamine transporter*) transporter wychwyty zwrotnego dopaminy

DBE – (ang. *dibenzyl ether*) eter dibenzylu

DHPG – (ang. *(S)-3,5-Dihydroxyphenylglycine*) 3,5-dihydroksyfenyloglicyna

DRD1 (ang. *dopamine Receptor D1*) receptor dla dopaminy D1

DRD1+ (ang. *dopamine Receptor D1-positive*) z receptorem dla dopaminy D1

DRD2 (ang. *dopamine Receptor D2*) receptor dla dopaminy D2

DRD2+ (ang. *dopamine Receptor D2-positive*) z receptorem dla dopaminy D2

DRD1-tdTomato/DRD2-GFP – linia myszy będąca skrzyżowaniem genetycznym linii B6.Cg-Tg(Drd1a-tdTomato)6Calak/J i Tg(Drd2-EGFP)S118Gsat/Mmnc

DREADD – (ang. *designer receptor exclusively activated by designer drugs*) zaprojektowany receptor aktywowany wyłącznie przez sztuczny ligand

EPSCs – (ang. *excitatory postsynaptic currents*) postsynaptyczne prądy pobudzające

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

GAD65 – (ang. *glutamic acid decarboxylase 65*) dekarboksylaza kwasu glutaminowego 65 kDa

GAD65-tdTomato – linia myszy TgN(GAD65-tdTomato)

GFP – (ang. *green fluorescent protein*) białko zielonej fluorescencji

GLM – (ang. *generalized linear model*) uogólniony model liniowy

hM4Di – wirus pAAV-hSyn-DIO-hM4D(Gi)-mCherry

hM3Dq – wirus pAAV-hSyn-DIO-hM3D(Gq)-mCherry

iDisco+ – (ang. *immunolabelling-enabled three-dimensional imaging of solvent-cleared organs*) trójwymiarowe obrazowanie narządów oczyszczonych rozpuszczalnikiem z możliwością znakowania immunologicznego

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

IP – (ang. *intraperitoneal*) dootrzewnowy

ITC (ang. *intercalated nuclei*) jądra wtrącone

LTD – (ang. *long term depression*) długotrwałe osłabienie postsynaptyczne

LTP – (ang. *long term potentiation*) długotrwałe wzmocnienie postsynaptyczne

m.c. – (ang. *body weight*) masy ciała

mGluR1 – (ang. *metabotropic glutamate receptor 1*) receptor metabotropowy glutaminianergiczny typu 1

NMDAR – (ang. *N-methyl-D-aspartate receptor*) receptor dla kwasu N-metylo-D-asparaginowego

PAG – (ang. *periaqueductal gray*) istota szara okołowodociągowa

PBS – (ang. *phosphate-buffered saline*) buforowana fosforanem sól fizjologiczna

PFA – (ang. *paraformaldehyde*) paraformaldehyd

SEM – (ang. *standard error of the mean*) błąd standardowy średniej

sEPSCs – (ang. *spontaneous excitatory postsynaptic currents*) spontaniczne pobudzające prądy postsynaptyczne

STDP – (ang. *spike timing-dependent plasticity*) plastyczność synaptyczna zależna od czasowej synchronizacji aktywności neuronalnej

VC – (ang. *voltage clamp*) w trybie ustalonego napięcia

VTA – (ang. *ventral tegmental area*) pole brzuszne nakrywki

### **Wykaz skrótów użytych do określenia badanych grup**

Woda – grupa z dostępem do wody przez cały okres trwania eksperymentu (grupa kontrolna)

Cukier 1 d – grupa z dostępem wody przez 6 kolejnych dni oraz do 2 godz. dostępu do roztworu sacharozy w trakcie siódmego dnia eksperymentu

Cukier 7 d – grupa z dostępem do roztworu sacharozy przez 2 godz. dziennie przez 7 kolejnych dni

Sól – grupa otrzymująca zastrzyki z soli fizjologicznej przez cały okres trwania eksperymentu (grupa kontrolna)

Kokaina 1 d – grupa otrzymująca zastrzyki z soli fizjologicznej przez 6 kolejnych dni oraz dostająca jeden zastrzyk z roztworu kokainy w trakcie siódmego dnia eksperymentu

Kokaina 7 d – grupa otrzymująca zastrzyki z roztworu kokainy przez 7 kolejnych dni

# 1. WPROWADZENIE

## 1.1. Substancje o charakterze nagradzającym

Dziko żyjące zwierzęta funkcjonują w skomplikowanym środowisku, w którym odbierają różnorodne bodźce. Interpretacja tych bodźców jest kluczową umiejętnością umożliwiającą im przetrwanie i posiadanie potomstwa, a więc maksymalizującą ich sukces ewolucyjny. Bodźce te można ogólnie podzielić na dwa rodzaje – awersyjne (o znaczeniu negatywnym, kary), których zwierzęta starają się unikać oraz bodźce apetytywne (o znaczeniu pozytywnym, nagrody), do których dążą. Reakcje na bodźce apetytywne i awersyjne nazywane są zachowaniami motywacyjnymi i można je zaklasyfikować do dwóch głównych kategorii: szukania przyjemności oraz unikania cierpienia. Niektóre substancje zmieniające postrzeganie świata, zwane substancjami psychoaktywnymi również wywołują przyjemne doznania, ale motywacja do ich pozyskania może prowadzić do katastrofalnych skutków. Poznanie komórkowych i molekularnych mechanizmów będących podłożem zróżnicowanej odpowiedzi na oba rodzaje bodźców stanowi wielkie wyzwanie poznawcze o potencjalnym istotnym znaczeniu klinicznym. Dlatego też, w mojej pracy badałem dwa rodzaje bodźców apetytywnych: nagrody naturalne oraz farmakologiczne.

### 1.1.1. Nagrody naturalne

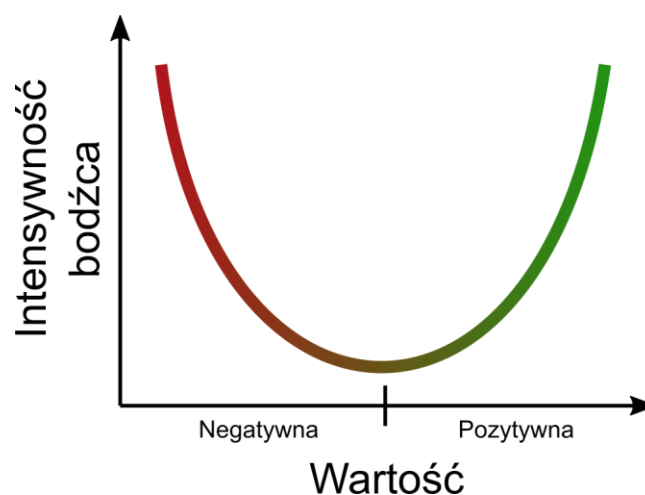
Do nagród naturalnych można zaliczyć m.in. pokarm, napoje oraz kontakty seksualne. Bodźce te nazywane są nagrodami kluczowymi, ponieważ są niezbędne do przeżycia osobnika i do przekazania przez niego genów potomstwu. Dla odróżnienia, przykładami nagród naturalnych niebędącymi kluczowymi mogą być kontakty społeczne oraz zabawa. W kontekście odbierania bodźców apetytywnych, istotnym jest to jak silne emocje one wywołują, czyli jaką mają wartość. Według dwuwymiarowej teorii emocji zaproponowanej w Lang PJ *Am Psychol* 1995, nagrody wywołują pozytywny stan emocjonalny, który jest przeciwstawny do negatywnych doświadczeń związanych z karami (Ryc. 1) <sup>1</sup>. Posiadają one



również skalowalną wartość, co wyrażane jest przez intensywność pozytywnych odczuć, jakie wzbudzają <sup>1,2</sup>.

Wartość nagród naturalnych jest ściśle związana z obecnym stanem behawioralnym zwierzęcia (ang. *behavioral state*) i może ona ulegać zmianom w czasie. Jednym z przykładów może być zwykła woda, która w przypadku spragnionego zwierzęcia jest nagrodą, i to tym większą, im większa jest jej objętość <sup>3</sup>. Po zaspokojeniu pragnienia zwierzę traci swoje zainteresowanie wodą. Wartość nagród naturalnych może wynikać również z ewolucyjnego przystosowania zwierzęcia do odczuwania niektórych smaków jako przyjemnych. Przykładem może być smak słodki, który w naturze oznacza zazwyczaj obecność wysokokalorycznych cukrów prostych. Również w przypadku tej nagrody zaobserwowano skalowalność, która zwiększa się wraz ze wzrostem stężenia cukrów <sup>4</sup>.

Cukry, w tym sacharoza są substancjami o słodkim smaku wykrywanymi przez receptory na języku, które przewodzą sygnał dalej do mózgu, m.in. do kory wyspy. Warto jednak zauważyć, że zmysł smaku nie jest jednak jedynym, który warunkuje nagradzające efekty pożywienia. Myszy mające upośledzoną ekspresję genów kodujących receptory dla słodkiego smaku (*trpm5(-/-)*) również wykazują preferencję do roztworu cukru, która jest jednak odwleczona w czasie <sup>5</sup>. Rozpoznanie cukru opiera się u nich poprzez chemoreceptory obecne w jelicie podczas procesu trawienia. Informacja o kalorycznym pożywieniu trafia wtedy poprzez nerw błędny do jądra pasma samotnego w mózgu <sup>6</sup>.



**Ryc. 1: Relacja pomiędzy wartością emocjonalną bodźców a ich intensywnością.** Nagrody (kolor zielony) są bodźcami o pozytywnej wartości i leżą w opozycji do kar, które mają wartość negatywną (kolor czerwony). W prostym ujęciu, zarówno nagrody, jak i kary są skalowalne wraz z ich intensywnością. Wykres powstał na podstawie ryciny 2 w Tye K., *Neuron*, (2018).

### 1.1.2. Nagrody farmakologiczne

Nagrodami farmakologicznymi nazywamy substancje chemiczne modyfikujące aktywność neuronalną i wywołujące stany psychoaktywne, tj. zmieniające funkcjonowanie mózgu i percepcję świata. Spożycie tych substancji często wywołuje odczucie przyjemności, dlatego zaliczane są do bodźców apetytywnych. W ich skład wchodzi różne cząsteczki chemiczne, które wpływają na fizjologię neuronów poprzez różne mechanizmy molekularne, np. poprzez łączenie się z różnymi receptorami na ich powierzchni lub zmieniającymi stężenie i dostępność neuroprzekaźników w mózgu.

Substancje psychoaktywne można podzielić na cztery główne typy: stymulanty, empatogeny, depresanty oraz psychodeliki <sup>7</sup>. Podział ten opiera się na subiektywnych odczuciach ludzi poddanych ich działaniu, ale zauważono, że w przypadku zwierząt wywołują one często bardzo podobne skutki behawioralne. Głównym działaniem stymulantów, do których zaliczana jest np. kokaina i amfetamina, jest pobudzenie ruchowe oraz wzrost energii do działania. Empatogeny (np. 3,4-metylenodioksymetamfetamina, MDMA) działają podobnie do stymulantów, ale oprócz tego silnie zwiększają chęć kontaktów międzyludzkich. Depresanty, takie jak morfina, działają uspokajająco i wykazują działanie przeciwlękowe. Ostatnią grupą są psychodeliki, które zaburzają percepcję oraz modyfikują odczucia emocjonalne. Do tej grupy zalicza się m.in. psylocybinę i ketaminę <sup>7</sup>.

Należy podkreślić, że nie każda substancja o działaniu psychoaktywnym może być nazwana nagrodą. To, czy może być ona do nich zaklasyfikowana zależy od tego, czy wykazuje właściwości nagradzające, czyli od tego czy motywuje zwierzę do jej pozyskania <sup>8</sup>. Jednym ze sposobów eksperymentalnej weryfikacji własności nagradzających danej substancji jest test warunkowej preferencji miejsca (ang: *conditioned place preference test*; CPP). W teście tym, zwierzę umieszcza się w klatce o dwóch różnie wyglądających kompartymentach. Następnie, podczas kolejnych dni, w jednym z tych kompartymentów podawana jest mu badana substancja. Po kilku dniach takiej ekspozycji sprawdza się, czy zwierzę spędza więcej czasu w miejscu skojarzonym z jej otrzymaniem <sup>9</sup>. Innym testem badającym własności nagradzające jest umożliwienie zwierzęciu samo-podawania sobie narkotyku. Podczas takiego eksperymentu, zwierzę musi zazwyczaj wykonać jakąś czynność, np. wcisnąć guzik, który aktywuje pompę włączającą do jego krwiobiegu badaną substancję <sup>10</sup>.

Badania na myszach pokazały, że efekty nagradzające substancji psychoaktywnych w dużej mierze zależą od warunków eksperymentalnych jej podawania, m.in. od stężenia badanej substancji. Na przykład, w przypadku alkoholu i kokainy wykazano ich nagradzające

właściwości w niższych dawkach. W stężeniach wyższych zaczynają one być dla zwierzęcia bodźcami awersyjnymi i unikają ich samo-podawania<sup>11,12</sup>. Niższe dawki psychostymulantów, które mogą być dawkami nagradzającymi, wykazują u gryzoni również efekt uwrażliwiania (sensytyzacji). Sensytyzacja w tym przypadku oznacza, że z każdym dniem ekspozycji na kokainę, obserwuje się coraz to większe wywołane przez nią efekty behawioralne<sup>13,14</sup>.

W przypadku kokainy podawanej myszom zaobserwowano również zmianę jej wartości w czasie trwania jej efektów, co wykazano testem CPP. Gdy zwierzę dostawało zastrzyk kokainy tuż przed włożeniem go do aparatu behawioralnego, w przyszłości chętniej odwiedzało kompartyment skojarzony z podaniem narkotyku. Jeśli jednak mysz została włożona do takiego kompartymentu później, ok. 15 min od rozpoczęcia działania narkotyku, to w przyszłości go unikała<sup>15</sup>. Szczególnie skomplikowane własności nagradzające obserwuje się w przypadku psychodelików np. ketaminy. W testach CPP, w zależności od warunków eksperymentalnych, może ona wykazywać właściwości apetytywne, awersyjne lub też pozostawać bez efektów na zachowanie zwierzęcia<sup>16</sup>. Te i podobne obserwacje sugerują, że substancje psychoaktywne są bodźcami o nieoczywistej wartości i wywoływane przez nie efekty są zazwyczaj mieszaniną uczuć pozytywnych i negatywnych. To, który efekt będzie przeważający zależy m.in. od stężenia substancji oraz od czasu jaki minął od jej podania<sup>17</sup>.

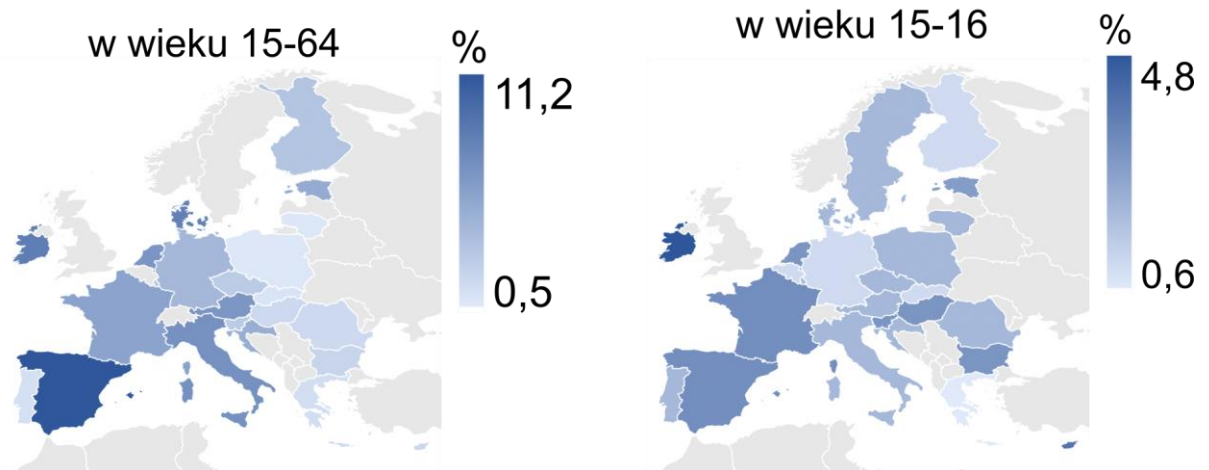
### 1.1.3. Kokaina

Kokaina (metylobenzoiloeckgonina) jest substancją pochodzenia roślinnego pozyskiwaną poprzez ekstrakcję z liści krasnodrzewu pospolitego (*Erythroxylon coca*), który jest rośliną krzewiastą dziko rosnącą w górach Ameryki Północnej<sup>18</sup>. Zaliczana jest do stymulantów i podobnie do innych substancji z tej grupy wywołuje u ludzi pobudzenie ruchowe, zwiększenie czujności, poczucia szczęścia i energii oraz pobudzenie seksualne<sup>7</sup>. Kokaina jest używką popularną na całym świecie, która najczęściej zażywana jest poprzez jej wążanie. Szacuje się, że około 5% obywateli Unii Europejskiej spróbowało kokainy chociaż raz w życiu (Ryc. 2)<sup>19</sup>. Jednocześnie, obserwuje się tendencję wzrostową liczby jej użytkowników i liczby osób zgłaszających się do leczenia z uzależnienia od niej. W Polsce kokaina jest używką stosunkowo mało popularną i w ankiecie z 2020 r. tylko 0,5% osób w wieku 15-34 lat przyznało się do jej używania (Ryc. 2)<sup>19</sup>.

Skutki działania kokainy często badane są na gryzoniach, które poddane jej działaniu wykazują pobudzenie objawiające się m.in. podwyższoną aktywnością lokomotoryczną.

Ponadto, obserwuje się u nich zwiększenie zdolności fizycznych – mogą one np. biegać z większą prędkością i efekt ten jest skalowalny wraz ze stężeniem podanej kokainy. Kokaina zmienia również wzorzec zachowań zwierzęcia w obliczu zagrożenia i myszy poddane jej działaniu są bardziej skore do walki lub ucieczki niż do pozostania w bezruchu (ang. *freezing*), gdy drapieżnik jest w pobliżu <sup>20</sup>.

## % osób zażywających kokainę chociaż raz w życiu



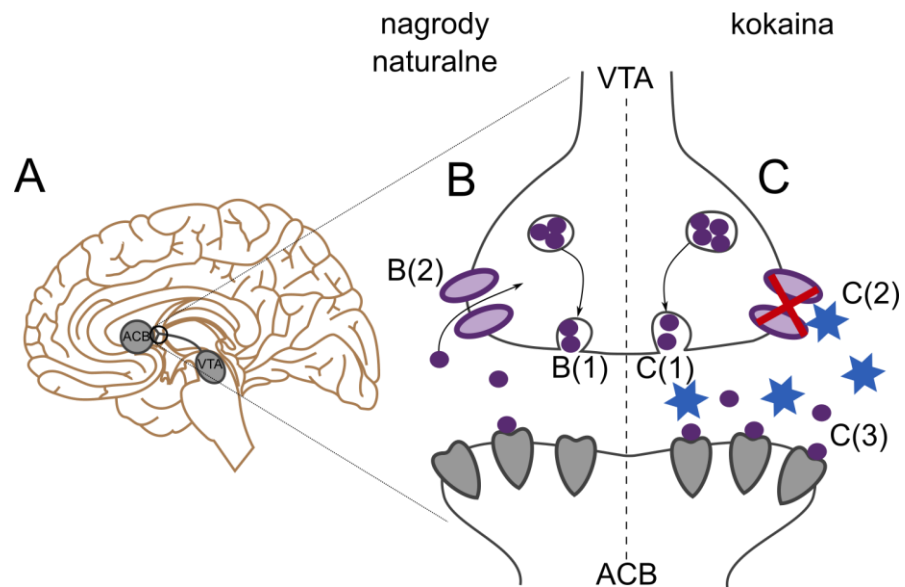
**Ryc. 2: Używanie kokainy w Unii Europejskiej.** Mapy Europy z szacunkowymi wskaźnikami używania kokainy wśród populacji w różnym przedziale wiekowym. W Polsce, jak i większości krajów byłego bloku wschodniego obserwuje się więcej użytkowników kokainy wśród uczniów w porównaniu do ogółu populacji.

Mapy wykonano na podstawie Europejskiego raportu narkotykowego <sup>19</sup>. Brak danych dla 15-64 dla Belgii oraz Szwecji na mapie. Grupa dorosłych była różna dla niektórych krajów: 18-64 dla Francji, Niemiec, Grecji, Węgier; 18-65 dla Danii i Estonii. Dla grupy 15-16 dane dla Belgii są tylko z Flandrii, a Niemiec tylko z Bawarii.

### 1.1.3.A Molekularne mechanizmy działania kokainy

Głównym molekularnym mechanizmem działania kokainy jest niekompetycyjne blokowanie transporterów wychwyty zwrotnego dla trzech monoamin: dopaminy (Da), noradrenaliny i serotoniny. Transportery te zlokalizowane są na błonie części presynaptycznej neuronu i regulują poziom tych monoamin w szczelinie synaptycznej, czyli połączeniu pomiędzy neuronami. Kokaina łącząc się z nimi blokuje proces wychwyty zwrotnego Da, serotoniny i noradrenaliny, co skutkuje tym, że są one dłużej dostępne dla receptorów zlokalizowanych w błonie postsynaptycznej (Ryc. 3) <sup>7,18</sup>.

Oprócz blokowania transportera wychwyty zwrotnego dla dopaminy (DAT), kokaina wywołuje również jego autofagocytę, czyli kontrolowany rozkład białka. Proces ten rozpoczyna się już kilkanaście minut po ekspozycji neuronu na nawet niskie dawki kokainy i również skutkuje zwiększeniem dostępności Da dla receptorów w szczeliny synaptycznej<sup>21</sup>.



**Ryc. 3: Porównanie wpływu nagród naturalnych i kokainy na dostępność dopaminy w szczeliny synaptycznej.** A) Jednym z miejsc w mózgu, gdzie produkowana jest Da jest pole brzuszne nakrywki (VTA), które wydziela ją m.in. do jądra półleżącego (ACB). B, C) Zarówno nagrody naturalne, jak i kokaina promują wydzielanie Da do szczeliny synaptycznej (B(1), C(1)). W przypadku nagród naturalnych, wzrost poziomu Da jest przejściowy i zostaje ona usunięta ze szczeliny poprzez DAT (B(2)). Obecna w szczeliny synaptycznej kokaina blokuje DAT, który staje się niefunkcjonalny, a Da jest dłużej i w większym stężeniu dostępna dla receptorów na neuronach ACB (C(3)).

## 1.2. Układ nagrody

Układem nagrody zwykle się nazywać kilka struktur w mózgu, które wspólnie biorą udział w ocenianiu bodźców apetytywnych, pośredniczeniu w odczuwaniu przyjemności oraz wywoływaniu motywacji do pozyskania nagród. Do tego układu zazwyczaj zaliczany jest hipokamp, ciało migdałowe, prążkowie (w tym jądro półleżące, ACB) oraz kora przedczołowa, czyli struktury otrzymujące silne projekcje dopaminergiczne z pola brzuszego nakrywki (VTA)<sup>22,23</sup>.

### 1.2.1. Rola dopaminy w przetwarzaniu nagród

Da uwalniana z neuronów VTA jest podstawą do prawidłowego oceniania różnych bodźców apetytywnych i odpowiada za efekty nagradzające związane z dostarczeniem nagród<sup>23</sup>. Aktywność VTA jest również kluczowa do wywoływania zachowań motywacyjnych u zwierząt. Gryzoni mogące elektrycznie samo-pobudzać u siebie tę strukturę chętnie to robią, co świadczy o nagradzających efektach takiej stymulacji<sup>24</sup>.

Podczas ekspozycji zwierzęcia na nagrody naturalne obserwuje się zwiększoną aktywność neuronów dopaminergicznych w VTA (Ryc. 4A)<sup>25,26</sup>. Zauważono jednak, że ta zwiększona aktywność jest skutkiem głównie nowych nagród, tj. takich, których zwierzę nie spodziewało się otrzymać<sup>27</sup>. Ilość uwalnianej wtedy Da koreluje z wielkością nagrody, co świadczy o pośrednim kodowaniu informacji o bodźcu apetytywnym przez neurony VTA<sup>28</sup>. W przypadku kilkukrotnej prezentacji zwierzęciu tej samej nagrody, aktywność neuronów dopaminergicznych ulega habituacji i maleje wraz z każdym jej kolejnym podaniem. Jeśli jednak taką prezentację nagrody skojarzy się z poprzedzającym go bodźcem warunkowym, to obserwuje się stopniowe przesunięcie zwiększonej aktywności VTA z prezentacji bodźca bezwarunkowego na warunkowy<sup>23,27</sup>. Innymi słowy, uwalnianie Da zacznie następować nie podczas otrzymania samej nagrody, ale już wcześniej — podczas prezentacji bodźca z nią skojarzonego. Wtedy też, w przypadku, gdy oczekiwana przez zwierzę nagroda nie zostanie dostarczona po uprzedniej prezentacji bodźca warunkowego, aktywność neuronów VTA spada poniżej ich bazowej aktywności spontanicznej. Jeśli z kolei wartość dostarczonej nagrody będzie większa od tej oczekiwanej, to nastąpi kolejne uwolnienie Da<sup>27</sup>. Obserwacje te doprowadziły do stworzenia hipotezy, że neurony dopaminergiczne w VTA nieustannie oceniają różnicę pomiędzy oczekiwaną i otrzymaną nagrodą, co nazywane jest błędem przewidywania nagrody (ang. *reward prediction error*)<sup>23,27</sup>.

### 1.2.2. Inne funkcje dopaminy w mózgu

Kolejną dobrze poznaną funkcją Da u ssaków jest regulacja funkcji ruchowych. Funkcję tę zazwyczaj wiąże się z nigrostriatalnym szlakiem dopaminergicznym, czyli połączeniami neuronalnymi pomiędzy istotą czarną a jądrem ogoniastym i skorupą. Zaburzenia tego szlaku obserwuje się np. w chorobie Parkinsona, która skutkuje znacznym upośledzeniem lokomotoryki<sup>29</sup>.

Rozwój nowych technik eksperymentalnych w ostatnich latach pozwolił na znaczne uzupełnienie wiedzy o roli Da w mózgu. Przede wszystkim, udoskonalono metody pozwalające z dużą dokładnością czasową i przestrzenną badać jej wyrzuty w różnych częściach mózgu, takie jak woltamperometria czy obrazowanie fluorescencyjnych sensorów Da (np. dLight, GRAB)<sup>26, 27</sup>. Dzięki nim odkryto m.in., że w kontroli lokomotoryki ważną rolę ma też Da uwalniana do prążkowiec z VTA. Jej fluktuacje regulują spontaniczność zachowań zwierzęcia, a nagłe wyrzuty poprzedzają rozpoczęcie eksploracji terytorium<sup>32</sup>. Ponadto, odkryto, że wyrzuty Da w ACB towarzyszą nie tylko nagrodzie, ale również innym nieoczekiwanym przez zwierzę bodźcom. Podobnie jak w przypadku nagród, kilkukrotna prezentacja takiego bodźca skutkuje habituacją zarówno wyrzutów Da, jak i zachowań zwierzęcia, które przestaje na niego reagować. Ponadto, wyrzuty Da towarzyszą przyszłej asocjacji bodźca warunkowego z bezwarunkowym i ich zablokowanie upośledza proces uczenia (również awersyjnego)<sup>33</sup>.

Te i podobne obserwacje skomplikowały nieco obraz funkcji Da w mózgu jednak ogólnie podsumowując wiedzę na jej temat można stwierdzić, że jest ona uwalniana do różnych, niemal wszystkich części mózgu w odpowiedzi na prezentację nowych bodźców. Moduluje ona procesy uczenia się, ale jest też odpowiedzialna za modyfikacje wzorców ruchowych.

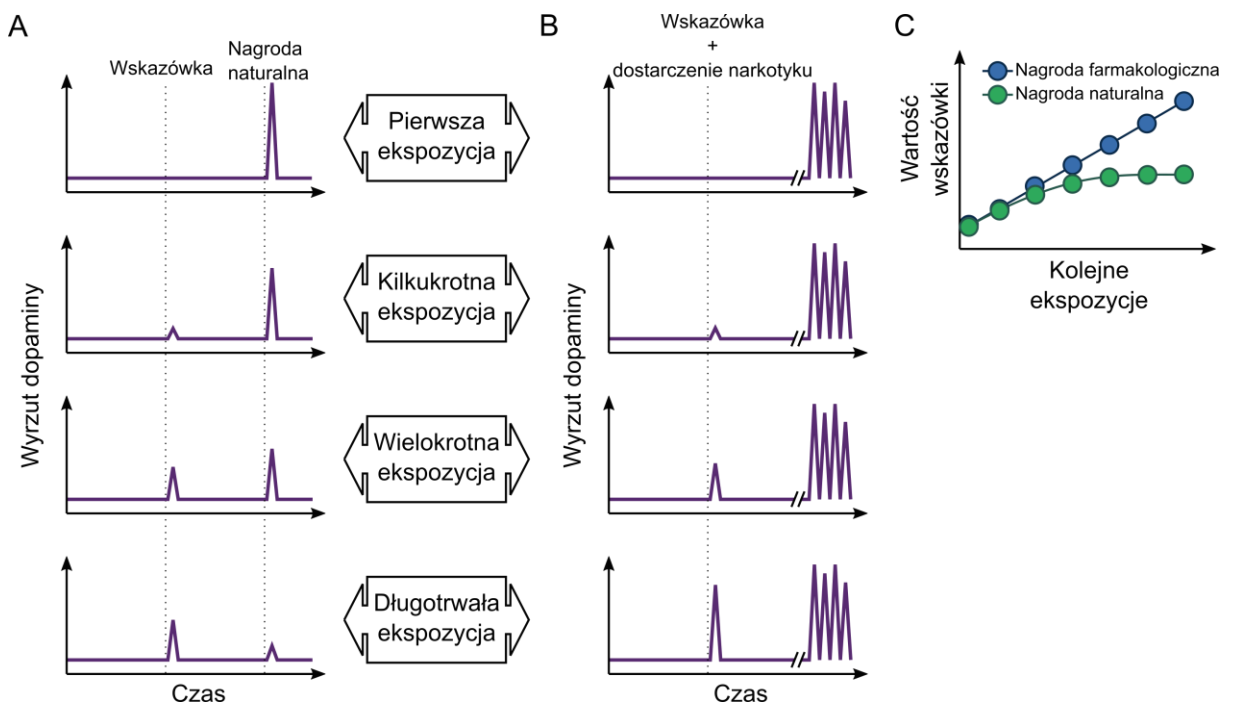
### **1.2.3. Układ dopaminergiczny a uzależnienia**

Niezależnie od wątpliwości odnośnie wszystkich funkcji Da, niezachwiana pozostaje istotność sprawnego działania układu dopaminergicznego w perspektywie zaburzeń i chorób mózgu, takich jak zespół nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi (ADHD) czy choroba Parkinsona<sup>29</sup>. Zmiany w obrębie układu dopaminergicznego są również kluczowe do powstawania uzależnień od substancji psychoaktywnych, czyli kompulsywnych jej poszukiwaniach oraz używaniu pomimo negatywnych konsekwencji takiego działania<sup>8</sup>.

Wszystkie substancje farmakologiczne wykazujące właściwości nagradzające dla zwierzęcia i posiadające charakter uzależniający wywołują wyrzuty Da w mózgu<sup>34-36</sup>. Co ciekawe, uwalnianie Da na skutek ekspozycji na psychostymulanty nie ulega zmniejszeniu wraz z kolejnymi ich podaniami (jak to ma miejsce w przypadku nagród naturalnych; Ryc. 4B)<sup>37</sup>. Związane jest to z ich bezpośrednim działaniem na neurony i doprowadziło do stworzenia koncepcji nagród farmakologicznych, które są zawsze lepsze od oczekiwanych (Ryc. 4C)<sup>38</sup>.

Upośledzenie układu dopaminergicznego np. przez uszkodzenia neuronów VTA powoduje zmniejszenie samo-podawania kokainy u szczurów<sup>39</sup>. Ponadto, myszy z genetycznie zmniejszoną liczbą DAT nie wykazują zwiększonej aktywności lokomotorycznej po ekspozycji na kokainę<sup>40</sup>. Podobnie zaburzenie autofagocytozy DAT blokuje własności nagradzające tego stymulanta<sup>21</sup>.

Wydaje się więc, że zdolność substancji psychoaktywnej do wpływania na układ dopaminergiczny jest warunkiem koniecznym do powstania uzależnienia. Dlatego też struktury otrzymujące projekcje dopaminergiczne, zwłaszcza z VTA, stały się głównymi regionami, gdzie badano efekty działania substancji o potencjale uzależniającym<sup>5,32</sup>. Jednocześnie warto zaznaczyć, że substancje psychoaktywne których mechanizm działania opiera się na innych niż dopaminergiczny układach w mózgu (np. niektóre psychodeliki wpływające na układ serotonergiczny), wydają się nie wykazywać właściwości uzależniających<sup>7</sup>.



**Ryc. 4: Poglądowe porównanie wpływu ekspozycji na nagrody naturalne i farmakologiczne na wyrzuty dopaminy w mózgu. A)** Nagrody naturalne początkowo powodują wyrzut dopaminy (Da) w mózgu szybko po jej ekspozycji. W przypadku kilkukrotnej ekspozycji zwierzęcia na nagrodę oraz sparowaniu jej ze wskazówką (bodźcem warunkowym) obserwuje się, że wyrzuty te następują wcześniej, już podczas ekspozycji zwierzęcia na wskazówkę. **B)** Narkotyk powoduje odwleczone w czasie wyrzuty Da. Farmakologiczne działanie tych nagród powoduje, że wyrzuty Da nie zmniejszają się tak bardzo jak w przypadku nagród naturalnych. Jednocześnie, przy sparowaniu dostarczenia narkotyku ze wskazówką, obserwuje się też natychmiastowy wzrost Da już podczas pokazania wskazówki. **C)** Wyrzuty



Da podczas ekspozycji zwierzęcia na wskazówkę dotyczącą nagrody naturalnej szybko osiągają plateau. W przypadku nagród farmakologicznych, wskazówki te po dłuższym czasie mają dużo większą wartość. Wykres powstał na podstawie figury 4 w Keiflin R. i Janak PH., *Neuron*, (2018).

#### 1.2.4. Receptory wrażliwe na dopaminę

W mózgu ssaków wyróżnia się pięć receptorów wrażliwych na Da. Wszystkie z nich są receptorami metabotropowymi, a ich nazwy oznaczone są cyframi od 1 do 5: DRD1 (ang. *dopamine receptor D1*), DRD2, DRD3, DRD4 i DRD5. Na podstawie funkcji białek G, z jakimi się łączą oraz efektów, jakie wywołują na aktywność komórki, można podzielić je na dwie grupy. Pierwszą grupę stanowią sprzężone z białkiem  $G_{s/olf}$  receptory typu D1, w skład których wchodzi DRD1 oraz DRD5. Drugą grupę stanowią sprzężone z białkiem  $G_{i/o}$  receptory typu D2: DRD2, DRD3 i DRD4 <sup>29</sup>.

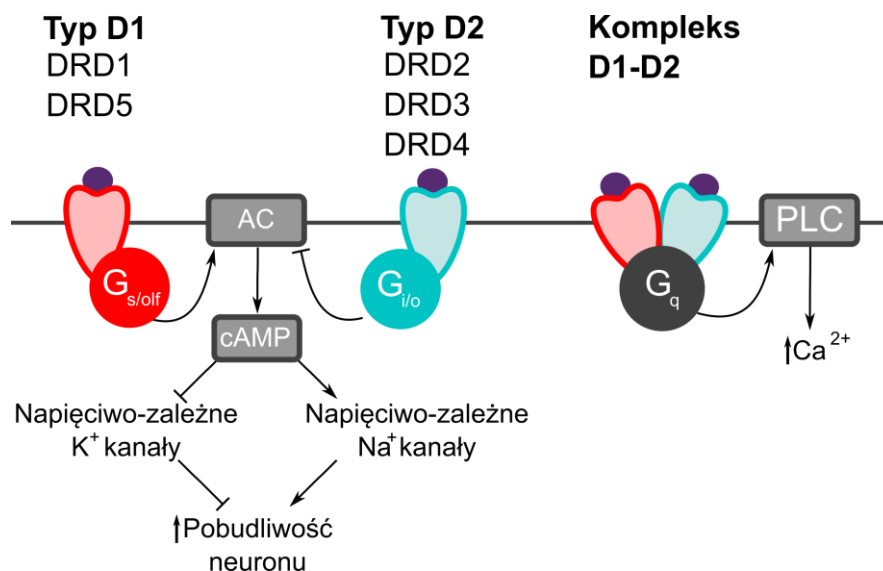
Aktywacja tych dwóch typów receptorów w części postsynaptycznej aktywuje różne szlaki sygnałowe, które mają przeciwstawne skutki dla fizjologii komórki nerwowej (Ryc. 5). Przede wszystkim, aktywacja receptorów typu D1 zwiększa syntezę cyklicznego adenozylo-3',5'-monofosforanu (cAMP), a pobudzenie receptorów typu D2 hamuje ją <sup>29</sup>. Szlak cAMP, działając poprzez białkową kinazę A (PKA) oraz kinazę regulowaną sygnałem zewnątrzkomórkowym (ERK), pośredniczy w wielu procesach komórkowych, m.in. wpływając na przepustowość napięciowo-zależnych kanałów sodowych reguluje pobudliwość komórki nerwowej. Ponadto, wpływa na napięciowo-zależne kanały potasowe KCNQ oraz kanały potasowe zależne od białka G (GIRK) <sup>29,41,42</sup>. Regulując prawdopodobieństwo otwarcia tych kanałów zmniejszają lub zwiększają zależny od wypływu potasu potencjał hiperpolaryzacyjny następczy (AHP) <sup>42</sup>. Podsumowując, receptory typu D1 zwiększają pobudliwość neuronów, a typu D2 zmniejszają ją. Ponadto, receptory typu D2 mogą być zlokalizowane w części presynaptycznej neuronu, gdzie ich aktywacja hamuje uwalnianie neurotransmiterów <sup>29</sup>. Receptory typu D1 i D2 czasem mogą tworzyć kompleksy D1-D2, które poprzez białko  $G_q$  prowadzą do cięcia fosfolipazy C (PLC) i uwalniania  $Ca^{2+}$  z wewnątrzkomórkowych magazynów wapnia <sup>43</sup>.

Spośród 5 receptorów dla Da, najlepiej poznanymi zostały DRD1 oraz DRD2. Do zrozumienia roli tych receptorów przyczyniły się dobrze scharakteryzowane zwierzęce modele badawcze, w szczególności mysie linie posiadające białka fluorescencyjne lub rekombinazę Cre w neuronach z ekspresją *drd1* oraz *drd2* <sup>44</sup>. DRD1 oraz DRD2 występują powszechnie

w ośrodkowym układzie nerwowym gryzoni i w przypadku niektórych struktur, np. ACB, niemal wszystkie neurony posiadają któryś z tych receptorów. Zazwyczaj obserwuje się podobną liczbę komórek mających na swojej powierzchni DRD1 lub DRD2, a komórki z oboma receptorami stanowią rzadkość i dotyczą niewielkich obszarów mózgu, np. brzusznej części ciała prążkowanego<sup>45</sup>. Podobnie, obecność tylko jednego z tych receptorów w obrębie jednego regionu jest rzadko spotykana i takimi strukturami są np. przyśrodkowa część ciała prążkowanego posiadająca tylko DRD2 oraz jądra wtrącone (ang. *intercalated nuclei*; ITC) z DRD1<sup>40,41</sup>.

Wspomniane mysie linie z genem białka Cre pod promotorami *drd1* oraz *drd2* (DRD1-Cre i DRD2-Cre) w połączeniu z technikami manipulacji aktywnością neuronów przy użyciu opto- lub chemogenetyki umożliwiły specyficzną manipulację aktywnością dopaminosensytywnych komórek. W kombinacji z obrazowaniem genetycznie kodowanych fluorescencyjnych znaczników wapnia pozwoliły też na obserwację aktywności komórek DRD1- i DRD2-pozytywnych (DRD1+, DRD2+) podczas różnych zachowań zwierząt<sup>44</sup>. Rola DRD1 i DRD2 została najlepiej poznana w ACB, gdzie była szczegółowo badana m.in. w kontekście ekspozycji myszy na kokainę<sup>42,43</sup>. W ACB kokaina moduluje aktywność obu typów tych komórek, ale jej efekty na nie są różne: neurony z DRD1 zwiększają swoją aktywność, a z DRD2 zmniejszają ją. Ponadto, neurony DRD1+ są aktywne podczas poszukiwania narkotyku, a DRD2+ biorą udział głównie w wygaszaniu procesów motywacyjnych związanych z jego poszukiwaniem<sup>47</sup>.

Pozostałe receptory dla Da są znacznie rzadziej badane, ale niektóre z ich unikatowych własności sugerują, że mogą mieć istotne funkcje w mózgu. DRD3 są dość mało liczne w mózgu gryzoni i znajdują się głównie w obszarze powłoki ACB i w guzkach węchowych. Badania nad tymi receptorami są dość utrudnione, ponieważ często kolokalizują z DRD2. DRD3 mają jednak od nich wyższe powinowactwo dla Da, a ich rozróżnienie możliwe jest za sprawą kilku specyficznych agonistów DRD3<sup>49,50</sup>. DRD4 obecne są głównie w części postsynaptycznej neuronów prążkowania i mają najwyższe powinowactwo dla Da ze wszystkich receptorów dopaminosensytywnych. Ich unikatową cechą jest wrażliwość na noradrenalinę. Ponadto, neurony DRD4+ mają wysokie powinowactwo dla leku klozapiny, co może świadczyć o ich ważnej roli w pośredniczeniu efektów niektórych substancji antypsychotycznych<sup>51</sup>. Ostatni z listy receptorów, DRD5, zlokalizowany jest głównie w korze przedczołowej. Brak jest selektywnych agonistów dla tego receptora, ale wiadomo, że ma większe powinowactwo dla Da od DRD1<sup>52</sup>.

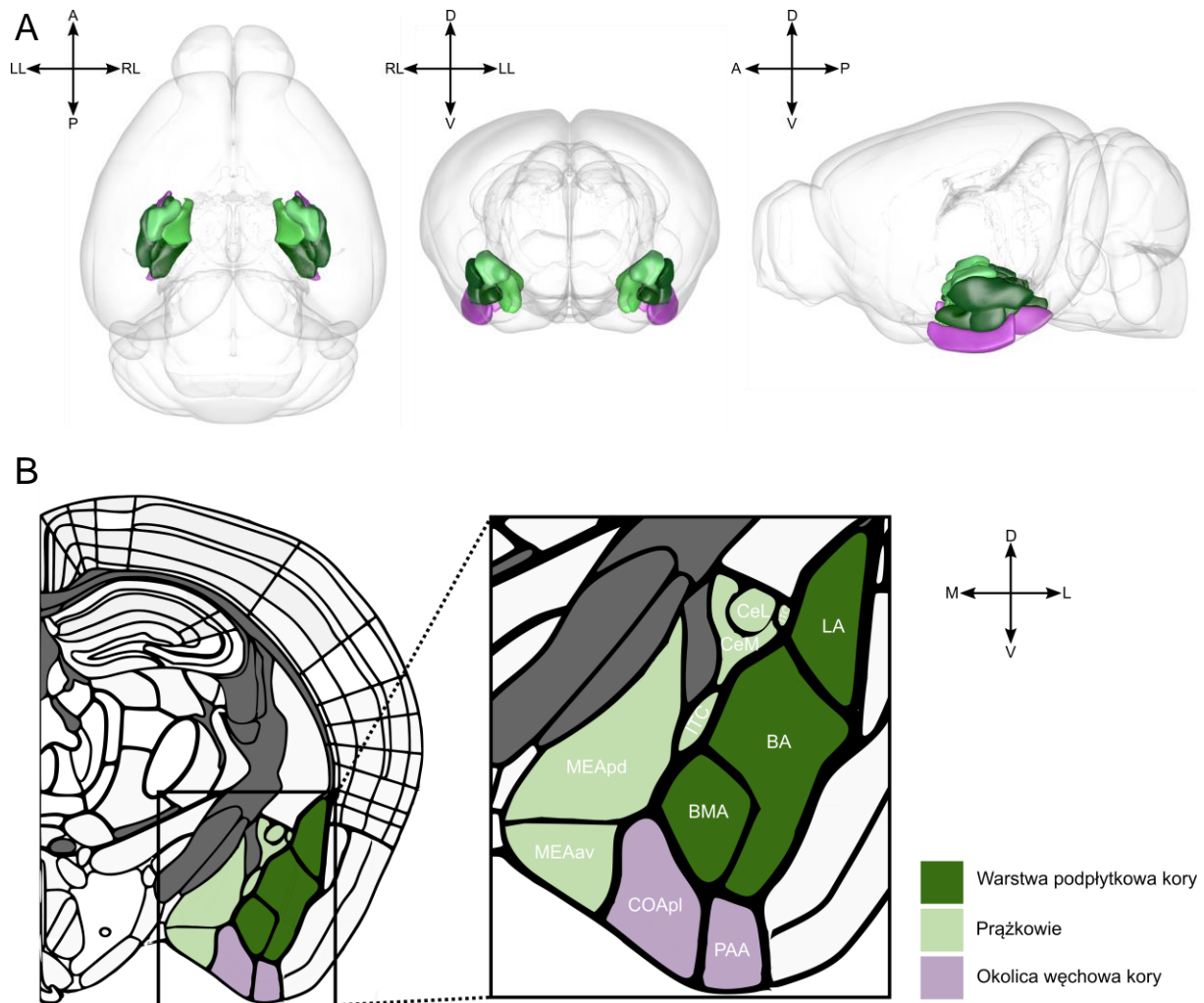


**Ryc. 5: Receptory dopaminowe w mózgu.** Receptory typu D1 zwiększają poziom cAMP, a typu D2 zmniejszają go. cAMP zwiększając przewodność kanałów sodowych i zmniejszając potasowych moduluje pobudliwość neuronu. Kompleksy heterodimerowe D1-D2 zwiększają poziom wewnątrzkomórkowych jonów wapnia.

### 1.3. Ciało migdałowe

Ciało migdałowe u ludzi jest częścią płata skroniowego i stanowi ważny element nie tylko układu nagrody, ale też ogólniej ujmując układu limbicznego, czyli struktur regulujących zachowania emocjonalne. Składa się z kilkunastu pomniejszych struktur, które można podzielić na trzy główne części: korową, podstawno-boczną oraz środkowo-przyśrodkową (Ryc. 6). Te poszczególne części mają różną budowę cytoarchitektoniczną oraz połączenia w mózgu, więc określanie ich wszystkich jako ciało migdałowe jest raczej kwestią umowną wynikłą z historycznych opisów, a nie rzeczywistej anatomii czy filogenezy<sup>53-55</sup>. Opiera się on głównie na zaangażowaniu wspomnianych struktur w przetwarzanie emocji oraz fakcie, że wszystkie one są silnie modulowane przez liczne neuropeptydy, takie jak wazoaktywny peptyd jelitowy czy substancja P<sup>56</sup>.

Obecnie, w kontekście wspólnych funkcji i komunikacji, odpowiednim wydaje się wyróżnienie jądra środkowego (CeA) oraz podstawno-bocznego ciała migdałowego (BLA) wraz z otaczającymi je ITC. Części te mają ze sobą bezpośrednie połączenia, co powoduje, że mogą być traktowane jako jeden funkcjonalny obwód neuronalny wspólnie przetwarzający bodźce o znaczeniu emocjonalnym<sup>57</sup>.



**Ryc. 6: Podział anatomiczny ciała migdałowatego.** A) Lokalizacja ciała migdałowatego w mózgu myszy. B) Sekcja koronalna z Allen’owskiego atlasu mysiego mózgu (ang. *Allen Brain Atlas*) z zaznaczonymi częściami mózgu, które wchodzą w skład ciała migdałowatego. Kolorami zaznaczono cytoarchitektonicznie- i rozwojowo-podobne grupy struktur należące do warstwy podpłytkowej kory (ciemnozielony), prążkowie (jasnozielony) oraz okolic węchowych kory (różowy).

A – przedni (ang. *anterior*); p – tylni (ang. *posterior*); D – grzbietowy (ang. *dorsal*); V – brzuszny (ang. *ventral*); LL – lewy boczny (ang. *lateral left*); RL – prawy boczny (ang. *lateral right*). LA – jądro migdałowate boczne; BA – jądro migdałowate podstawne; BMA – jądro migdałowate podstawne przyśrodkowe; CeL – boczna część jądra środkowego ciała migdałowatego; CeM – przyśrodkowa część jądra środkowego ciała migdałowatego; ITC – jądra wtrącone; MEApd – jądro migdałowate przyśrodkowe, część tylna – grzbietowa; MEAav – jądro migdałowate przyśrodkowe, część przednio-brzuszna; COApl – jądro migdałowate korowe, część tylna-boczna przednia; PAA – pole migdałowato-gruszkowe.

### 1.3.1. Jądro podstawno-boczne ciała migdałowatego

#### 1.3.1.A Anatomia jądra podstawno-bocznego ciała migdałowatego

BLA w mózgu gryzoni jest zazwyczaj łatwe do wyróżnienia, ponieważ jest otoczone warstwą istoty białej oraz ITC, które oddzielają je od sąsiednich struktur<sup>58</sup>. Komórki BLA tworzą rozproszoną sieć składającą się z populacji komórek pobudzających, hamujących interneuronów a także projektujących komórek hamujących<sup>59-61</sup>. Ze względu na swoją jednorodność cyto-architektoniczną często traktowane jest jako jedna struktura w mózgu, jednak można wyróżnić jego część podstawną oraz boczną<sup>54</sup>. Innym podziałem BLA jest wyszczególnienie jego części przedniej (łac. *anterior*) i tylnej (łac. *posterior*)<sup>62</sup>. Za takim podziałem przemawia przestrzenne rozłożenie w BLA typów komórek z obecnością dwóch markerów komórkowych: białka r-spondyny 2 (ang. *r-spondin 2*; komórki Rspo2+) oraz podjednostki regulatorowej 1B fosfatazy 1 (ang. *phosphatase 1 regulatory subunit 1B*; komórki Ppp1r1b+)<sup>62</sup>.

#### 1.3.1.B Funkcje jądra podstawno-bocznego ciała migdałowatego

W BLA spotykają się projekcje przychodzące z różnych struktur mózgowych odbierających informacje o bodźcach awersyjnych i apetytywnych<sup>63</sup>. BLA otrzymuje też informacje sensoryczne ze wzgórza, monoaminergiczne połączenia ze śródmózgowia oraz połączenia kontrolujące zachowania z kory przedczołowej<sup>60</sup>. Bogate połączenia BLA z resztą centralnego układu nerwowego czynią je jednym z tzw. centrów mózgowych (ang. *brain hubs*), w którym następuje integracja sygnałów o różnej modalności zmysłowej<sup>35</sup>.

Funkcje BLA były podstawą wielu badań na przestrzeni dziesięcioleci, podczas których zmieniały się koncepcje na temat jego znaczenia w funkcjonowaniu mózgu. Początkowo, roli BLA upatrywano w kodowaniu wspomnień związanych z negatywnymi doznaniem<sup>64</sup>. Związane to było z obserwacjami prowadzonymi na szczurach, u których zniszczenie tego regionu całkowicie niwelowało efekty warunkowania strachu. Zauważono też jednak, że lezje BLA upośledzają również proces uczenia się związanego z nagrodami<sup>65</sup>. Obecnie wiadomo, że w BLA są komórki przetwarzające zarówno bodźce awersyjne, jak i apetytywne, a w ich rozróżnianiu biorą udział komórki projektujące do różnych struktur w mózgu<sup>62,66,67</sup>. W szczególności, komórki projektujące do CeA oraz do hipokampa są aktywowane zarówno

przez bodźce awersyjne, jak i apetytywne, natomiast neurony projektujące do ACB odpowiadają specyficznemu bodźcu o znaczeniu pozytywnym<sup>67</sup>. W przetwarzaniu bodźców apetytywnych i awersyjnych, istotnym wydaje się też być podział BLA na część przednią i tylną. Zlokalizowane głównie w przednim BLA neurony Rspo2+ odpowiadają za bodźce awersyjne, a komórki Ppp1r1b+ z tylnego BLA przetwarzają bodźce apetytywne<sup>62</sup>. W przypadku tych badań zauważono również, że obie populacje tych komórek mają bogate projekcje do CeA. Wyszczególniono jednak, że komórki z części przedniej (przetwarzające bodźce awersyjne) projektują głównie do części torebkowej CeA. Część tylna BLA ma swoje ujścia z kolei głównie w przyśrodkowym i bocznym CeA<sup>62</sup>.

Obecnie uznaje się, że BLA jest jedną ze struktur obliczających wartość bodźców i biorących udział w podejmowaniu decyzji o podłożu emocjonalnym<sup>65</sup>. BLA koduje również wspomnienia o nagrodach farmakologicznych, m.in. kokainie. Blokowanie BLA po uprzednim teście CPP powodowało, że zwierzę traciło preferencję do miejsca skojarzonego z kokainą. Ponadto, sztuczne pobudzenie neuronów BLA budujących wspomnienie związane z kokainą wywoływało odpowiedź behawioralną podobną do tej związanej z otrzymaniem samego narkotyku<sup>68</sup>.

### **1.3.2. Jądra wtrącone**

ITC jest małą strukturą oddzielającą BLA od CeA i pośredniczącą w przesyłaniu informacji pomiędzy tymi jądrami<sup>57</sup>. ITC otrzymuje projekcje pobudzające z BLA, ale w związku z tym, że jest to struktura składająca się całkowicie z komórek hamujących, jego rola polega głównie na hamowaniu CeA. Wszystkie neurony w ITC są również komórkami wrażliwymi na Da i posiadają na swojej powierzchni receptory D1DR<sup>46</sup>. Co ciekawe, akurat w tych komórkach, Da łącząc się z D1DR powoduje hiperpolaryzację błony komórkowej, co zmniejsza pobudliwość tych neuronów. Skutkuje to zmniejszeniem hamowania CeA i w efekcie odhamowaniem aktywności sieci neuronalnej w obrębie ciała migdałowatego<sup>58</sup>.

### 1.3.3. Jądro środkowe ciała migdałowatego

CeA w mózgu myszy zlokalizowane jest przyśrodkowo do BLA, od którego odgraniczone jest warstwą istoty białej (torebką zewnętrzną) oraz ITC. Można wyróżnić dwie główne części CeA: część przyśrodkową jądra środkowego (CeM) oraz część boczną jądra środkowego (CeL). Podział ten jest dobrze widoczny w mózgu gryzoni dzięki projekcjom z BLA do CeA, które tworzą widoczną granicę pomiędzy tymi częściami <sup>69</sup>. Ponadto, CeM i CeL u gryzoni składają się z różnych typów komórek, które otrzymują i wysyłają odrębne projekcje neuronalne <sup>70</sup>. Obok CeM i CeL, czasem wyróżnia się też część torebkową jądra środkowego (CeC), jako tę zlokalizowaną najbliżej BLA i tylko w obrębie przedniej części CeA. CeC nie ma jednak wyraźnych granic odróżniających go od pozostałych części CeA i wyodrębnić go można tylko dzięki kilku specyficznym markerom komórkowym, m.in. peptydu kodowanego genem kalcytoniny (ang. *calcitonin gene-related peptide*) <sup>71</sup>. W przeszłości wyróżniano również część brzuszную jądra środkowego (CeV) ale obecnie uznaje się je za część CeM <sup>72</sup>.

Główne projekcje do CeA pochodzą z BLA. Ponadto, otrzymuje projekcje monoaminergiczne oraz projekcje z różnych części mózgu, m.in. z hipokampa, kory smakowej i węchowej, wzgórza, podwzgórza, VTA oraz skorupy <sup>6,71,73</sup>.

#### 1.3.3.A Funkcje jądra środkowego ciała migdałowatego

CeA w mózgu gryzoni jest stosunkowo niewielką strukturą, która jednak charakteryzuje się zaskakująco dużą różnorodnością typów neuronów <sup>64, 65</sup>. Jest również jedną ze struktur o największym bogactwie receptorów dla różnych neuroprzekaźników i hormonów, m.in. dla Da, acetylocholin, noradrenaliny, serotoniny i enkefalin <sup>72</sup>. Receptory te aktywowane są podczas przetwarzania różnych stanów emocjonalnych i niektóre z nich zlokalizowane są ściśle w konkretnych częściach CeA i np. specyficznym w CeL obecne są neurony wrażliwe na oksytocynę, a w CeM na wazopresynę <sup>75</sup>. Z uwagi na niewielkie wymiary CeA, często nie wyróżnia się jednak jego poszczególnych podjednostek i traktowane jest jako jedna struktura. W badaniach tych pokazano jego zaangażowanie w przetwarzanie informacji o bodźcach o znaczeniu emocjonalnym, zarówno tych pozytywnych, jak i awersyjnych <sup>6,63</sup>. Pokazano, że jest również miejscem przynajmniej częściowo zaangażowanym w kodowanie tego typu pamięci, o czym świadczą lezje CeA skutkujące upośledzeniem efektów uczenia się <sup>76,77</sup>. CeA

badano również w kontekście przetwarzania nagród farmakologicznych i wykazano jego zaangażowanie m.in. w odpowiedź behawioralną zwierzęcia na alkohol<sup>78</sup>. Alkohol zwiększa prądy hamujące w obrębie CeA, a odstawienie zwierzęcia od dostępu do alkoholu powoduje reorganizację siły połączeń neuronalnych w tej strukturze<sup>79,80</sup>. Aktywność CeA może się również zmieniać podczas ekspozycji zwierzęcia na inne substancje psychoaktywne i pokazano m.in. zmienioną ekspresję genów w jego neuronach pod wpływem kokainy<sup>54,81,82</sup>.

### **1.3.3.B Rola części przyśrodkowej i bocznej jądra środkowego ciała migdałowatego w mózgu**

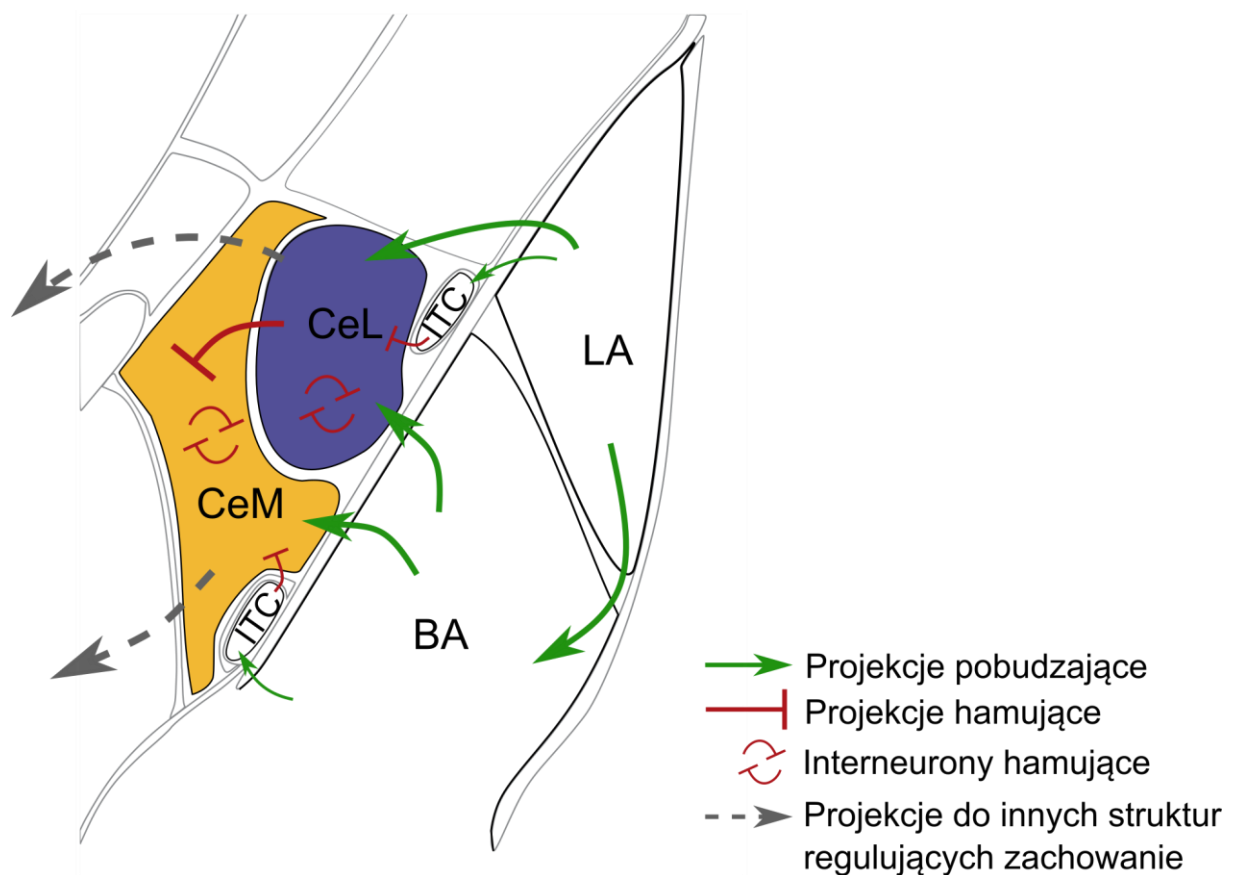
CeM i CeL składają się z odrębnych typów komórek odbierających i wysyłających różne projekcje aksonalne. Ponadto, neurony CeM i CeL tworzą wzajemnie się regulujący mikroobwód neuronalny. Pobudzanie projekcji z BLA dochodzących do składającego się niemal całkowicie z komórek hamujących CeL, prowadzi do hamowania aktywności CeM (Ryc. 7)<sup>83</sup>. Podobnie, zwiększenie pobudliwości komórek CeL poprzez pobudzanie jego receptorów dla oksytocyny, zwiększa prądy hamujące dochodzące do CeM. Jednocześnie, nie zauważono występowania takiej interakcji w drugą stronę i hamowanie komórek CeM pozostawało bez wpływu na aktywność neuronów w CeL<sup>75</sup>. W obrębie CeL zaobserwowano również lokalną interakcję pomiędzy dwoma znajdującymi się tam populacjami komórek hamujących: neuronami z kinazą proteinową C  $\delta$  (PKC $\delta$ +) oraz neuronami somatostatynowymi (SOM+) <sup>84</sup>. Interakcja ta polega na tym, że komórki SOM+ mogą blokować aktywność neuronów PKC $\delta$ + i tym samym hamować niektóre reakcje defensywne zwierzęcia<sup>85</sup>.

Poszczególne części CeA wykazują również odmienne zaangażowanie w przetwarzanie niektórych zachowań. W badaniach nad myszami i szczurami, które przeszły trening warunkowania, wykazano że to głównie CeM jest aktywne gdy bodźcem wzmacniającym jest nagroda<sup>86</sup>. Aktywność CeL z kolei wiąże się głównie z przetwarzaniem informacji o bodźcach awersyjnych i jego udział wzrasta w reakcjach typowo defensywnych<sup>70</sup>. W momencie gdy danemu treningowi behawioralnemu towarzyszą zarówno emocje pozytywne, jak i negatywne (np. podanie jedzenia zwierzęciu poddanemu restrykcji pokarmowej) to obserwuje się aktywność wszystkich części CeA<sup>62,70,86,87</sup>.

Projekcje wychodzące z CeA regulują szereg odczuć emocjonalnych oraz różnych zachowań m.in. defensywnych i drapieżnych<sup>85,88</sup>. Głównym wyjściem sygnału z obwodu neuralnego w obrębie BLA-CeA jest CeM, które uznaje się za strukturę bramkującą wywołanie



odpowiednich reakcji zwierzęcia <sup>2</sup>. Neurony CeM wysyłają długodystansowe projekcje glutaminianergiczne i GABA-ergiczne do struktur pnia mózgu (istoty szarej okołowodociągowej, PAG i jądra pasma samotnego, NTS), jąder przykomorowych wzgórza oraz ACB <sup>85,89,90</sup>. CeM nie jest jednak jedynym wyjściem sygnału z CeA i komórki CeL również projektują do PAG, przez co regulują zachowania defensywne <sup>85</sup>. Ponadto, komórki PKC $\delta$ + w CeL projektują również pośrednio (m.in. przez istotę bezimienną) do LA. Ta pętla zwrotna jest ważna do prawidłowego powiązania bodźca warunkowego i bezwarunkowego podczas procesu uczenia <sup>84</sup>.



**Ryc. 7: Połączenia neuronalne w obrębie jądra podstawno-bocznego i środkowego ciała migdałowatego.**

LA – jądro migdałowe boczne; BA – jądro migdałowe podstawne; CeL – boczna część jądra środkowego ciała migdałowatego; CeM – przyśrodkowa część jądra środkowego ciała migdałowatego; ITC – jądra wtrącone.

## **1.4. Systemowe spojrzenie na mózg**

### **1.4.1. Systemy w mózgu przetwarzające informację o kokainie**

Przetwarzanie informacji o kokainie badane jest głównie w obrębie układu nagrody, tworzonego przez struktury otrzymujące projekcje dopaminergiczne z VTA. Kokaina ma jednak szersze działanie farmakologiczne i blokuje również wychwyty innych monoamin: noradrenaliny i serotoniny. Biorąc pod uwagę rozpiętość tych układów monoaminergicznych, działanie kokainy bezpośrednio wpływa na pracę neuronów w ogromnej części mózgu <sup>91</sup>. Wszystkie te układy wydają się być również ważnymi w pośredniczeniu efektów działania kokainy. Zaburzenie ich gospodarki wpływa na wzrost motywacji, odczucie przyjemności, zwiększoną czujność a także silną potrzebę kontaktu z innymi ludźmi <sup>91</sup>.

Wszystkie układy monoaminergiczne wydają się również przyczyniać do uzależniającej własności kokainy. Upośledzenie tylko jednego z nich nie jest wystarczające do zablokowania jej efektów nagradzających u gryzoni <sup>92,93</sup>. W kontekście uzależnień najważniejszymi wydają się być jednak układy dopaminergiczne i serotonergiczne, ponieważ tylko ich wspólne zablokowanie jest niezbędne do całkowitego zniesienia motywacji zwierzęcia do poszukiwania narkotyku <sup>94,95</sup>.

### **1.4.2. Objętościowe metody obrazowania mózgu**

Przez wiele lat obrazowanie aktywności całego mózgu było w dużej mierze ograniczone do badań z udziałem ludzi, na których możliwe było stosowanie m.in. funkcjonalnego rezonansu magnetycznego (fMRI) lub elektroencefalografii (EEG). W przypadku zwierząt o mózgach dużo mniejszych niż ludzkie, techniki te zwykle zapewniały bardzo niską rozdzielczość przestrzenną <sup>96</sup>.

Z tego powodu eksperymenty na zwierzętach przeprowadzano przy użyciu innych technik i badania te skupione były najczęściej na funkcjach pojedynczych struktur <sup>97</sup>. Dopiero rozwój nowych technik eksperymentalnych pozwolił na skuteczne nagrywanie aktywności z kilku populacji neuronów. Przykładami takich technik zwanych objętościowymi (wolumetrycznymi) są hemodynamiczne obrazowanie kory mózgowej, obrazowanie ultradźwiękami, śledzenie zmian wapniowych przy pomocy mikroskopii dwufotonowej oraz wielokanałowe macierze elektrod <sup>67,98,99</sup>. Inną techniką o wysokiej rozdzielczości przestrzennej

i pozwalającej na obrazowanie całego mózgu jest pośmiertne obrazowanie optycznie oczyszczonych mózgow z wybarwionymi produktami genów, których ekspresja skorelowana jest z aktywnością neuronalną<sup>100</sup>.

#### 1.4.2.A Optyczne oczyszczanie tkanek

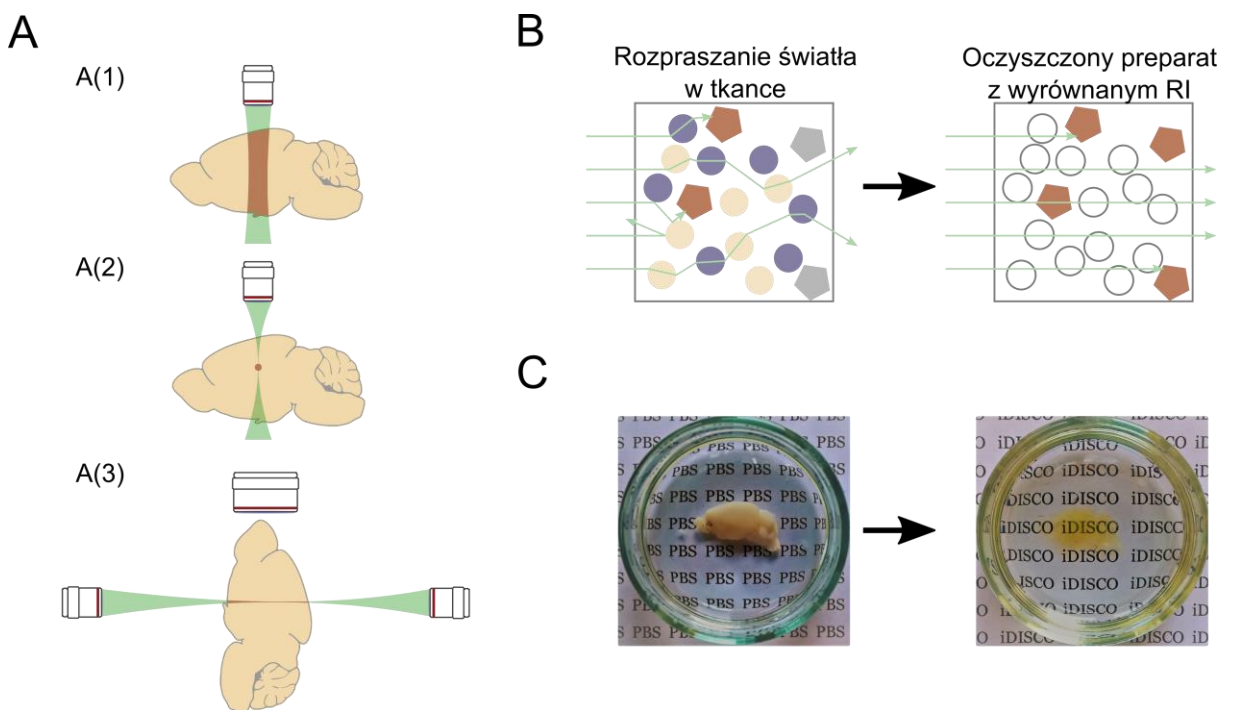
Tkanki większości zwierząt mają niską przepuszczalność dla światła widzialnego, ponieważ składają się z mieszaniny lipidów oraz roztworów wodnych. W związku z tym, że woda i tłuszcze to ośrodki różnie załamujące światło, takie środowisko sprzyja jego rozpraszaniu i blokuje jego przenikanie (Ryc. 8). Optyczne oczyszczanie tkanek ma na celu zwiększenie ich przezroczystości, co uzyskuje się poprzez stworzenie preparatu o możliwie jednolitym współczynniku załamania światła<sup>101,102</sup>.

Techniki optycznego oczyszczania tkanek znane są już od początku XX w., ale dopiero rozwój mikroskopii i barwników fluorescencyjnych sto lat później umożliwił pełne wykorzystanie ich potencjału, również do badania mózgu. W ostatnim dziesięcioleciu udoskonalono również same procedury tworzenia preparatów o wysokiej przezroczystości i wypracowano trzy sposoby ich tworzenia<sup>101-103</sup>. Pierwszy sposób polega na usunięciu lipidów z tkanki przy jednoczesnym przepojeniu jej akrylamidem. Zastygnięty akrylamid tworzy szkielet zachowujący strukturę tkanki oraz podtrzymujący białka. Drugim sposobem jest odwodnienie preparatu i przepojenie go rozpuszczalnikiem organicznym. Zwiększenie przezroczystości tkanki można w końcu uzyskać przez jej hiperhydratację<sup>103</sup>.

Optymalna technika oczyszczania ma nie tylko zapewnić wysoką przezroczystość próbki, ale również umożliwić badanie obecności jakiegoś białka w tkance. Efekt taki można uzyskać poprzez oczyszczanie tkanek genetycznie zmodyfikowanych zwierząt, charakteryzujących się translacją fluoroforów wraz z ekspresją genu badanego białka<sup>104</sup>. W tym wypadku oczyszczanie tkanki musi być na tyle delikatne, by tej fluorescencji nie wygasić. Kolejnym sposobem jest oczyszczenie preparatów połączone z immunohistochemicznym wybarwianiem pożądaných białek. Jedną z technik oczyszczania tkanek w połączeniu z immunohistochemią jest iDisco+ (ang. *immunolabelling-enabled three-dimensional imaging of solvent-cleared organs*)<sup>100,105,106</sup>. Podczas procedury iDisco+, tkanka w pierwszym etapie zostaje odwodniona i wybielona przez szereg silnie drażniących odczynników organicznych i perhydrolu, które całkowicie wygaszają endogenną fluorescencję komórek. Po tym etapie możliwe jest jednak przeprowadzenie barwienia

immunohistochemicznego białek i w efekcie uzyskany preparat cechuje się zarówno wysoką przezroczystością, jak i dużym sygnałem fluorescencji<sup>105</sup>.

Skuteczne optyczne oczyszczanie tkanek powoduje, że maksymalna głębokość obrazowania preparatu przestaje być ograniczona przez rozpraszanie światła fluorescencyjnego w tkance, a jedynie przez dystans roboczy obiektywu<sup>101,104</sup>. Główną komplikacją obrazowania oczyszczonych preparatów w wysokiej rozdzielczości jest jednak czasochłonność całej procedury. Rozwiązaniem tego problemu może być zastosowanie mikroskopii arkusza światła fluorescencyjnego. W tym przypadku mikroskop jest rodzajem ultramikroskopu, co oznacza, że próbka oświetlana jest laserem pod kątem 90° do obiektywu zbierającego wyemitowaną fluorescencję (Ryc. 8). Dodatkowo, w mikroskopii arkusza światła wiązka lasera jest spłaszczona przez zastosowanie odpowiednich soczewek, co skutkuje jednoczesnym oświetleniem dużej, ale płaskiej części preparatu. Podczas obrazowania, płaszczyzna skanowania jest systematycznie przesuwana, co w efekcie umożliwia sprawne obrazowanie całej próbki<sup>102</sup>.



**Ryc. 8: Porównanie różnych technik mikroskopowych** A) W mikroskopii otwartego pola duża część preparatu jest oświetlona jednocześnie. Powoduje to nakładanie się sygnału zmniejszającą rozdzielczość obrazowania oraz wyświecanie się fluorescencji (A(1)). W mikroskopii dwufotonowej wzbudzenie fluorescencji następuje tylko w ogniskowej obiektywu. Dzięki temu fluorescencyjne barwniki z pozostałych warstw preparatu nie są wyświecane, ale zobrazowanie preparatu wymaga czasochłonnego skanowania go punkt po punkcie (A(2)). W mikroskopii arkusza światła obiektywy umieszczone po bokach służą

jedynie do oświetlania preparatu światłem o spłaszczonej wiązce. Do zbierania sygnału służy duży obiektyw umieszczony pod kątem 90° do tej wiązki. Mikroskop ten pozwala na szybkie obrazowanie dużych preparatów w wysokiej rozdzielczości (**A(3)**). **B**) Tkanka większości zwierząt stanowi niejednorodną mieszaninę lipidów i wody, które wielokrotnie załamują promienie świetlne i powodują rozpraszanie światła. W przypadku tkanki oczyszczonej oraz wysyconej roztworem wyrównującym współczynnik załamania światła (RI), światło nie ulega rozpraszaniu i skuteczniej wzbudza fluorofory. **C**) Efekt oczyszczania tkanki metodą iDisco+ na przezroczystość preparatu. Zdjęcie wykorzystane dzięki uprzejmości mgr Diany Legutko. Schemat **A** powstał na podstawie ryciny 4 w Pawłowska M i wsp., *Postępy Biochemii*, (2017).

#### **1.4.2.B Wykorzystanie technik optycznego oczyszczania tkanek w neurobiologii**

Optyczne oczyszczanie mózgu, pomimo że jest dość nową techniką, znacznie przyspieszyło poznawanie anatomii, funkcji i schorzeń centralnego układu nerwowego. Ułatwiło m.in. śledzenie projekcji neuronalnych oraz obrazowanie rozwoju patologii mózgu, np. nowotworzenia w tkance gwałtownej<sup>63,107</sup>.

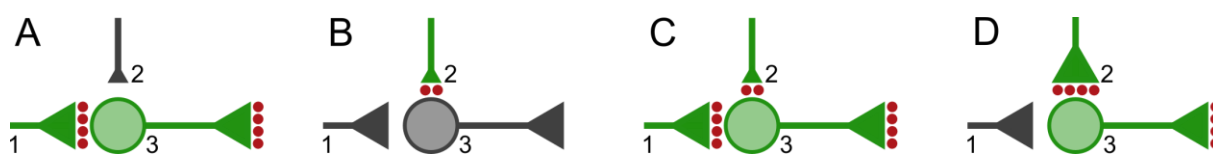
Oczyszczanie mózgu połączono również ze znakowaniem komórek, w których nastąpiła ekspresja genów wczesnej odpowiedzi (ang. *immediate early genes*; IEGs), towarzysząca zmianom aktywności neuronalnej. Oczyszczanie połączone z barwieniem c-Fos, będącego produktem jednego z IEGs, posłużyło do zbadania skutków odstawienia różnych substancji farmakologicznych (m.in. alkoholu, opiatów oraz stymulantów) na pracę mózgu<sup>108–110</sup>. Dzięki tej technice zbadano też skutki ekspozycji na bodźce związane z podawaniem alkoholu, oraz wzór aktywności mózgu podczas budowania wspomnień o bodźcach awersyjnych<sup>100,111</sup>.

Obrazowanie oczyszczonych tkanek i inne techniki wolumetryczne pomogły przypisać nowe funkcje poszczególnym częściom ośrodkowego układu nerwowego. Jednakże, przede wszystkim rzuciły światło na występowanie skomplikowanych interakcji pomiędzy odległymi strukturami mózgowymi, które są zaangażowane we wspólne przetwarzanie bodźców<sup>112</sup>.

### **1.5. Plastyczność synaptyczna**

Neuroplastyczność jest to zdolność neuronów do modyfikacji ich skuteczności w przesyłaniu sygnału. Jednym z typów neuroplastyczności jest plastyczność synaptyczna, czyli długotrwały proces reorganizacji połączeń pomiędzy neuronami – synaps<sup>113</sup>. Hipoteza odnośnie istnienia plastyczności synaptycznej została stworzona niezależnie przez dwóch

badaczy: Jerzego Konorskiego oraz Donalda Hebba <sup>114,115</sup>. Pierwszy z nich, Jerzy Konorski, zaproponował, że molekularną podwaliną uczenia się jest reorganizacja synaps. Ważną składową jego teorii było występowanie tej reorganizacji tylko w obrębie już istniejących połączeń w mózgu, które powstały w trakcie rozwoju układu nerwowego <sup>115,116</sup>. Jerzy Konorski zaproponował również sam termin „plastyczność synaptyczna” na nazwę tego hipotetycznego wtedy jeszcze fenomenu. Niezależnie od jego rozważań, Donald Hebb zapostulował słynną hipotezę, że jeśli komórka A stymuluje neuron B poprzez połączenie synaptyczne, to wielokrotne przesyłanie sygnału pomiędzy nimi spowoduje wzmocnienie tego połączenia. Takie wzmocnienie miało skutkować ułatwioną komunikacją tych neuronów w przyszłości (Ryc. 9) <sup>114</sup>.



**Ryc. 9: Główna koncepcja zmian plastycznych pomiędzy neuronami. A, B)** Początkowo tylko neuron 1 jest w stanie pobudzić komórkę 3 (A), a połączenie pomiędzy neuronami 2-3 jest za słabe do wywołania pobudzenia (B). **C, D)** W przypadku kilkukrotnej i jednoczesnej aktywacji neuronów 1, 2 i 3 (C), połączenia synaptyczne 2-3 ulega wzmocnieniu i neuron 2 jest w stanie samodzielnie pobudzić komórkę 3 (D).

### 1.5.1. Plastyczność synaptyczna a tworzenie śladu pamięciowego

Teoria plastyczności synaptycznej była dobrze znaną w środowisku naukowym, o czym może świadczyć popularność jaką cieszyły się prace Donalda Hebba oraz Jerzego Konorskiego. Ówczesny rozwój techniki nie pozwalał jednak na jej dostateczne potwierdzenie i wykonywane wtedy eksperymenty dostarczały tylko pośrednich dowodów na jej istnienie <sup>116</sup>. Istnienie tego fenomenu zostało udokumentowane dopiero niemal trzy dekady później, w roku śmierci Jerzego Konorskiego w 1973, kiedy to Timothy Bliss i Terje Lømo opublikowali wyniki eksperymentu polegającego na kilkukrotnej i jednoczesnej stymulacji neuronów pre- i postsynaptycznych w hipokampie. To parowanie poskutkowało wzrostem amplitudy prądów wywołanych przez stymulację tego połączenia, co skonkludowano jako wyraz wzmocnienia synaps pobudzających pomiędzy tymi neuronami <sup>117</sup>.

Zaobserwowany proces nazwano długotrwałym wzmocnieniem postsynaptycznym (ang. *long term potentiation*, LTP), a istnienie zjawiska plastyczności synaptycznej zostało

powszechnie zaakceptowane. Wkrótce odkryto również, że wywołanie LTP pomiędzy dwoma neuronami może skutkować jednoczesnym osłabieniem siły innych połączeń w obrębie sieci nerwowej<sup>118</sup>. Proces ten udało się też wywołać poprzez stymulację neuronu prądami o niskiej częstotliwości i nazwano go długotrwałym osłabieniem postsynaptycznym (ang. *long term depression*, LTD)<sup>119</sup>.

LTP i LTD są procesami o przeciwstawnych skutkach na siłę połączenia synaptycznego i początkowo upatrywano roli wzmocnienia synaps pobudzających w uczeniu się, a LTD w wygaszaniu wspomnień<sup>113,120</sup>. Obecnie jednak uznaje się, że oba procesy mogą być zaangażowane w tworzenie śladów pamięciowych i ich wystąpienie podczas uczenia się zostało wielokrotnie udokumentowane<sup>120,121</sup>. Podobnie, zablokowanie tych form plastyczności upośledza różne formy nauki u zwierząt<sup>122,123</sup>.

W toku badań nad neuroplastycznością zauważono, że niekoniecznie jest ona tylko odpowiedzią obwodów neuronalnych na zmianę ich aktywności podczas uczenia. Procesy plastyczne szczególnie intensywnie występują też podczas rozwoju neuronalnego, kiedy są podstawą ustalania się homeostazy sieci nerwowej i kształtowania funkcji mózgowych<sup>124,125</sup>. Funkcjonalne zmiany synaps następują również podczas tzw. plastyczności okołodobowej, kiedy zależą od pory dnia i stanowią ważną rolę w rytmice behawioralnej zwierząt<sup>126</sup>.

### 1.5.2. Mechanizmy plastyczności synaptycznej

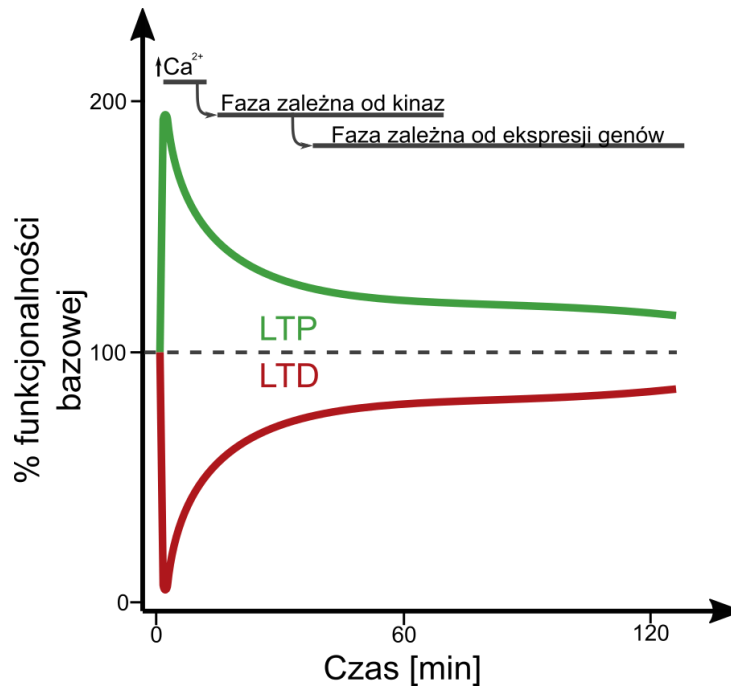
Mechanizmy plastyczności synaptycznej zazwyczaj bada się *in vitro* (na hodowlach neuronalnych) lub *ex vivo* (na skrawkach mózgu). LTP i LTD w komórkach z takich preparatów można wtedy sztucznie wywołać na drodze stymulacji chemicznej lub elektrycznej. Do elektrycznego wywołania LTP stosuje się stymulację projekcji do neuronu prądem o wysokiej częstotliwości, a do LTD prądem o niskiej częstotliwości<sup>113</sup>. Chemiczne LTP można wywołać np. poprzez zwiększenie poziomu cAMP w neuronie<sup>127</sup>. Wzmocnienie synaptyczne można też wywołać zwiększając poziom  $Ca^{2+}$  w neuronie poprzez laserowe uwalnianie związanego glutaminianu (ang. *glutamate uncaging*). Technika ta umożliwia precyzyjne uwalnianie glutaminianu, który pobudza receptory dla kwasu  $\alpha$ -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowego (AMPA) lub N-metylo-D-asparaginowego (NMDAR) w obrębie jednego połączenia synaptycznego<sup>128</sup>. Chemiczne LTD można wywołać m.in. poprzez aktywację receptorów metabotropowych glutaminianergicznych typu 1 (ang. *metabotropic glutamate receptor 1*; mGluR1) ich agonistą,

dihydroksyfenyloglicyną (DHPG) <sup>129</sup>. LTP i LTD może też być skutkiem plastyczności synaptycznej zależnej od czasowej synchronizacji aktywności neuronalnej (ang. *spike timing-dependent plasticity*; STDP). STDP wywołuje się poprzez parowanie stymulacji neuronu pre- i post-synaptycznego w odpowiednim oknie czasowym. Gdy to parowanie jest synchroniczne, to skutkuje LTP, a gdy odwleczone w czasie to zwykle następuje LTD <sup>113</sup>.

LTP i LTD to kilkufazowe i rozciągnięte w czasie procesy, które mogą trwać nawet kilka godzin (Ryc. 10). W ich przebieg uczestniczy wiele różnych elementów maszynarii komórkowej, które są angażowane na ich kolejnych etapach. Pierwszą fazą obu procesów jest nagłe zwiększenie wewnątrzkomórkowego poziomu  $Ca^{2+}$  poprzez CP-AMPA (AMPA przepuszczalne dla  $Ca^{2+}$ ), NMDAR, napięciowo-zależne kanały wapniowe lub receptory metabotropowe glutaminianergiczne <sup>113,130</sup>. To, która zmiana plastyczna nastąpi na skutek napływu  $Ca^{2+}$ , zależy od intensywności tego wzrostu: duży poziom prowadzi do LTP, a umiarkowany do LTD. Następną fazą jest krótkotrwałe wzmocnienie LTP (lub LTD), które aktywuje mechanizmy podtrzymujące podwyższony poziom  $Ca^{2+}$  w komórce, m.in. poprzez uwalnianie go z retikulum endoplazmatycznego. Utrzymujący się przez ok. kilkadziesiąt sekund zwiększony poziom  $Ca^{2+}$  prowadzi do wczesnych faz LTP lub LTD (E-LTP lub E-LTD). Główną rolę przejmują wtedy kinazy dostępne w komórce, a w szczególności szlak sygnałowy kinazy białkowej zależnej od kalmoduliny II (CaMKII) i kinazy białkowej C (PKC). Końcowym elementem tego szlaku jest aktywacja czynników transkrypcyjnych w jądrze komórkowym <sup>131</sup>. Prowadzi to do ostatnich faz tych procesów, późnego LTP lub LTD (L-LTP lub L-LTD), które wymagają ekspresji genów oraz powstania nowych białek <sup>113,131,132</sup>. Efektem końcowym procesów plastyczności synaptycznej jest długotrwała zmiana funkcjonalności (siły) połączenia, któremu towarzyszy wbudowanie lub usunięcie z powierzchni synapsy receptorów dla glutaminianu: AMPAR i NMDAR.

Ścieżki sygnałowe LTP i LTD w wielu miejscach pokrywają się ze sobą, a rodzaj konkretnego procesu zależy od wystąpienia subtelnych różnic w czasie ich przebiegu, takich jak poziom wzrostu  $Ca^{2+}$  czy odpowiednia fosforylacja CaMKII <sup>133</sup>. Nie bez wagi na plastyczność synaptyczną są również efekty różnych neurotransmiterów, które modułują fizjologię komórki <sup>134</sup>. Jednym z nich jest Da, której efekty zależą od typu receptora z jakim się zwiąże: zwykle typ D1 promuje LTP a typ D2 sprzyja LTD <sup>135</sup>. Ponadto, na wystąpienie konkretnego procesu plastycznego ma wpływ historia procesów plastycznych w tej komórce. Dla przykładu, jeśli jakieś połączenie zostało już wcześniej wzmocnione to trudniej będzie je poddać LTP i stanie się bardziej podatne na wystąpienie LTD <sup>136-138</sup>.





**Ryc. 10: Długotrwałe wzmocnienie i osłabienie synaptyczne (LTP i LTD).** LTP i LTD to procesy przeciwstawne, które mają różny wpływ na siłę synapsy. Są procesami rozciągniętymi w czasie, które mają trzy główne etapy: fazę zależną od napływu jonów wapnia, fazę zależną od kinaz oraz w końcu fazę zależną od ekspresji genów. Kolejne fazy są uzależnione od poprzednich, a czas ich trwania może pokrywać się.

### 1.5.2.A Strukturalne zmiany towarzyszące plastyczności synaptycznej

Pierwsze dowody na to, że zmiany strukturalne (morfologiczne) neuronów są skutkiem uczenia się zaobserwowano u ptaków śpiewających. Dostrzeżono, że ptaki, które uczyły się śpiewać posiadały więcej kolców dendrytycznych, czyli wypustek dendrytycznych tworzących synapsy pobudzające. Co więcej, liczba nowoutworzonych kolców była powiązana ze stopniem skomplikowania uczonej melodii <sup>139</sup>. W późniejszych latach, dzięki eksperymentom z mikroskopią dwufotonową, udało się zaobserwować *in vivo* i *ex vivo* zmiany plastyczne ciągle żywych neuronów. Badania te pokazały, że wywołanie LTP skutkuje tworzeniem się nowych kolców dendrytycznych oraz wzrostem wielkości i długości już istniejących kolców <sup>128,140,141</sup>. Protokoły stymulacji wywołujące LTD skutkowały z kolei redukcją wielkości kolców dendrytycznych oraz zmniejszeniem ich liczby <sup>142</sup>. Modyfikacje strukturalne obserwowane podczas plastyczności synaptycznej są bardzo dynamiczne i mają podobny przebieg do zmian przewodności elektrycznej synaps. Już w pierwszych dwóch minutach trwania LTP, wielkość główki kolca zwiększa się nawet do 300% wartości bazowej, po czym zmniejsza się do ok. 150% wartości początkowej i utrzymuje się na tym poziomie przez kilkadziesiąt minut <sup>141</sup>.

Kolce dendrytyczne w mózgu mają różne kształty, które reprezentują ich różne stopnie rozwoju<sup>143</sup>. Zwykle na podstawie wielkości ich główki i długości szyjki (podstawy) wyróżnia się ich cztery rodzaje:

- filopodialne – wydłużone i często pozbawione widocznej główki
- cienkie – kolce o niewielkiej główce i posiadające maczugowaty kształt
- grzybkowate – kolce o wielkiej główce i cienkiej podstawie
- przysadziste – tak jak nazwa wskazuje, kolce dendrytyczne o nieproporcjonalnie wielkiej główce w stosunku do krótkiej szyjki

Kolce mogą ulegać reorganizacji w procesie zwanym dojrzewaniem kolców (ang. *spine maturation*), kiedy to zmieniają się od filopodialnych do grzybkowatych<sup>143</sup>. W procesie tym zmienia się funkcjonalność tworzonej przez taki kolec synapsy i zaobserwowano istnienie pozytywnej korelacji pomiędzy wielkością główki kolca a liczbą AMPAR na jego powierzchni<sup>140</sup>.

### **1.5.2.B Zmiany elektrofizjologiczne towarzyszące plastyczności synaptycznej**

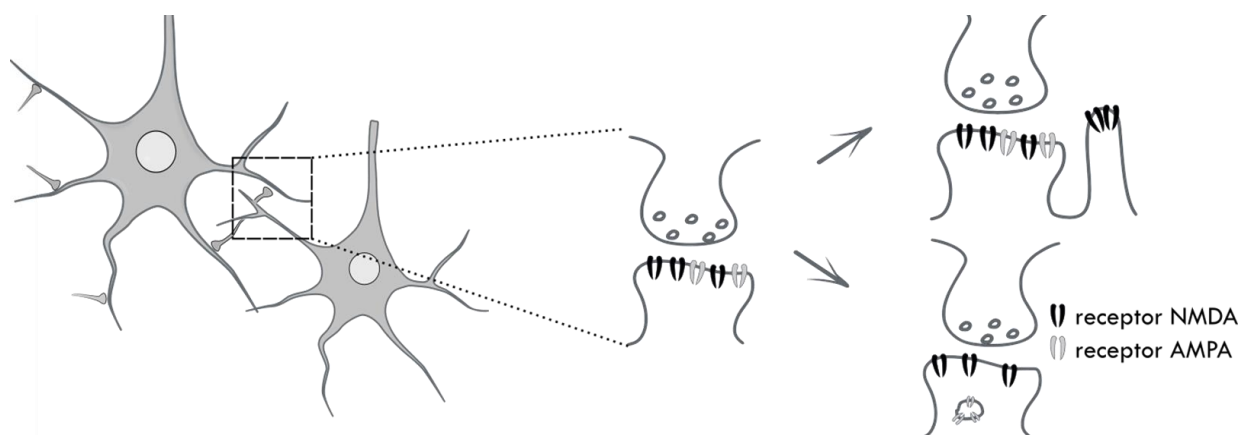
Funkcjonalnym skutkiem LTP i LTD jest modyfikacja jakości połączeń synaptycznych neuronów, wynikająca ze zmiany liczby i jakości receptorów AMPAR i NMDAR. Zmienioną zdolność do transmisji sygnału można zaobserwować jako zwiększoną lub zmniejszoną amplitudę i częstość rejestrowanych prądów spontanicznych po wywołaniu procesów plastycznych, co związane jest z przepustowością i liczbą receptorów glutaminianergicznych na powierzchni błony komórkowej<sup>144</sup>.

Innym objawem zachodzących zmian plastycznych jest powstawanie milczących (cichych) synaps. Te połączenia synaptyczne posiadają na swojej powierzchni wbudowane NMDAR, ale nie mają stabilnie wbudowanych w błonę AMPAR<sup>145–147</sup>. Nazywane są „milczącymi”, ponieważ przy spoczynkowym potencjale błonowym, takie synapsy nie uczestniczą w podstawowej transmisji synaptycznej (ang. *basal synaptic transmission*). Synapsa z samymi NMDAR nie depolaryzuje błony, ponieważ kanały te do otwarcia potrzebują oprócz glutaminianu i glicyny również ich wstępnej depolaryzacji usuwającej blok magnezowy z ich przewodu<sup>148</sup>. Ciche synapsy w mózgu mogą powstać zarówno na drodze LTP, jak i LTD i w zależności od tych procesów ich funkcjonalność jest wtedy różna (Ryc. 11)<sup>148,149</sup>. W przypadku LTP, milczące synapsy towarzyszą nowym, filopodialnym kolcom dendrytycznym, które w początkowej fazie mają na swojej powierzchni tylko NMDAR.

Z czasem te kolce dojrzewają i stają się funkcjonalnymi synapsami o dużej przepustowości dla  $\text{Ca}^{2+}$ . Ta duża przepustowość związana jest z budową podjednostkową NMDAR, która różni się od tej obecnej na dojrzałych synapsach przede wszystkim obecnością podjednostki GluN2B. NMDAR na dojrzałych kolcach dendrytycznych ma zamiast nich podjednostki GluN2A, które powodują szybsze zamykanie tego receptora <sup>149</sup>. Milczące synapsy powstające na drodze osłabienia synaptycznego to głównie efekt internalizacji AMPAR, co powoduje, że synapsa staje się niefunkcjonalna i z czasem tworząc ją kolce może ulec wycofaniu <sup>148</sup>.

Milczącym synapsom dużo uwagi poświęcono w kontekście ACB i ekspozycji zwierzęcia na kokainę. Początkowo wysunięto nawet hipotezę, że są one szczególnym markerem zmian plastycznych dla tej używki <sup>148</sup>. Późniejsze badania pokazały jednak, że inne substancje psychoaktywne, nagrody naturalne oraz warunkowanie strachu również wywołują powstawanie milczących synaps w ciele migdałowatym, hipokampie i innych strukturach w mózgu <sup>80,100,150</sup>.

Milczące synapsy nie muszą jednak tylko reprezentować połączeń synaptycznych w trakcie reorganizacji po ekspozycji na jakiś bodziec. Mogą to być również niedojrzałe synapsy, które z czasem będą zaangażowane podczas procesów uczenia <sup>151</sup>. Milczące synapsy tego typu są szczególnie charakterystyczne dla dojrzewającego układu nerwowego, ale występują również w dorosłym mózgu, gdzie w niektórych częściach kory mogą stanowić nawet 30% wszystkich synaps <sup>152</sup>. Znajdują się wtedy na kolcach dendrytycznych o filopodialnym kształcie i są rekrutowane podczas LTP, które wywołuje ich dojrzewanie poprzez wbudowanie funkcjonalnych AMPAR <sup>140,152</sup>.



**Ryc. 11: Powstawanie milczących synaps.** Dojrzała synapsa ma na swojej części postsynaptycznej dwa typy receptorów dla glutaminianu: receptory NMDA i AMPA. Podczas wzmocnienia synaptycznego tworzone są nowe kolce dendrytyczne, które na swojej

powierzchni mają początkowo tylko receptory NMDA. Podczas osłabienia synaptycznego receptory AMPA ulegają internalizacji, a na powierzchni pozostają obecne tylko receptory NMDA. Podczas obu procesów można zaobserwować powstanie milczących synaps, ale ich długotrwałe skutki na przesyłanie sygnału są różne.

### 1.5.2.C Zmiany ekspresji genów towarzyszące plastyczności synaptycznej

W późnej fazie LTP i LTD następuje ekspresja IEGs: *c-fos*, *zif268*, *arc* i *npas4*, których skutkiem jest powstanie nowych białek w neuronie. Ekspresja tych genów zaczyna się już w kilkanaście minut po stymulacji komórki i jest wykrywalna jeszcze przez kilka godzin<sup>132,153</sup>. Ekspresja IEGs jest niezbędna do prawidłowego przebiegu procesów plastycznych w neuronach oraz do tworzenia towarzyszących im śladów pamięciowych<sup>131</sup>. Myszy z delecjami IEGs mają co prawda zachowaną pamięć krótkotrwałą i potrafią np. habituować się do różnych bodźców, ale wykazują jednak zaburzoną pamięć długotrwałą objawiającą się upośledzonym warunkowaniem i pamięcią przestrzenną. Świadczy to o udziale L-LTP i IEGs w konsolidacji procesów pamięciowych<sup>113,131,154</sup>.

Jednym z najczęściej badanych IEGs jest gen *arc* (ang. *activity-regulated cytoskeletal-associated*), którego produktem jest białko Arc, znane też jako białko Arg 3.1<sup>154</sup>. Ekspresję genu *arc* zaobserwowano podczas wielu rodzajów treningu behawioralnego, ale również podczas prawidłowej plastyczności rozwojowej<sup>153,155,156</sup>. Powstałe z transkrypcji genu *arc* mRNA ulega translacji już w jądrze komórkowym, ale jest też transportowane do cytoplazmy i dendrytów neuronu. W okolicy kolców dendrytycznych, białko Arc jest ściśle zaangażowane w endocytozę AMPAR i dlatego jego obecność tam często uznawana jest za świadectwo procesów LTD<sup>153</sup>. Jego rola w neuronie jest jednak szersza, i białko to wpływa również na regulację plastyczności synaptycznej na sąsiadujących neuronach. Mechanizm ten opiera się na formowanych przez Arc kapsydach (podobnych do kapsydów wirusowych), w których umieszczone zostaje *arc* mRNA. Następnie, takie kapsydy zostają uwalniane do przestrzeni zewnątrzkomórkowej w postaci pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, gdzie mogą zostać inkorporowane do wnętrza sąsiadujących neuronów<sup>157</sup>.

Produkt kolejnego z IEGs, c-Fos jest składnikiem czynnika transkrypcyjnego AP-1, którego celem są geny kodujące białka reorganizujące strukturę synaps, np. białko metaloproteazy macierzowej-9 (MMP-9) i inhibitora tego enzymu TIMP-1<sup>132,158,159</sup>. Komórki nerwowe ekspresyjujące *c-fos* są zaangażowane w uczenie się i często uznaje się je za substrat tworzącego się engramu (ślądu pamięciowego)<sup>66,160</sup>. Sztuczna aktywacja tych komórek

w przyszłości jest wystarczająca, by wywołać efekty behawioralne wyuczone np. podczas warunkowania nagrody lub kary <sup>66</sup>.

W niektórych strukturach, np. korze wzrokowej i korze sensorycznej, podwyższony poziom c-Fos zaobserwowano tylko po pojedynczej ekspozycji zwierzęcia na bodziec, ale nie po jego kilkukrotnej prezentacji <sup>161</sup>. Doprowadziło to do powstania hipotezy, że ekspresja *c-fos* towarzyszy nowości bodźca, a jego podwyższony poziom obserwuje się tylko podczas kodowania pamięci <sup>132</sup>. Obecnie wydaje się jednak, że ekspresja IEGs jest bardziej skomplikowana i może następować zarówno podczas tworzenia śladu pamięciowego, ale też być wynikiem m.in. zmienionej aktywności neuronu podczas przypominania wspomnienia <sup>111,162</sup>.

### **1.5.3. Nagrody a plastyczność synaptyczna**

Zmiany plastyczne na synapsach przez długi czas badane były głównie w kontekście tworzenia śladów pamięciowych i obecnie uznaje się je za molekularną podstawę wspomnień tworzonych w mózgu. Pojawienie się zmian plastycznych zaobserwowano w różnych zwierzęcych modelach uczenia się, m.in. podczas warunkowania miejsca nagrodami farmakologicznymi <sup>163</sup>. Obserwacje zmian plastycznych powstających na skutek kontaktu zwierzęcia z substancją psychoaktywną, doprowadziły do stworzenia teorii, jakoby uzależnienia były patologiczną formą uczenia się <sup>8,36</sup>.

#### **1.5.3.A Uzależnienia a plastyczność synaptyczna**

Uzależnienie od substancji psychoaktywnej jest ściśle związane ze zmianami plastycznymi w mózgu wywołanymi przez narkotyki, które następują już nawet po jego jednej ekspozycji <sup>136,164</sup>. Upośledzenie tych procesów zmniejsza motywację zwierząt do poszukiwania substancji psychoaktywnych, co stanowi argument potwierdzający hipotezę, że plastyczność synaptyczna jest niezbędna do formowania się uzależnień <sup>78,80,165</sup>. Motywacją do badań nad plastycznością wywołaną narkotykami jest idea, że wpłynięcie na te procesy poprawi stan osób uzależnionych <sup>36</sup>. Taki efekt udało się uzyskać u myszy, którym optogenetycznie zmieniano aktywność neuronów. W eksperymencie tym, przy pomocy światła sztucznie wywołano LTD w komórkach, których synapsy uległy poprzednio wzmocnieniu po ekspozycji zwierzęcia na

narkotyk. Ta manipulacja upośledziła wcześniej utworzone wspomnienia związane z narkotykiem, mierzone m.in. testem CPP <sup>163</sup>.

Modyfikacje układu nerwowego spowodowane zażyciem narkotyku nie zawsze muszą być jednak tylko podstawą rozwijającego się uzależnienia. Większość substancji psychoaktywnych, zwłaszcza gdy są dostarczane w dawkach zapewniających ich rekreacyjne użycie, to trucizny mające szkodliwy wpływ na komórki. Są cytotoksyczne i powodują degradację białek, a ich dłuższe zażywanie może wiązać się z szeregiem zmian obserwowalnych nawet na poziomie anatomicznym, takich jak zmniejszanie się istoty szarej i białej w różnych częściach mózgu <sup>21,166,167</sup>.

Stymulanty, np. kokaina, kilkukrotnie zwiększają dostępność Da na synapsach, co znacznie zakłóca homeostazę pracy mózgu <sup>168</sup>. W obliczu tak нефизjologicznych warunków, neurony wytwarzają szereg mechanizmów kompensacyjnych, które chronią je przed ekscytotoksycznością, czyli szkodliwym nadmiernym pobudzeniem. Manifestacją tych mechanizmów mogą być np. zmiany w pobudliwości neuronów oraz zmniejszanie liczby niektórych receptorów na synapsach <sup>41</sup>. Podejrzewa się, że te adaptacje neuronów skutkują tym, że ludzie nadużywający niektórych substancji psychoaktywnych wytwarzają na nie tolerancję, przez co potrzebują coraz większych dawek narkotyku do podtrzymania oczekiwanych doznań <sup>169</sup>.

Po ekspozycji zwierzęcia na kokainę zaobserwowano obecność wszystkich wspomnianych wcześniej markerów plastyczności synaptycznej <sup>54,165,170</sup>. Zmiany te zauważono w różnych częściach mózgu, m.in. w hipokampie, prążkowie czy korze mózgowej <sup>171,172</sup>. Procesy plastyczne wywołane przez kokainę w dużej mierze zależą od badanych struktur oraz typów komórek i czasem mogą mieć nawet przeciwstawne skutki, np. na pobudliwość neuronalną <sup>13,170</sup>. Zmiany plastyczne wywołane kokainą zostały najlepiej opisane w kontekście ACB, którego komórki tworzą nienakładające się populacje neuronów z DRD1 i DRD2. W komórkach DRD1+ zaobserwowano szereg zmian świadczących o wystąpieniu wzmocnienia synaptycznego <sup>173,174</sup>. W neuronach DRD2+ również zaobserwowano zmiany plastyczne, ale tam zmniejszyły siłę i liczbę synaps <sup>48,149</sup>.

## 2. CELE PRACY

Zarówno sacharoza, jak i kokaina posiadają właściwości motywujące dla zwierząt i powodują wyrzuty dopaminy w mózgu. Obydwie substancje są nazywane nagrodami, ponieważ motywują zwierzęta do ich pozyskania. Nie wiadomo jednak, czy informacje o nich są przetwarzane przez te same części mózgu.

Jądro środkowe ciała migdałowatego to część mózgu zaangażowana w przetwarzanie informacji o różnych bodźcach emocjonalnych. Jądro środkowe często jest badana jako jedna struktura, ale badania wskazują, że jego przysrodkowa i boczna część mogą być różnie zaangażowane w przetwarzanie bodźców apetytywnych i awersyjnych. Do tej pory nie wiadomo było jednak, czy kokaina i sacharoza angażują te same obszary jądra środkowego ciała migdałowatego oraz czy indukują podobne zmiany plastyczne w jego neuronach.

Głównym celem pracy było określenie i porównanie, jak w mózgu myszy przetwarzane są nagrody naturalne (sacharoza) oraz farmakologiczne (kokaina). W tym celu określono dwa cele szczegółowe:

1. Zbadanie wzorca aktywności całego mózgu po ekspozycji myszy na sacharozę lub kokainę.
2. Zbadanie jak w poszczególnych częściach jądra środkowego ciała migdałowatego przetwarzane są informacje o sacharozie i o kokainie oraz jak struktura ta przyczynia się do behawioralnej odpowiedzi zwierzęcia na te nagrody.

### 3. MATERIAŁY I METODY

#### 3.1. Odczynniki i leki

Tabela 1: Wybrane odczynniki chemiczne

Nazwa	Numer katalogowy
3,5-dihydroksyfenyloglicyna	Tocris Bioscience, nr kat. 0342
Azydek sodu	Avantor Performance Materials Poland S.A., nr kat. PA-06-792770426#250G
Biocytyna	Tocris Bioscience, nr kat. 4936
Buforowana fosforanem sól fizjologiczna (PBS)	Medicago, nr kat. 09-9400-100
Chlorek potasu	Chempur, nr kat. 363-117941206
Chlorek sodu	Chempur, nr kat 363-117397402
Dichlorometan	Sigma (Merck), nr kat. 270997-12X100ML
Dwuwęglan choliny	Sigma (Merck), nr kat. C7519-250ML
Eter dibenzylu	Sigma (Merck), nr kat. 108014-1KG
Etylowy alkohol (99,8%)	Avantor Performance Materials Poland S.A., nr kat. 396480427
Metylowy alkohol	Sigma (Merck), 322415-2L
N-metylo-D-glukamina	Sigma (Merck), nr kat. 6284-40-8
Paraformaldehyd	Sigma (Merck), nr kat. 441244
Pikrotoksyna	Tocris Bioscience, nr kat. U 93631
Sacharoza	Sigma (Merck), nr kat. S9378-1KG



Triton X-100	Sigma (Merck), nr kat. P9416
Tween 20	Sigma (Merck), nr kat. T8787
Medium zatapiające	SouthernBiotech, Fluoromount-G

**Tabela 2: Przeciwciała**

Nazwa	Numer katalogowy
Przeciwciało anty-Arc	Synaptic Systems, nr kat. 156 003
Przeciwciało anty-c-Fos	Synaptic Systems, nr kat. 226 003
Przeciwciało anty-GFP	Abcam, nr kat. ab13970
Przeciwciało anty-mCherry	ThermoFisher (Invitrogen), nr kat. M11217
Przeciwciało anty-NMDAR2B (GluN2B)	Alomone Labs, nr kat. AGC003
Przeciwciało drugorzędowe z Alexa Fluor 488	ThermoFisher (Invitrogen), nr kat. A11039
Przeciwciało drugorzędowe z Alexa Fluor 555	Abcam, nr kat. 150158
Przeciwciało drugorzędowe z Alexa Fluor 647	ThermoFisher (Invitrogen), nr kat. A32733
Streptawidyna z Atto 565	Sigma (Merck), nr kat. 56304-1MG-F

**Tabela 3: Leki**

Nazwa	Numer katalogowy
Butorfanol winianu	Richter Pharma, Butomidol
Enrofloksacyna	Bayer AG, Baytril
Izofluran	Virbac, Vetflurane

Kokaina	LGC standards, nr kat. MM1345.00–0250
Kwas tolfenamowy	Vetoquinol, Tolfedine
Pentobarbital sodu	Biowet Puławy, Morbital
Zmodyfikowana klozapina (N-tlenek klozapiny; CNO)	Tocris Bioscience, nr kat. 4936

**Tabela 4: Wybrane materiały**

Nazwa	Numer katalogowy
Igła do iniekcji wirusowych 34 GA	World Precision Instruments, nr kat. NF34BV
Kapilary szklane	World Precision Instruments, nr kat. 1B120F-4
Kapilary z przegrodą (kapilary do elektrod stymulujących)	World Precision Instruments, nr kat. TST 150-5

**Tabela 5: Wirusy**

Nazwa	Numer katalogowy
AAV1/2 hSyn-hM3D(Gq)-mCherry (miano $2,88 \times 10^9$ )	Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN; przy wykorzystaniu plazmidu Addgene #50474
AAV1/2 hSyn-hM4D(Gi)-mCherry (miano $2,77 \times 10^9$ )	Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN; przy wykorzystaniu plazmidu Addgene #50475
AAV1/2 hSyn-mCherry (miano $2,1 \times 10^9$ )	Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN; przy wykorzystaniu plazmidu Addgene #114472

## 3.2. Mysie modele badawcze

Badania zostały przeprowadzone na zwierzętach doświadczalnych hodowanych w zwierzętarni Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego Polskiej Akademii Nauk. Zwierzęta będące w trakcie eksperymentu oraz będące w hodowli miały stały dostęp do pokarmu oraz wody. Zwierzęta miały zapewnione warunki bytowania zgodne z przepisami krajowym, tj. temperaturę w pomieszczeniu 21-23 °C, wilgotność powietrza w zakresie 50-60%, 10-15 wymian powietrza na godzinę, 12-godzinny cykl dobowy oraz wzbogacone środowisko. Podczas eksperymentów behawioralnych, myszy były rozdzielane i trzymane w klatkach pojedynczo. Doświadczenia zostały wykonane zgodnie z procedurami opisanymi we wnioskach zatwierdzonych przez I Lokalną Komisję Etyczną ds. doświadczeń na zwierzętach w Warszawie (308/2017 i 1225/2021).

### 3.2.1. Linie myszy doświadczalnych stosowane w badaniach

W badaniach wykorzystano dwie linie myszy na tle genetycznym C57BL/6, które posiadały fluorescencyjnie wybarwione różne typy komórek:

- Linia TgN(GAD65-tdTomato) (The Jackson Laboratory o numerze 5790577; GAD65-tdTomato) charakteryzująca się fluorescencyjnym wyznakowaniem komórek zawierających dekarboksylazę kwasu glutaminowego 65 (GAD65), czyli głównie neuronów hamujących<sup>175</sup>.
- Linia określana skrótem DRD1-tdTomato/DRD2-GFP, będąca skrzyżowaniem szczepów B6.Cg-Tg(Drd1a-tdTomato)6Calak/J (The Jackson Laboratory o numerze 016204; DRD1-tdTomato) oraz Tg(Drd2-EGFP)S118Gsat/Mmnc (Mutant Mouse Resource and Research Center Strain o numerze: 230; DRD2-GFP) otrzymanych dzięki uprzejmości prof. dr. hab. Jana Rodrigueza Partkitny. Linia DRD1-tdTomato/DRD2-GFP charakteryzuje się fluorescencyjnym wyznakowaniem komórek z dwoma receptorami dla Da<sup>176</sup>. Komórki posiadające na swojej powierzchni DRD1 mają obecne w ciele komórki białko czerwonej fluorescencji (tdTomato), a te z DRD2 białko zielonej fluorescencji (ang. *green fluorescent protein*; GFP).

Barwniki fluorescencyjne obecne w neuronach myszy tych linii pozwalają na wyróżnienie poszczególnych komórek przy pomocy mikroskopów fluorescencyjnych

z odpowiednimi filtrami. Maksimum wzbudzenia białka czerwonej fluorescencji tdTomato uzyskuje się przy świetle o długości 554 nm, a jego maksymalna emisja to 581 nm. GFP jest maksymalnie wzbudzane falą 488 nm, a jego optymalna emisja jest wykrywana przy 510 nm.

W celu wyselekcjonowania osobników o pożądanym genotypie, wszystkie myszy wykorzystane w pracy weryfikowane były przez techników w laboratorium przy wykorzystaniu reakcji PCR (ang. *polimerase chain reaction*).

### 3.2.2. Ekspozycja myszy na nagrody

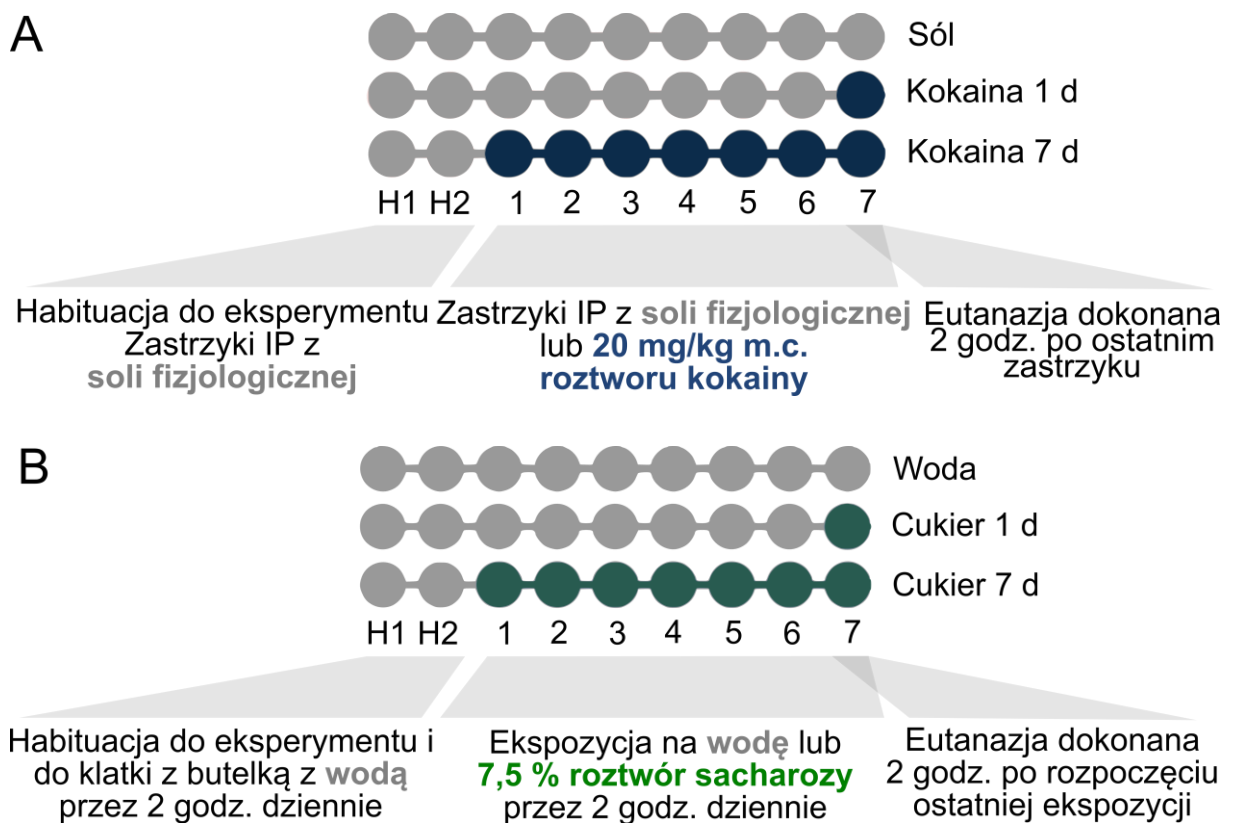
Podczas eksperymentów zastosowano dwa mysie modele ekspozycji na nagrody: na nagrodę farmakologiczną – kokainę oraz nagrodę naturalną – sacharozę.

Nagrodą o charakterze uzależniającym były dootrzewnowe zastrzyki z roztworu kokainy w soli fizjologicznej przygotowywanej w stężeniu 4 mg/ml. Roztwór kokainy podawany był w stężeniu 20 mg/kg masy ciała (m.c.) zwierzęcia. Całość eksperymentu behawioralnego trwała 9 dni, podczas których mysz dostawała dziennie jeden zastrzyk z roztworu kokainy lub z samej soli fizjologicznej. W dwóch pierwszych dniach myszy były przyzwyczajane do procedury i były nastrzykiwane dootrzewnowo 100  $\mu$ l soli fizjologicznej. Następnie, myszy były losowo przypisane do grupy kontrolnej dostającej zastrzyki z soli przez cały czas trwania eksperymentu (grupa ta określana jest w rozprawie jako Sól) lub do jednej z dwóch grup badanych. Pierwsza grupa badana otrzymywała zastrzyki z kokainy przez siedem kolejnych dni (Kokaina 7 d). Drugą grupę badaną stanowiły myszy, które otrzymywały zastrzyk z soli fizjologicznej przez sześć kolejnych dni oraz zastrzyk z kokainy podczas ostatniego dnia trwania eksperymentu (Kokaina 1 d). Myszy były uśmiercane 2 godz. po otrzymaniu ostatniego zastrzyku. Schemat ekspozycji myszy na nagrodę farmakologiczną przedstawiony został na rycinie 12 A.

Stosowaną nagrodą naturalną była ekspozycja myszy na słodką wodę. W tym przypadku, całość procedury również trwała 9 dni, podczas których każdorazowo na 2 godz. dziennie mysz umieszczana była w klatce z dostępem do butelki z wodą lub 7,5% roztworem sacharozy w wodzie. Przez pierwsze dwa dni, każda z myszy była przyzwyczajana do procedury i otrzymywała do nowej klatki butelkę z wodą. Następnie, myszy były losowo przypisane do grupy kontrolnej, otrzymującej butelkę z wodą przez cały czas trwania eksperymentu (grupa ta określana jest w rozprawie jako Woda), lub do którejś z dwóch grup badanych. Pierwsza grupa badana otrzymywała słodką wodę przez siedem kolejnych dni

(Cukier 7 d). Drugą grupę badaną stanowiły myszy, które otrzymały zwykłą wodę przez sześć kolejnych dni oraz słodką wodę ostatniego dnia trwania eksperymentu (Cukier 1 d). Myszy były uśmiercane 2 godz. po ostatnim podmienieniu butelki. Schemat ekspozycji myszy na nagrodę naturalną przedstawiony został na rycinie 12 B.

Myszy linii DRD1-TdTomato/DRD2-GFP, które zostały wykorzystane do eksperymentów z objętościowym obrazowaniem mózgu, podczas ekspozycji na nagrodę naturalną, w trakcie trwania eksperymentu miały dostęp do dwóch butelek przez 2 godz. dziennie. Jedna butelka zawsze zawierała wodę a druga, w zależności od grupy, wodę lub 7,5% roztwór sacharozy. W rozprawie grupy te są tak samo określane jak powyżej, tj. jako Woda, Cukier 1 d oraz Cukier 7 d.



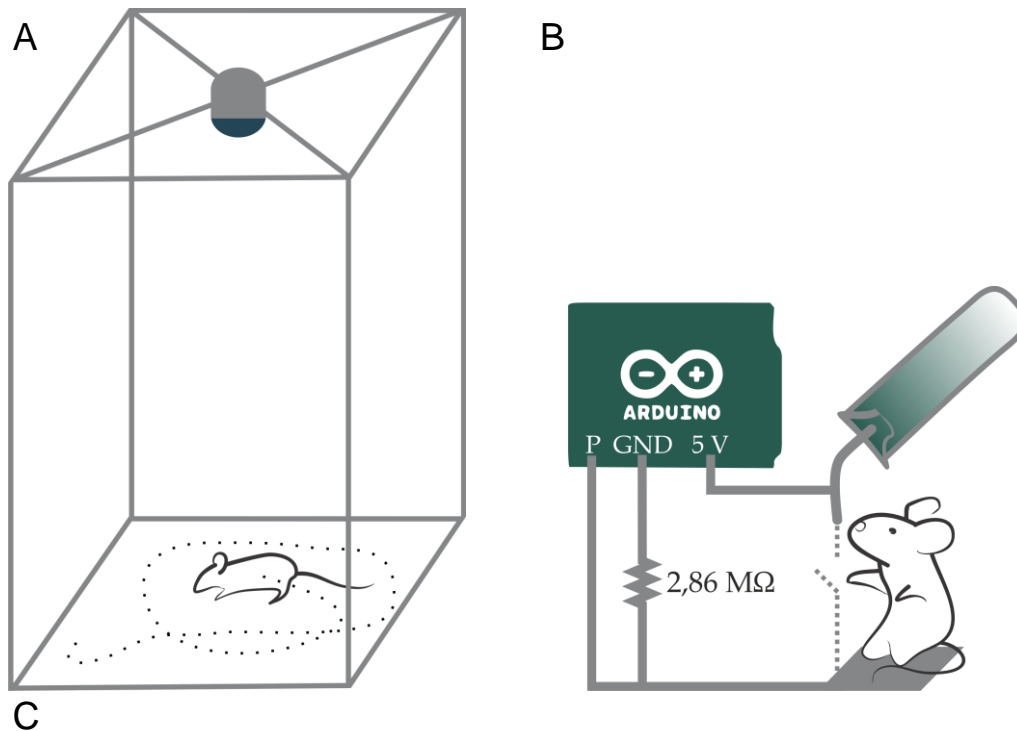
**Ryc. 12: Schematy stosowanych modeli ekspozycji zwierzęcia na nagrodę farmakologiczną (A) oraz naturalną (B).** **A)** Każdego dnia mysz dostawała zastrzyk z soli fizjologicznej lub z 20 mg/kg m.c. roztworu kokainy. Po prawej stronie schematów umieszczono nazwy grup używane dalej w tekście: Sól – grupa kontrolna, Kokaina 1 d – grupa dostająca jeden dzień zastrzyk z kokainy w trakcie ostatniego dnia trwania eksperymentu, Kokaina 7 d – grupa otrzymująca zastrzyki z kokainy przez 7 kolejnych dni. **B)** Każdego dnia mysz umieszczano w klatce z butelką z wodą lub z butelką zawierającą 7,5% roztwór sacharozy. Po prawej stronie nazwy grup używane dalej w tekście: Woda – grupa kontrolna, Cukier 1 d – grupa z dostępem do roztworu sacharozy przez 2 godz. w trakcie ostatniego dnia trwania eksperymentu, Cukier 7 d – grupa z dostępem do roztworu sacharozy przez siedem kolejnych dni.

### 3.2.3. Monitorowanie zachowania zwierząt eksponowanych na nagrody

Podczas trwania eksperymentów behawioralnych, część losowo wybranych zwierząt miała monitorowaną aktywność behawioralną podczas ekspozycji na nagrody.

Do mierzenia efektów behawioralnych nagrody farmakologicznej (kokainy), mysz zaraz po zastrzyku była wkładana do klatki o wymiarach 20 x 30 cm, nad którą umieszczona była kamera (Ryc. 13A). Mysz eksplorowała nową klatkę przez 30 min, po czym na powrót była umieszczana w klatce domowej. Filmy w 67 klatkach/s nagrywano kamerą FLIR Blackfly S BFS-U3-16S2C z obiektywem Computar (A4Z2812CS-MPIR). Uzyskane filmy zostały następnie przetworzone programem EthoVision XT (Noldus, wersja 13) w którym do wykrycia zwierzęcia wykorzystano różnicę w odcieniach szarości zwierzęcia i podłoża (tzw. tworzenie odcięcie od tła). Program automatycznie zliczał odległość przebytą przez mysz w czasie trwania eksperymentu.

Do mierzenia efektów behawioralnych ekspozycji zwierzęcia na nagrodę naturalną wykorzystano samodzielnie skonstruowany czujnik bazujący na mikrokontrolerze Arduino Leonardo. Mysz na 2 godz. umieszczana była w klatce o spodzie i pokrywie z tworzywa sztucznego zapewniającego izolację elektryczną (Tecniplast). W nowej klatce, bezpośrednio pod butelką umieszczona była stalowa płytką. Zarówno butelka, jak i metalowa płytką podłączone były do mikrokontrolera wg. schematu przedstawionego na rycinie 13B. Arduino było urządzeniem wysyłającym niewielki prąd o niewykrywalnym dla myszy natężeniu i jednocześnie rejestrującym przepływ tego prądu. Działanie urządzenia oparte było na zamknięciu obwodu elektrycznego, które następowało w momencie picia przez mysz płynu z butelki. Odczyty z Arduino zapisywano przy pomocy programu CoolTerm 2.0.



C // Lickometer

```

const int Bottle = 12; // Zdefiniuj Pin wykrywający przepływ prądu (P)
int Detect = 0;
void setup()
{
}
void loop()
{
  Detect = digitalRead(Bottle);
  if (Detect == HIGH)
  {
    Serial.println("Drink"); // Informacja "Drink" w momencie wykrycia przepływu prądu
  }
}

```

**Ryc. 13: Monitorowanie behawioru zwierząt eksponowanych na nagrody.** A) Zwierzę po podaniu zastrzyku dootrzewnowego wkładane było na 30 min do osobnej klatki, nad którą umieszczona była kamera. B) Zwierzę umieszczano w klatce, w której butelka podłączona była do wyjścia 5 V mikrokontrolera Arduino. Bezpośrednio pod butelką umieszczona była metalowa płytki, podłączona do pinu z uziemieniem w Arduino (GND). Gdy mysz stanie na płytce oraz dotknie butelki, następuje zamknięcie obwodu, które wykrywane jest przez jeden z pinów (P) wejściowych Arduino. C) Kod obsługujący mikrokontroler Arduino do mierzenia picia przez mysz.

### 3.2.4. Chemogenetyczna manipulacja aktywnością neuronów jądra środkowego ciała migdałowatego

W eksperymentach tych, myszy linii GAD65-tdTomato w pierwszym etapie badań otrzymały domózgową iniekcję wektorów wyprowadzonych z wirusów zależnych od adenowirusów (ang. *adeno-associated viruses*; AAV), umożliwiającą w neuronach translację zaprojektowanego receptora aktywowanego wyłącznie przez sztuczny ligand (ang. *designer receptor exclusively activated by designer drugs*; DREADD)<sup>177</sup>. Wykorzystano dwa typy takiego receptora: hamującego pobudliwość neuronalną hM4Di (AAV1/2 hSyn-DIO-hM4D(Gi)-mCherry w ilości 300 nl i w mianie  $2,77 \times 10^9$  vg/ml) i zwiększającego pobudliwość neuronalną hM3Dq (AAV1/2 hSyn-DIO-hM3D(Gq)-mCherry w ilości 300 nl i w mianie  $2,88 \times 10^9$  vg/ml).

Wirus wprowadzono stereotaktycznie do obu półkul mózgu zwierzęcia podczas operacji. W pierwszym etapie operacji zwierzę poddano anestezji wziewnej (1,5% izofluranu we wdychanym powietrzu) i zdezynfekowano jej skalp 70% alkoholem etylowym. Następnie nacięto skórę na głowie myszy, by odsłonić jej czaszkę. Po wyznaczeniu na czaszce punktów bregmy oraz lambdy, zastosowano następujące koordynaty w osiach: poprzecznej (łac. *Medial-lateral*; ML) =  $\pm 2,2$ ; strzałkowej (łac. *anterior-posterior*; AP) = -1,3; pionowej (łac. *dorsal-ventral*; DV) = -4,6). Zawiesinę zawierającą wirusa w objętości po 300 nl na każdą półkulę wprowadzono do mózgu myszy z prędkością 75 nl/min.

Po operacji myszy otrzymały szereg dootrzewnowych zastrzyków z leków rozpuszczonych w soli fizjologicznej: enrofloksacynę (2,5 mg/kg m.c.), butorfanol winianu (3,3 mg/kg m.c.) i kwas tolfenamowy (2,0 mg/kg m.c.) oraz zostały poddane czterotygodniowej rekonwalescencji. Po tym czasie zostały eksponowane na nagrody wg schematów przedstawionych w 3.2.3 z tą różnicą, że 30 min przed każdą ekspozycją dostawały zastrzyk IP z soli fizjologicznej lub z N-tlenku klozapiny (ang. *clozapine-N-oxide*, CNO) rozpuszczonej w soli fizjologicznej. Podczas dwóch pierwszych dni, w których zwierzę habituowano do eksperymentu, podawano tylko zastrzyk 100  $\mu$ l z soli fizjologicznej. W trakcie kolejnych siedmiu dni eksperymentu, mysz dostawała zastrzyki 1 mg/kg m.c. CNO rozpuszczonej w soli fizjologicznej<sup>177</sup>.

By sprawdzić wpływ samej operacji i zastrzyków z CNO na zachowania zwierzęcia, część eksperymentów wykonano na zwierzętach, które otrzymały domózgowy zastrzyk z wirusa pozbawionego DREADD (AAV1/2 hSyn-mCherry w ilości 300 nl w mianie  $2,1 \times 10^9$  vg/ml).



### **3.3. Pomiary elektrofizjologiczne**

#### **3.3.1. Przygotowanie skrawków do badań elektrofizjologicznych**

2 godz. po ostatnim zastrzyku lub 2 godz. po ostatnim podmienieniu butelki z wodą, zwierzę było usypiane w ekzykatorze z 5% mieszaniną izofluranu i powietrza. Mysz była uśmiercana przez dekapitację, a jej mózg ekstrahowano i umieszczano w roztworze NMDG (135 mM N-metylo-D-glukamina; 1,2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 1 mM KCl; 1,5 mM  $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ ; 0,5 mM  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ ; 10 mM D-glukozy; 20 mM dwuwęglanu choliny) natlenowanego karbogenem (mieszanina 5%  $\text{CO}_2$  i 95%  $\text{O}_2$ ) o temp.  $0^\circ\text{C}$ . Mózg przyklejano klejem akrylamidowym do platformy oraz przekrawano go na pół w celu rozdzielania półkul mózgowych. Następnie umieszczano go w waniencie wibratomu Leica VT 1200 S wypełnionej roztworem NMDG o temp.  $0^\circ\text{C}$  i krojono w płaszczyźnie czołowej na skrawki o grubości 250  $\mu\text{m}$ . Pocięte skrawki umieszczano w komorze inkubacyjnej wypełnionej roztworem sztucznego płynu mózgowo rdzeniowego (ACSF; o składzie: 119 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 26 mM  $\text{NaHCO}_3$ ; 1,3 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 1 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 20 mM D-glukoza; 2,5 mM  $\text{CaCl}_2$ ) natlenowanego karbogenem i podgrzany do  $31^\circ\text{C}$ . Po 10 min skrawki mózgu inkubowano jeszcze przez co najmniej godzinę w temperaturze pokojowej. Po tym czasie, skrawki z widocznym jądrem środkowym ciała migdałowatego (6-8 skrawków) pojedynczo umieszczano pod mikroskopem w komorze ze stałym przepływem roztworu ACSF wzbogaconego o pikrotoksynę w stężeniu 100  $\mu\text{M}$ .

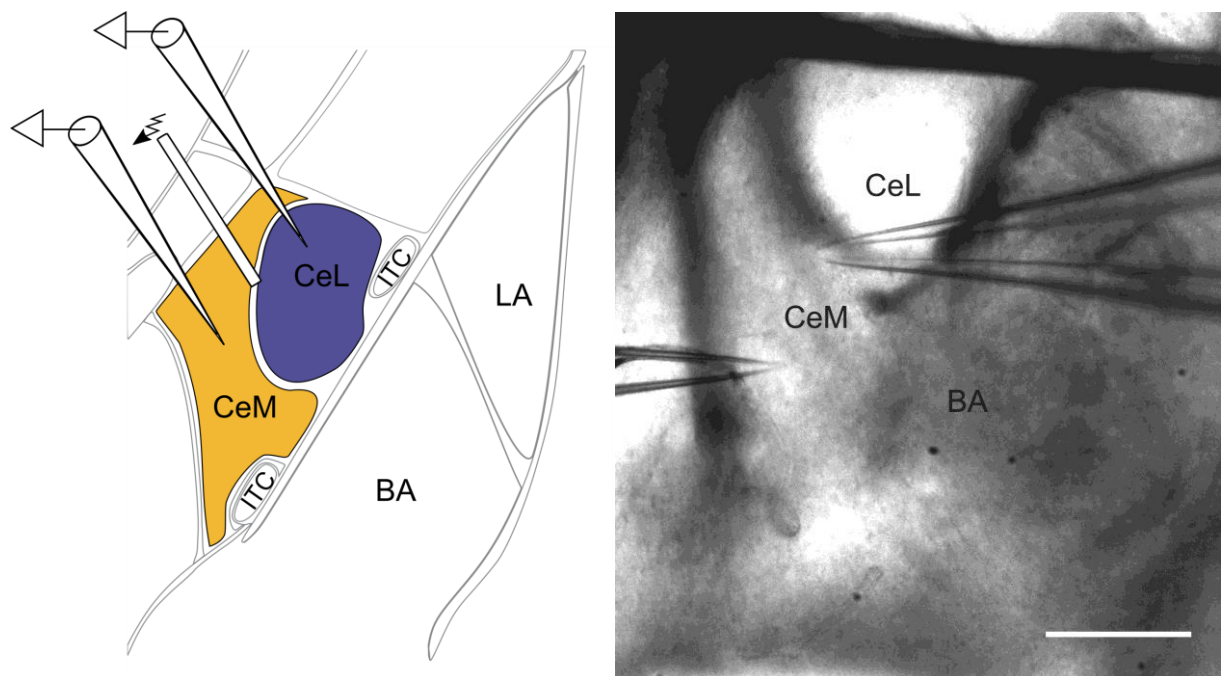
#### **3.3.2. Pomiary elektrofizjologiczne**

Skrawki mózgu unieruchamiano za pomocą harfy do elektrofizjologii i wstępnie określano na nich lokalizację CeA. Następnie pod obiektywem z powiększeniem 4X rozróżniano część przysrodkową oraz boczną CeA i wszystkie następne eksperymenty były wykonywane z rozróżnieniem tych części.

Do eksperymentów techniką patch-clamp wykorzystywano elektrody wykonane ze szkła borosilikanowego o oporze końcowym 4-6  $\text{M}\Omega$ . Elektrody wypełnione były jednym z dwóch roztworów elektrodowych o pH 7,1 i osmolarności 290-295 mOsm: cezowym (130 mM  $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{CsO}_7$ ; 3 mM TEA-Cl; 0,4 mM EGTA; 20 mM HEPES; 4 mM QX-314Cl; 0,3 mM  $\text{Na}_2\text{-ATP}$ ; 0,25 mM  $\text{Na}_3\text{-GTP}$ ) lub potasowym (120 mM  $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{KO}_7$ ; 2 mM  $\text{MgCl}_2$ ;

0,4 mM EGTA; 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>; 10 mM HEPES; 2,5 mM Na<sub>2</sub>-ATP; 0,25 mM Na<sub>3</sub>-GTP). Połączenie z komórką wykonywano pod obiektywem 63X i po udanym przerwaniu błony komórkowej odczekiwano 5 min na ustabilizowanie się połączenia. Wszystkie pomiary elektrofizjologiczne wykonane zostały przy użyciu programu Igor PRO (Wavemetrics) w systemie ze wzmacniaczem (npi ELC03XS) i przetwornikiem analogowo-cyfrowym (ITC-18, InstruTECH/HEKA), przetwarzającymi nagrywany sygnał w 10 kHz i filtrującymi go w 2 kHz. W trakcie trwania nagrań monitorowano opór szeregowy (ang. *series resistance*) i wejściowy (ang. *input resistance*).

W przypadku protokołów elektrofizjologicznych wymagających elektrycznej stymulacji projekcji do CeA, stosowano dodatkowo elektrodę stymulującą. W tym celu, szklane elektrody z przegrodą wypełniano ACSF i umieszczano na skrawku w miejscu przechodzenia projekcji aksonalnych do CeA (Ryc. 14).



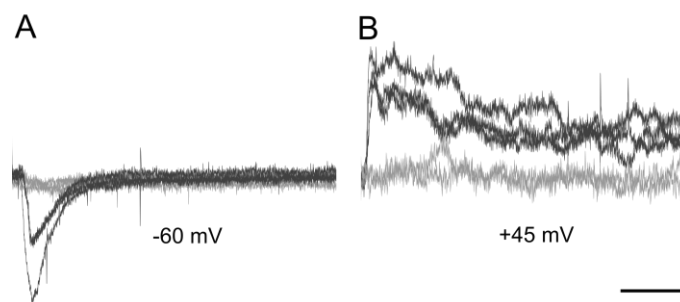
**Ryc. 14: Umiejscowienie elektrod nagrywających oraz elektrody stymulującej podczas pomiarów elektrofizjologicznych. A)** Schemat umiejscowienia elektrod w obszarze CeA. Elektrody rejestrujące były używane do pomiaru prądów pochodzących z neuronów w obszarze CeL lub CeM. Elektrodę stymulującą umieszczano pomiędzy CeM i CeL, w miejscu przebiegu projekcji do tych jąder. **B)** Zdjęcie obszaru CeA z umieszczoną elektrodą rejestrującą w CeM oraz elektrodą stymulującą na granicy CeM a CeL. Skala 200  $\mu$ m. LA – jądro migdałowe boczne; BA – jądro migdałowe podstawne; CeL – boczna część środkowego jądra ciała migdałowatego; CeM – przyśrodkowa część jądra środkowego ciała migdałowatego; ITC – jądra wtrącone.

### 3.3.2.A Pomiary milczących synaps

Do pomiaru poziomu milczących synaps w komórce wykorzystano protokół minimalnej stymulacji (ang. *minimal stimulation protocol*, MSP), polegający na porównaniu efektywności przewodności zależnej od AMPAR i od NMDAR.

Rejestracje prowadzono w trybie ustalonego napięcia (ang. *voltage-clamp*; VC) i przy wypełnieniu elektrod roztworem cesowym. Projekcje do CeA stymulowane były prądem z elektrody stymulującej z częstotliwością 0,2 Hz. Jako pierwsze nagrywano prądy zależne od AMPAR, które były izolowane przez ustalenie napięcia błony komórkowej na -60 mV. Napięcie prądu stymulującego ustalano w taki sposób, by wywoływał odpowiedzi komórki tylko w ok. 50% (Ryc. 15). Po 30 cyklach stymulacji potencjał błonowy był stopniowo zmieniany na dodatni uważając, by nie doprowadzić do pogorszenia jakości połączenia z komórką. Po ustaleniu napięcia błonowego na +45 mV, umożliwiającą obserwację prądów zależnych od NMDAR, kontynuowano stymulację z poprzednio ustalonym napięciem na elektrodzie stymulującej. W zależności od jakości połączenia z komórką, protokół ten powtarzano dwu- lub trzykrotnie.

Po zakończeniu nagrań zliczano liczbę odpowiedzi pochodzących od AMPAR i od NMDAR, które były wywołane stymulacją o danym napięciu. Odpowiedź uznawano za dodatnią, gdy jej amplituda wynosiła co najmniej 5 mV. Do określenia poziomu milczących synaps używano następującego wzoru:  $\% \text{ milczących synaps} = 1 - \frac{\ln F(-60mV)}{\ln F(+45mV)}$ , gdzie  $F(-60mV)$  i  $F(+45mV)$  oznaczają współczynnik braku odpowiedzi do 30 prób stymulacji.



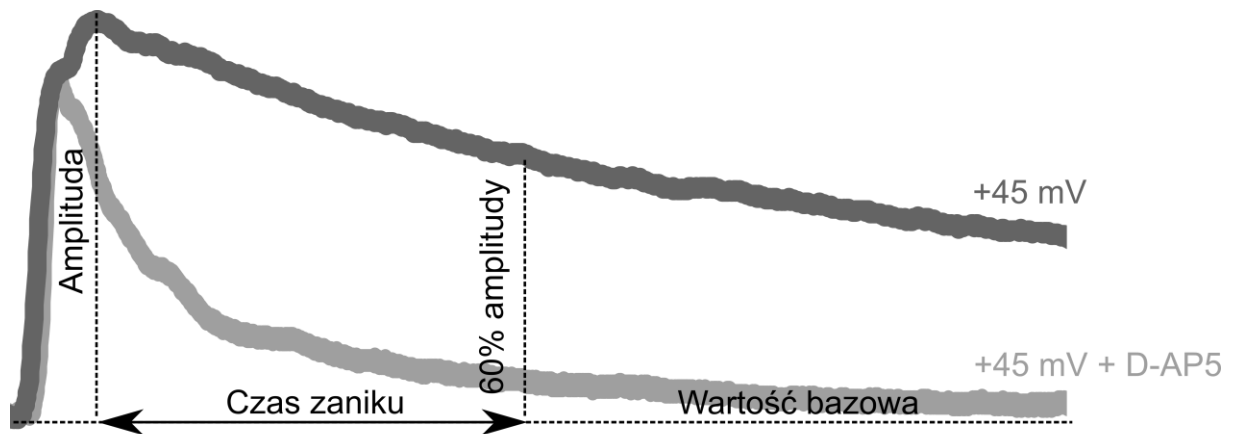
**Ryc. 15: Przebieg 5 kolejnych odpowiedzi zależnych od AMPAR (A) i od NMDAR (B).** A) Odpowiedzi pochodzące od AMPAR nagrywano przy potencjale błonowym ustalonym na -60 mV. B) Odpowiedzi pochodzące od NMDAR nagrywano przy potencjale błonowym ustalonym na +45 mV. Pionowa skala w rogu odpowiada 10 pA, a pozioma 25 ms.

### 3.3.2.B Pomiary kinetyki prądów zależnych od NMDAR

Pomiary kinetyki prądów zależnych od NMDAR wykonywano w trybie VC, przy potencjale błonowym ustalonym na +45 mV i z wykorzystaniem cezowego płynu elektrodowego. Stymulację projekcji dochodzących do komórki wykonywano 50-krotnie z częstotliwością 0,2 Hz prądem o napięciu wystarczającym do każdorazowego wywołania odpowiedzi komórki.

Odpowiedzi pochodzące od NMDAR były uśredniane i analizowane programem Clampfit (wersja 10.3). Czas zaniku (ang. *decay time*) odpowiedzi zależnych od NMDAR określano jako czas, w którym nagrywany prąd malał do 60% swojej amplitudy (Ryc. 16).

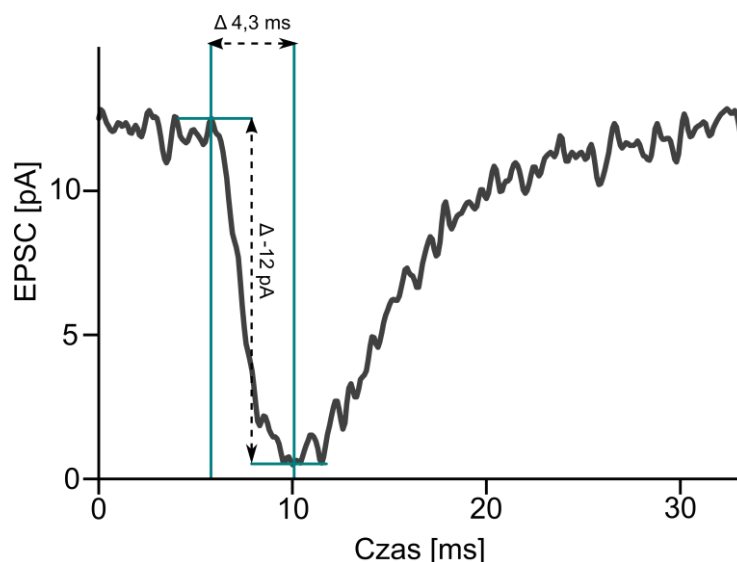
Przy potencjale błonowym +45 mV nagrywane prądy miały również komponent pochodzący od AMPAR, co potencjalnie niosło ryzyko błędnego określenia piku odpowiedzi zależnych od NMDAR. Komponent pochodzący od AMPAR był widoczny w niektórych nagraniach, co objawiało się dwoma widocznymi pikami, jednak jego maksimum było zawsze niższe niż komponentu pochodzącego od NMDAR. W dodatku, kinetyka prądów zależnych od NMDAR jest inna od tych pochodzących od AMPAR i ich pik następował o parę ms później w stosunku do stymulacji. Niemniej jednak, wykonano część dodatkowych eksperymentów z blokerem receptorów NMDAR, 50  $\mu$ M kwasu DL-2-amino-5-fosfopentanowy (D-AP5) by zobrazować komponent pochodzący od AMPAR. Potwierdzono, że przy +45 mV komponent pochodzący od AMPAR był niewielką składową nagrywanych prądów (Ryc. 16).



**Ryc. 16: Czas zaniku odpowiedzi zależnej od NMDAR.** Czas zaniku (ang. *decay time*) odpowiedzi mierzonej przy +45 mV (kolor ciemnoszary) oraz przy +45 mV z dodatkiem D-AP5 (inhibitora NMDAR; kolor jasnoszary). Czas zaniku odpowiedzi zależnej od NMDAR określano jako czas, w którym nagrywany prąd malał do 60% maksymalnej amplitudy.

### 3.3.2.C Pomiary spontanicznej aktywności neuronalnej

Pomiary spontanicznej aktywności neuronalnej wykonywano poprzez nagrywanie spontanicznych pobudzających prądów postsynaptycznych (sEPSCs; ang. *spontaneous excitatory postsynaptic currents*) w trybie VC przy potencjale błonowym ustalonym na -60 mV i z wykorzystaniem potasowego płynu elektrodowego. Nagrania trwały 20 min, a do ich analizy wykorzystano program Clampfit (wersja 10.3). Odpowiedzi zależne od AMPAR były wykrywane na podstawie ich podobieństwa do odpowiedzi wzorcowej (Ryc. 17).



**Ryc. 17: Wzorcowa spontaniczna odpowiedź zależna od AMPAR użyta do wykrywania sEPSCs.** Wzorcowa odpowiedź używana była do automatycznego wykrywania kolejnych zdarzeń podczas nagrań prądów spontanicznych. EPSC – pobudzający prąd postsynaptyczny.

### 3.3.2.D Pomiary długotrwałego osłabienia postsynaptycznego

Pomiary LTD wykonywano w trybie VC przy potencjale błonowym ustalonym na  $-60$  mV i z wykorzystaniem cezowego płynu elektrodowego. Stymulację projekcji dochodzących do komórki wykonywano z częstotliwością  $0,2$  Hz prądem o napięciu wystarczającym do każdorazowego wywołania odpowiedzi komórki. LTD wywoływano chemicznie poprzez aktywację receptorów mGluR1/5 na powierzchni neuronów. W tym celu, przez  $15$  min przemywano skrawek  $50$   $\mu$ M 3,5-dihydroksyfenyloglicyną (DHPG) rozpuszczoną w ACSF.

### 3.3.2.E Pomiary pobudliwości komórek

Pomiary pobudliwości neuronów nagrywano w trybie ustalonego natężenia (ang. *current clamp*; CC) przy potencjale błonowym ustalonym na  $-60$  mV i z wykorzystaniem potasowego płynu elektrodowego. W przypadku tych nagrań, elektroda nagrywająca była jednocześnie elektrodą stymulującą. Komórki nerwowe stymulowano prądem w zakresie  $0$ - $200$  pA z krokiem  $10$  pA. Dla każdego kroku stosowano  $3$  powtórzenia. Modele zależności liczby wywołanych potencjałów od natężenia prądu stymulującego dla neuronów wykonano

metodą regresji nieliniowej. Parametry potencjałów wywołanych mierzono dla drugiego potencjału wywołanego przez stymulację prądem o wartości 160 pA.

### **3.4. Utrwalanie tkanek i ich przygotowanie do dalszej analizy**

#### **3.4.1. Wypełnianie neuronów biocytyną i ich utrwalanie po pomiarach elektrofizjologicznych**

W trakcie nagrań sEPSCs komórek nerwowych z myszy linii D1-TdTomato/D2-GFP, do potasowego płynu elektrodowego dodawano biocytynę w stężeniu 5 mM. Po skończeniu nagrania, VC zmieniano na CC i komórkę stymulowano jeszcze przez 10 min prądem o natężeniu 20 pA w celu rozprzestrzenienia się biocytyny w ciele komórki. Następnie, skrawki utrwalano 30 min w 4% PFA w PBS w temperaturze 4°C. Utrwalone skrawki mózgow przechowywano w 4°C PBS z dodatkiem azydku sodu w stężeniu 0,02 M.

#### **3.4.2. Utrwalanie perfuzyjne**

2 godz. po ostatnim zastrzyku lub 2 godz. po rozpoczęciu ostatniej ekspozycji zwierzęcia na nagrodę naturalną, mysz była usypiana metodą wziewną za pomocą 5% mieszaniny izofluranu i powietrza. Po ustaniu odruchów bólowych, zwierzęta były uśmiercane dootrzewnowym zastrzykiem 50 mg/kg m.c. pentobarbitalu sodu. Po sprawdzeniu braku wrażliwości na bodźce zewnętrzne, mysz była perfundowana solą fizjologiczną buforowaną fosforanami (PBS; ang. *phosphate-buffered saline*) z dodatkiem 0,01 M heparyny w temperaturze 4°C. Perfuzję przeprowadzano przez lewą komorę serca przy jednoczesnym rozcięciu prawego przedsionka serca. Po 10 min perfuzji PBS, do serca wpompowywano 4% roztwór paraformaldehydu (PFA) w PBS w temperaturze 4°C.

Następnie mózgi myszy ekstrahowano i pozostawiano je w temperaturze 4°C na 24 godz. w 4% PFA w PBS. Próbki przechowywano w 4°C PBS z dodatkiem azydku sodu w stężeniu 0,02 M.

### **3.4.3. Przygotowanie skrawków mózgowych przy użyciu wibratomu**

Utrwalone paraformaldehydem mózgi cięto na wibratomie Leica VT 1200 S w płaszczyźnie czołowej na 70  $\mu\text{m}$  skrawki i przechowywano je w 4°C PBS z dodatkiem azydku sodu w stężeniu 0,02 M.

## **3.5. Barwienia immunohistochemiczne skrawków tkanki mózgowej, ich obrazowanie mikroskopowe oraz dalsza analiza**

### **3.5.1. Analiza rozmieszczenia komórek wrażliwych na dopaminę w CeA**

#### **3.5.1.A Barwienia komórek wrażliwych na dopaminę**

Wszystkie etapy barwienia wykonywano na kołysce laboratoryjnej. W pierwszym etapie skrawki mózgowi myszy z widocznym CeA przemywano czterokrotnie po 5 min PBS w temp. pokojowej. Następnie, na 10 min umieszczano w roztworze permabilizującym błonę komórkową (0,25% roztwór Tritonu X-100 w PBS), by później przemyć je przez 3 godz. w temp. pokojowej roztworem blokującym składającym się z 0,1% roztworu Tritonu X-100 i 3% surowiczej albuminy wołowej (BSA) w PBS. Po tym czasie roztwór wymieniało na roztwór 0,1% Tritonu X-100 i 0,1% BSA w PBS, zawierający przeciwciała pierwszorzędowe: anti-GFP (Abcam ab13970; stężenie 1:1500) oraz anti-mCherry (ThermoFisher M11217; stężenie 1:1500) i inkubowano w nim skrawki przez 24 godz w 4°C. W kolejnym etapie, skrawki mózgowi powtórnie przemywano czterokrotnie po 5 min PBS, by później inkubować je w temp. pokojowej przez 3 godz. w roztworze przeciwciał drugorzędowych w PBS. Przed dodaniem do skrawków roztworu drugorzędowych przeciwciał skoniugowanych z barwnikami Alexa Fluor 488 (ThermoFisher A-11039; stężenie 1:400) oraz Alexa Fluor 555 (Abcam ab150158; stężenie 1:400), był on odwirowywany przez 10 min z prędkością 20000 g w celu pozbycia się złożeń przeciwciał. W końcowym etapie barwienia, skrawki płukano jeszcze raz w PBS w temp. pokojowej i nakładano w kropli medium zatapiającego (Fluoromont-G-DAPI) na szkiełkach podstawowych i przykrywano je szkiełkami nakrywkowymi.



### **3.5.1.B Obrazowanie komórek wrażliwych na dopaminę w CeA**

Preparaty skrawków mózgu z wybarwionymi fluorescencyjnie komórkami wrażliwymi na Da obrazowano przy pomocy odwróconego mikroskopu konfokalnego Axio Observer Z.1 (Zeiss LSM 780). Zdjęcia wykonywano przy wykorzystaniu obiektywów 10x (suchy, apochromatyczny, NA = 0,3) oraz 40x (olejowy, apochromatyczny, NA = 1,4) w rozdzielczości 1024 x 1024 pxl. Do wzbudzania fluorescencji wykorzystano lasery diodowe o długości fali 405 nm i 561 nm oraz laser argonowy o długości fali 488 nm. Spektra zbierania sygnału dla ultrafioletu wynosiły 340-350 nm, dla zieleni 510-530 nm i dla czerwieni 575-590 nm. Zdjęcia zbierano w kanale ultrafioletu (sygnał pochodzący z jąder komórkowych), zieleni (sygnał z komórek DRD2+) oraz bliskiej czerwieni (sygnał pochodzący z komórek DRD1+).

Najpierw z obszaru CeA zbierano obiektywem 10x po 2-3 zdjęcia w odstępach 25  $\mu$ m wzdłuż osi obrazowania (z). Później obiektywem 40x zbierano po 2-4 zdjęcia w odstępach 15  $\mu$ m z CeM i CeL.

### **3.5.1.C Analiza rozmieszczenia komórek wrażliwych na dopaminę w CeA**

Zdjęcia spod obiektywu 40x analizowano przy użyciu pakietu do przetwarzania obrazów Fiji. Przy pomocy rozszerzenia do Fiji, Cell-Counter, liczono komórki DRD1+ i DRD2+ oraz jądra komórkowe dla każdej zobrazowanej płaszczyzny.

## **3.5.2. Analiza lokalizacji c-Fos**

### **3.5.2.A Barwienia białka c-Fos**

Wszystkie etapy barwienia wykonywano na kołysce laboratoryjnej. W pierwszym etapie barwienia, skrawki mózgow z widocznym CeA przemywano czterokrotnie po 5 min PBS w temp. pokojowej. Następnie na 10 min umieszczano w roztworze permabilizującym błonę komórkową (0,25% roztwór Tritonu X-100 w PBS), by później przemyć je roztworem blokującym (roztwór 0,1% Triton X-100 i 3% BSA w PBS) przez 3 godz. w temp. pokojowej. Po tym czasie roztwór wymieniało na roztwór 0,1% Tritonu X-100 i 0,1% BSA w PBS zawierający przeciwciała pierwszorzędowe anti-c-Fos (Synaptic Systems 226 003; stężenie

1:2000) i inkubowano w nim skrawki przez 24 h w 4°C. W kolejnym etapie skrawki mózgow powtórnie przemywano czterokrotnie po 5 min PBS, by później inkubować je w temp. pokojowej przez 3 godz. w roztworze przeciwciał drugorzędowych w PBS. Roztwór drugorzędowych przeciwciał skoniugowanych z barwnikiem Alexa Fluor 647 (Thermo Fisher A32733) był przed inkubacją odwirowywany przez 10 min z prędkością 20000 g w celu pozbycia się złożeń przeciwciał. W końcowym etapie barwienia, skrawki płukano jeszcze raz w PBS w temp. pokojowej i nakładano w kropli medium zatapiającego (Fluoromont-G-DAPI) na szkiełkach podstawowych i przykrywano je szkiełkami nakrywkowymi.

W przypadku skrawków mózgu pochodzących z linii myszy DRD1-TdTomato/DRD2-GFP, roztwór przeciwciał pierwszorzędowych zawierał dodatkowo przeciwciała anti-GFP (Abcam ab13970; stężenie 1:1500) oraz anti-mCherry (ThermoFisher M11217; stężenie 1:1500), a roztwór przeciwciał drugorzędowych zawierał również przeciwciała Alexa Fluor 488 (ThermoFisher A11039; 1:400) oraz Alexa Fluor 555 (Abcam; 150158).

### **3.5.2.B Obrazowanie białka c-Fos**

Preparaty skrawków mózgu z wybarwionym fluorescencyjnie białkiem c-Fos obrazowano przy pomocy odwróconego mikroskopu konfokalnego Axio Observer Z.1 (Zeiss LSM 780). Zdjęcia wykonywano przy wykorzystaniu obiektywu 10x (suchy, apochromatyczny, NA = 0,3) w rozdzielczości 2048 x 2048 pxl. Z obszaru CeA zbierano po 2-3 zdjęcia w odstępach 25 µm wzdłuż osi obrazowania (z). Do wzbudzania fluorescencji wykorzystano lasery diodowe o długości fali 405 nm i 561 nm, laser argonowy o długości fali 488 nm oraz laser helowo-neonowy o długości fali 633 nm. Spektra zbierania sygnału dla ultrafioletu wynosiły 340-350 nm, dla zieleni 510-530 nm, dla czerwieni 575-590 nm i dla dalekiej czerwieni 640-680 nm.

Zdjęcia zbierano w kanale ultrafioletu (sygnał pochodzący z jąder komórkowych). zieleni (sygnał z komórek DRD2+ lub z autofluorescencji), bliskiej czerwieni (sygnał pochodzący z komórek GAD65- lub DRD1+) i dalekiej czerwieni (sygnał pochodzący z wybarwionego c-Fos).

### **3.5.2.C Analiza poziomu białka c-Fos**

Zdjęcia analizowano przy użyciu pakietu do przetwarzania obrazów Fiji. Na początku, zdjęcia ze wszystkich płaszczyzn były sumowane, by później w uśrednionych obrazach ustalić kontrast uwidaczniający jądra komórkowe z wybarwionym białkiem c-Fos. Endogenna fluorescencja w komórkach z GAD65 lub dopamino-wrażliwych oraz układ anatomiczny projekcji do CeA posłużyły do wyróżnienia CeM oraz CeL. Następnie, przy pomocy rozszerzenia do programu Fiji, Cell-Counter, liczono c-Fos-pozytywne (c-Fos+) jądra komórkowe.

W przypadku skrawków pochodzących z myszy GAD65-TdTomato, granice CeM i CeL wyznaczano manualnie. Ich pole powierzchni oraz grubość mierzonych skrawków posłużyły do wyliczenia objętości wyszczególnionych jąder. Dane z tej analizy przedstawiono jako liczbę komórek c-Fos+ /objętość badanego obszaru.

W przypadku skrawków pochodzących z myszy DRD1-TdTomato/DRD2-GFP, w obrębie CeM i CeL tworzono kwadraty o boku 600 pxl i w ich obszarach liczono neurony c-Fos+. Wyniki analizy tych obrazów przedstawiono jako liczbę komórek c-Fos+/badany obszar.

### **3.5.3. Analiza poziomu i lokalizacji białka Arc**

#### **3.5.3.A Barwienia białka Arc**

Wszystkie etapy barwienia wykonywano na kołysce laboratoryjnej. W pierwszym etapie barwienia, skrawki mózgow z widocznym CeA przemywano czterokrotnie po 5 min PBS w temp. pokojowej. Następnie na 10 min umieszczano skrawki w roztworze permabilizującym błonę komórkową (0,25% roztwór Tritonu X-100 w PBS), by później przemyć je roztworem blokującym (roztwór 0,1% Triton X-100 i 3% BSA w PBS) przez 3 godz. w temp. pokojowej. Po tym czasie roztwór wymieniało na roztwór 0,1% Tritonu X-100 i 0,1% BSA w PBS zawierający przeciwciała pierwszorzędowe anti-Arc (Synaptic Systems 156 003; stężenie 1:1500) i inkubowano w nim skrawki przez 24 godz. w 4°C. W kolejnym etapie, skrawki mózgow powtórnie przemywano czterokrotnie po 5 min PBS, by później inkubować je w temp. pokojowej przez 3 godz. w roztworze przeciwciał drugorzędowych w PBS. Przed dodaniem do skrawków, roztwór drugorzędowych przeciwciał skoniugowanych z barwnikiem Alexa Fluor

647 (Thermo Fisher A32733) był odwirowywany przez 10 min z prędkością 20000 g w celu pozbycia się złożeń przeciwciał. W końcowym etapie barwienia skrawki płukano jeszcze raz w PBS w temp. pokojowej i nakładano w kropli medium zatapiającego (Fluoromont-G-DAPI) na szkiełkach podstawowych i przykrywano je szkiełkami nakrywkowymi.

### **3.5.3.B Obrazowanie białka Arc**

Preparaty skrawków mózgu z wybarwionym fluorescencyjnie białkiem Arc obrazowano przy pomocy odwróconego mikroskopu konfokalnego Axio Observer Z.1 (Zeiss LSM 780). Zdjęcia wykonywano przy wykorzystaniu obiektywu 63x (olejowy, apochromatyczny o NA = 1,4) w rozdzielczości 1024 x 1024 pxl. Z każdego obszaru zbierano 4-5 zdjęć w odstępach 15 µm wzdłuż osi obrazowania (z). Do wzbudzania fluorescencji wykorzystano lasery diodowe o długości fal 405 nm i 561 nm oraz laser helowo-neonowy o długości fali 633 nm. Spektra zbierania sygnału dla ultrafioletu wynosiły 340-350 nm, dla czerwieni 575-590 nm i dla dalekiej czerwieni 640-680 nm.

CeM i CeL u myszy w różnym stopniu składają się z neuronów hamujących posiadających białko GAD65 (w CeL komórki te przeważają)<sup>178</sup>. Dlatego, do określenia CeM i CeL na skrawku wykorzystano endogenną fluorescencję pochodzącą z komórek z obecnością GAD65 (barwnik TdTomato). Zdjęcia zbierano w kanale dalekiej czerwieni (sygnał pochodzący z wybarwionego Arc) i ultrafioletu (sygnał pochodzący z jąder komórkowych).

### **3.5.3.C Analiza poziomu białka Arc**

Zdjęcia analizowano przy użyciu pakietu do przetwarzania obrazów Fiji. Dla każdego zdjęcia mierzono uśrednioną wartość fluorescencji (ang. *mean intensity value*).

### **3.5.4. Analiza obecności podjednostki GluN2b receptora NMDA**

#### **3.5.4.A Barwienia podjednostki GluN2b**

Skrawki mózgow myszy GAD65-TdTomato z widocznym CeA przemywano PBS w temp. pokojowej i później poddawano je procedurze odzyskania antygenów (ang. *antigen*

*retrieval*). W tym celu skrawki umieszczano na 30 min w podgrzany do 80 °C 1 M buforze cytrynianowym o pH = 6. Po tym czasie skrawki pozostawiano jeszcze w buforze cytrynianowym aż do ostygnięcia w temp. pokojowej przez 1 godz.

Kolejne etapy barwienia GluN2B wykonywano na kołyszce laboratoryjnej. W pierwszym etapie skrawki mózgu przemywano czterokrotnie PBS po 5 min w temp. pokojowej. Następnie inkubowano je w roztworze blokującym (3% BSA w PBS) przez 3 godz. w temp. pokojowej. Po tym czasie roztwór wymieniało na roztwór 0,1% BSA w PBS zawierający przeciwciała pierwszorzędowe anti-GluN2B (Alomone AGC-003; stężenie 1:100) i inkubowano w nim skrawki przez 24 godz. w 4°C. W kolejnym etapie, skrawki mózgow powtórnie przemywano czterokrotnie po 5 min PBS, by później inkubować je w temp. pokojowej przez 3 godz. w roztworze przeciwciał drugorzędowych w PBS. Roztwór drugorzędowego przeciwciała skoniugowanych z barwnikiem Alexa Fluor 647 (Thermo Fisher A-31573) przed dodaniem do skrawków był odwirowywany przez 10 min z prędkością 20000 g w celu pozbycia się złożeń przeciwciał. W końcowym etapie skrawki płukano jeszcze raz w PBS w temp. pokojowej i nakładano w kropli medium zatapiającego (Fluoromont-G-DAPI) na szkiełkach podstawowych i przykrywano je szkiełkami nakrywkowymi.

#### **3.5.4.B Obrazowanie podjednostki GluN2b**

Preparaty skrawków mózgu z wybarwionymi podjednostkami GluN2B obrazowano przy pomocy odwróconego mikroskopu konfokalnego Axio Observer Z.1 (Zeiss Spinning Disc) z układem wirującej tarczy (ang. *spinning disc*). Zdjęcia wykonywano przy wykorzystaniu obiektywu 63x (olejowy, apochromatyczny o NA = 1,4) i dodatkowej soczewki powiększającej 1,6x (ang. *optovar*) w rozdzielczości 512 x 512 pxl. Z każdego obszaru zbierano po 4-5 zdjęć w odstępach 15 µm wzdłuż osi obrazowania (z). Do wzbudzania fluorescencji wykorzystano lasery diodowe o długości fal 405 nm, 561 nm i 639 nm, a do zbierania sygnału filtry 442 ± 46 nm, 525 ± 50 nm i 600 ± 50 nm.

Do wyznaczenia granic CeM i CeL na skrawkach wykorzystano endogenną fluorescencję pochodzącą z komórek z GAD65 (wyznakowanych barwnikiem TdTomato). Zdjęcia zbierano w kanale dalekiej czerwieni (sygnał pochodzący z wybarwionego GluN2B) i ultrafioletu (sygnał pochodzący z jąder komórkowych).

### **3.5.4.C Analiza ilościowa podjednostki GluN2b**

Zdjęcia analizowano przy użyciu pakietu do przetwarzania obrazów Fiji. Dla każdego zdjęcia mierzono uśrednioną wartość fluorescencji (ang. *mean intensity value*).

### **3.5.5. Analiza kolców dendrytycznych**

#### **3.5.5.A Barwienia kolców dendrytycznych**

Wszystkie etapy barwienia wykonywano na kołyszce laboratoryjnej. W pierwszym etapie skrawki mózgow przemywano czterokrotnie po 5 min w PBS w temp. pokojowej. Następnie na 10 min umieszczano skrawki w roztworze permabilizującym błonę komórkową (0,25% roztwór Tritonu X-100 w PBS), by później przemyć je roztworem blokującym (roztwór 0,1% Triton X-100 i 3% BSA w PBS) przez 3 godz. w temp. pokojowej. Po tym czasie roztwór wymieniano na roztwór PBS zawierający streptawidynę skoniguowaną z barwnikiem Alexa Fluor 568 (ThermoFisher S11226) i inkubowano w nim skrawki przez 3 godz. w temp. pokojowej. W końcowym etapie skrawki płukano jeszcze raz w PBS w temp. pokojowej i nakładano w kropli medium zatapiającego (Fluoromont-G-DAPI) na szkiełkach podstawowych i przykrywano je szkiełkami nakrywkowymi.

#### **3.5.5.B Obrazowanie kolców dendrytycznych**

Preparaty skrawków mózgu z wybarwionymi fluorescencyjnie komórkami dopamino-wrażliwymi obrazowano przy pomocy odwróconego mikroskopu konfokalnego Axio Observer Z.1 (Zeiss LSM 780). Zdjęcia wykonywano przy wykorzystaniu obiektywu 63x (olejowy, apochromatyczny o NA = 1,4) w rozdzielczości 1024 x 1024 pxl. Do wzbudzenia fluorescencji wykorzystano laser diodowy o długości fali 561 nm. Spektrum zbierania sygnału wynosiło 575-590 nm.

W zależności od widoczności drzewka dendrytycznego na preparatach, z każdej komórki zbierano zdjęcia z 2-6 obszarów. Zdjęcia dendrytów wykonywano w odstępach 1,15  $\mu\text{m}$  wzdłuż osi obrazowania (z) w grubości pozwalającej na zebranie obrazu z wszystkich widocznych dendrytów.

### **3.5.5.C Analiza liczby kolców dendrytycznych**

Zdjęcia analizowano przy użyciu pakietu do przetwarzania obrazów Fiji. Zdjęcia ze wszystkich płaszczyzn były sumowane i później analizowane przy pomocy rozszerzenia do Fiji, Dendritic Spine Counter. W programie zaznaczano odcinki dendrytów trzecich i dalszych rzędów i obliczano ich długość. Później manualnie zaznaczano widoczne wzdłuż każdego odcinka kolce dendrytyczne i wyznaczano gęstość ich wypustek.

## **3.6. Oczyszczanie mózgów i ich obrazowanie**

### **3.6.1. Oczyszczanie oraz wybarwianie mózgów techniką iDISCO+**

Wyekstrahowane mózgi myszy po perfuzji PFA przekrawano na pół. Do optycznego oczyszczania metodą iDISCO+ wybierano tylko lepiej zachowaną półkulę, tj. taką która miała mniej uszkodzeń mechanicznych<sup>105,106</sup>. Wszystkie etapy oczyszczania wykonywano w 5 ml probówkach szczelnie wypełnionych kolejnymi roztworami oraz przy ciągłym mieszaniu na rotatorze. W pierwszym etapie procedury oczyszczania, preparat poddano odwodnieniu polegającemu na umieszczaniu go w roztworach wodnych o wzrastającym co 20% stężeniu metanolu (od 20% do 99,8%). Etap ten wykonywano w temp. pokojowej i każde płukanie trwało 1 godz. Następnie preparat schłodzono do 4°C i umieszczono w 5% roztworze H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w metanolu na 24 godz. w 4°C. Po tym czasie próbkę powtórnie uwadniano, umieszczając ją w temp. pokojowej w roztworach wodnych o malejącym stężeniu metanolu (od 80% do 20%; każdorazowo na 1 godz.). Następnie próbkę umieszczono w roztworze 0,2% Triton X-100 w PBS w temp. pokojowej na 1 godz.

Kolejne etapy barwienia immunohistochemicznego wykonywano w 37°C. Na początku preparaty inkubowano przez 2 dni w roztworze permabilizującym, składającym się z 0,2% Triton X-100 i 10% dimetylosulfotlenku (DMSO) i 0,31 M glicyny w PBS. Na kolejne 2 dni próbki umieszczano w roztworze blokującym (0,17% Triton X-100; 3% BSA; 10% DMSO). Następnie przez 5 dni inkubowano mózgi w roztworze przeciwciała pierwszorzędowego anti-c-Fos (Synaptic Systems 226 003; 1:2000) we wzbogaconym roztworze PBS (0,2% Tween-20; 5% DMSO; 3% BSA; 0,01 M heparyna). Po tym czasie preparaty były 4x płukane po 5 godz. w roztworze zawierającym 0,2% Tween-20 i 0,01 M heparyny w PBS. Przez kolejne 5 dni inkubowano mózgi w roztworze przeciwciała drugorzędowego skoniugowanego

z barwnikiem Alexa Fluor 647 (ThermoFisher A32733; 1:2000). Roztwór przeciwciała przed dodaniem był odwirowywany z prędkością 20000 g przez 10 min (w celu pozbycia się złożeń przeciwciała) i do preparatu dodawany był tylko jego supernatant. Następnie preparaty były 4x płukane po 5 godz. w roztworze zawierającym 0,2% Tween-20 i 0,01 M heparyny w PBS.

Kolejne etapy oczyszczania wykonywano powtórnie w temp. pokojowej. Preparat ponownie poddano odwodnieniu w roztworach wodnych o wzrastającym co 20% stężeniu metanolu (od 20% do 99,8%, każdy etap trwał 1 godz.). Następnie, przez 3 godz., preparaty były inkubowane w 66% dichlorometanie w metanolu i później dwukrotnie po 15 min w 99,8% dichlorometanie.

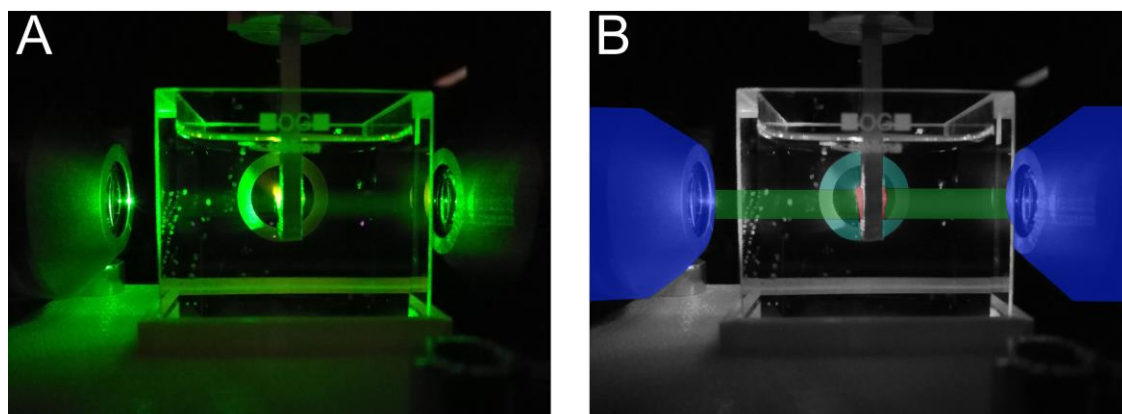
Ostatecznie mózgi umieszczano w eterze dibenzylu (DBE) i przechowywano w 4°C. Po upływie 24 godz. obserwowano, że preparaty stawały się przezroczyste.

### **3.6.2. Obrazowanie oczyszczonych mózgów**

Obrazowanie oczyszczonych preparatów wykonywano co najmniej 2 dni po umieszczeniu ich w DBE w celu stabilizacji ich fluorescencji. Do obrazowania preparatów wykorzystano mikroskop arkusza światła zaprojektowany i stworzony przez dr Monikę Pawłowską (Ryc. 18)<sup>104</sup>. W mikroskopie tym, wiązka lasera skupiana była na preparacie przez dwa obiektywy 4x (suche; apochromatyczne; NA = 0,13), a obraz formowano przy wykorzystaniu obiektywu immersyjnego o dystansie roboczym wynoszącym 6 mm (LaVisionBioTec; NA = 0,5). Preparaty obrazowano w dwóch etapach. W pierwszym obrazowano sygnał pochodzący z białka c-Fos, do czego zastosowano laser argonowy o długości fali 638 nm oraz filtr w spektrum i 610-694,3 nm. Później zobrazowano sygnału pochodzący z autofluorescencji przy wykorzystaniu laseru argonowego o długości fali 488 nm oraz filtru w spektrum 457,9-490 nm.

Preparaty obrazowano w płaszczyźnie strzałkowej w komorze wypełnionej DBE. Wielkość obrazowanych wokseli wynosiła 1,45 x 1,45 x 5 µm w przypadku autofluorescencji i 1,45 x 1,45 x 10 µm dla sygnału pochodzącego z c-Fos. Pole widzenia mikroskopu było mniejsze niż wielkość obrazowanych mózgów i dlatego preparaty obrazowano w dwunastu fragmentach.





**Ryc. 18: Obrazowanie oczyszczonego mózgu.** **A)** Zdjęcie komory mikroskopu arkusza światła wykorzystanego w badaniach. **B)** Zdjęcie komory z wyszczególnionymi jego elementami. Kolorem niebieskim zaznaczono obiektywy oświetlające próbkę. Na zielono widoczna jest spłaszczona wiązka lasera oświetlająca oznaczony kolorem czerwonym oczyszczony mózg. Za mózgiem, widoczny jest w kolorze akwamarynowym obiektyw zbierający emitowaną fluorescencję.

Zdjęcie wykonane aparatem Samsung Galaxy S7.

### 3.6.3. Formatowanie obrazów oczyszczonych mózgów

Zdjęcia uzyskane z obrazowania zostały poddane obróbce za pomocą programu Fiji. W pierwszym etapie zdjęcia mózgu z różnych pól widzenia zostały ze sobą połączone (zszyte; ang. *stitching*) za pomocą wtyczki Bigstitcher, by uformować obraz mózgu w 3 wymiarach<sup>179</sup>. Obraz zszytego mózgu dla obu kanałów został poddany interpolacji dwusześcienniej, by uzyskać końcową wartość woksela o wymiarach 4 x 4 x 4  $\mu\text{m}$ .

### 3.6.4. Przyporządkowywanie obrazów do atlasu mózgu i określanie liczby komórek c-Fos-pozytywnych

Do przyporządkowania obrazów do atlasu mózgu myszy oraz do wykrycia komórek c-Fos+ wykorzystano programy Fiji oraz ClearMap<sup>106</sup>.

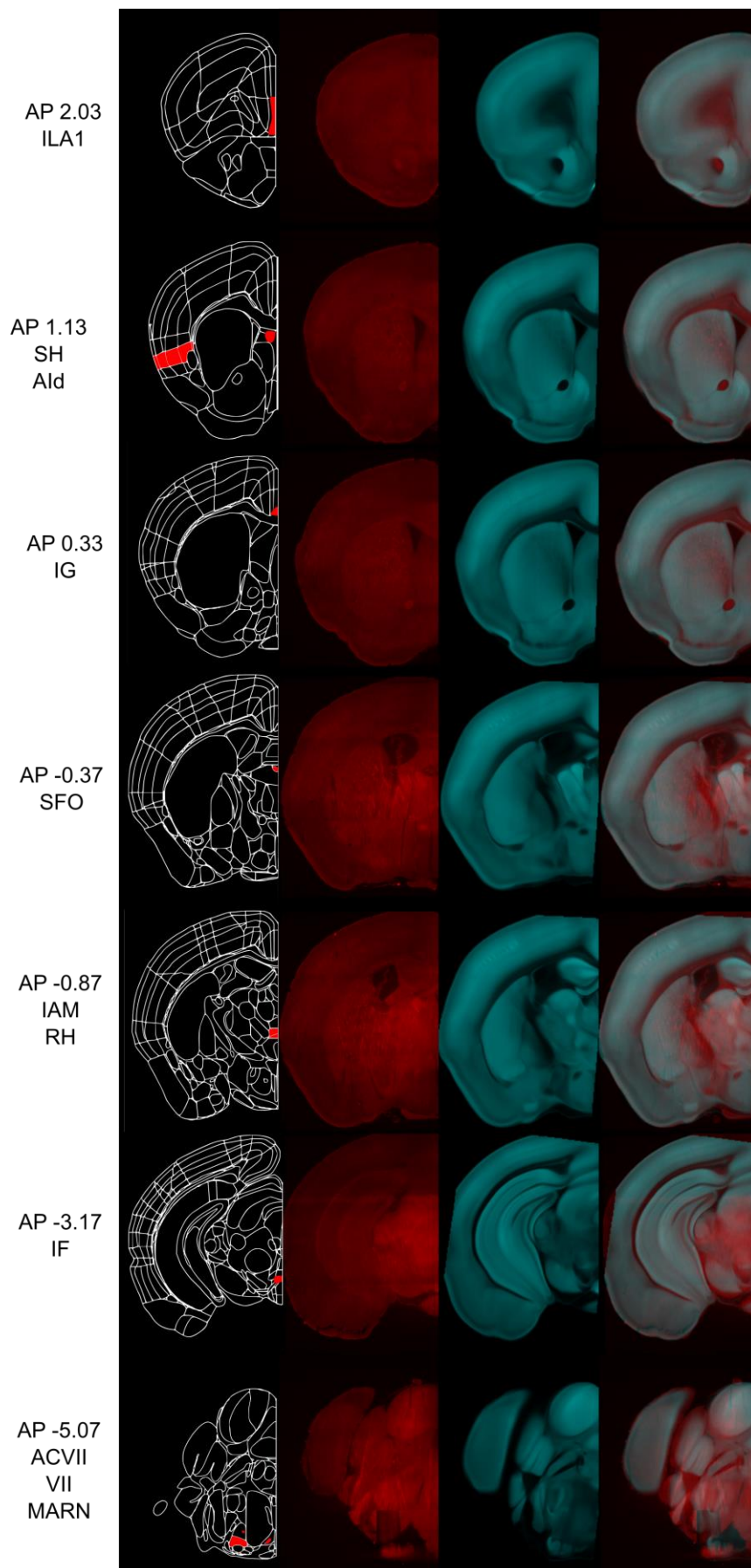
Pierwszym etapem analizy było przyporządkowanie zszytych i sformatowanych obrazów z kanału autofluorescencji do referencyjnego uśrednionego mózgu myszy o rozdzielczości 25  $\mu\text{m}$  oraz do atlasu mózgu mysiego z Instytutu Mózgu im. Paula Allena, tzw. Allen'owskiego Atlasu Mysiego Mózgu (ang. *Allen Brain Atlas*)<sup>168, 169</sup>. By zapewnić dobre dopasowanie do atlasu, referencyjny mózg został przycięty w programie Fiji do obszaru widocznego na zdjęciach mózgów. Proces ten sprowadzał się do wycięcia jednej półkuli,

mózdzku oraz części opuszek węchowych, by później programem ClearMap dokonać automatycznego dopasowania go do zdjęcia autofluorescencji mózgu. Dopasowanie każdego mózgu weryfikowano później manualnie w programie Fiji (Ryc. 19).

Kolejnym etapem było automatyczne zliczanie komórek c-Fos+ poprzez wykrywanie na zdjęciach sferycznych obiektów o wybranej wielkości i określonej wartości fluorescencji. W programie ClearMap istnieje możliwość manipulowania kilkoma parametrami wartości wstępnych, służącymi do późniejszego mapowania sygnału pochodzącego z różnych obiektów. W pierwszym etapie istnieje możliwość odcięcia sygnału od tła (ang. *background removal*), ale dzięki temu, że uzyskane zdjęcia charakteryzowały się bardzo wysokim współczynnikiem sygnału do szumu (ang. *signal to noise ratio*) zrezygnowano z ustawiania tego parametru, by nie zniekształcać obrazu. Zdjęcia nie były również korygowane pod względem nierównomiernego oświetlenia preparatu (ang. *illumination correction*), które może wystąpić podczas obrazowania mikroskopem arkusza światła. W uzyskanych zdjęciach udało się uniknąć tego artefaktu, ponieważ podczas obrazowania skanowana część preparatu zawsze znajdowała się w środku wiązki lasera. Parametrem wymagającym weryfikacji było ustalenie wielkości mapowanych obiektów. Wielkość jąder komórkowych w neuronach wynosi od 5  $\mu\text{m}$  do 20  $\mu\text{m}$ , a wielkość woksela przetworzonych obrazów wynosiła 4 x 4 x 4  $\mu\text{m}$ . Niemniej jednak, sygnał z jąder komórkowych charakteryzował się gaussowskim przebiegiem (wysoki sygnał w środku sfery, który stopniowo malał na obrzeżach) i jako wartość wielkości wyszukiwanego jądra komórkowego określono 5 x 5 x 5 pxl. Następnie manipulowano jeszcze progami wyszukiwanej fluorescencji w centrum i na obrzeżach wyszukiwanych obiektów. Podczas ustalania parametrów wstępnych wyszukiwania komórek c-Fos+ program ClearMap pozwalał na ręczną weryfikację poprawności wybranych parametrów.

Liczby komórek c-Fos+ przypisano do konkretnych struktur w mózgu. By ułatwić porównanie aktywacji struktur o różnej wielkości, liczby te zostały podzielone przez objętości tych struktur i ostatecznie przedstawione jako gęstości liczbowe komórek c-Fos+. W przypadku kilku struktur, w większości zlokalizowanych przyśrodkowo, program z niewiadomych przyczyn nie był w stanie zlokalizować komórek c-Fos+ i nieustannie generował błąd. Struktury te (wyszczególnione na ryc. 19) zostały pominięte w dalszej analizie.

Atlas                      Sygnał                      Wzorcowy                      Zestawione  
 mózgu myszy                      autofluorescencji                      mózg myszy                      obrazy



**Ryc. 19: Dopasowanie obrazu autofluorescencji do wzorcowego mózgu myszy i atlasu mózgu.** Na rycinie przedstawiono przekroje ze strukturami, dla których program ClearMap nie określił liczby komórek c-Fos+. Regiony te zostały zaznaczone czerwonym kolorem na atlasie mózgu.

ILA1 – brzuszna część kory limbicznej, warstwa 1 (ang. *infralimbic area, layer 1*); SH – jądro przegrodowo-hipokampowe (ang. *septohippocampal nucleus*); Ald – grzbietowa kora wyspy, część agranularna, warstwa 1 (ang. *agranular insular area, dorsal part, layer 1*); IG – nawleczka szara (ang. *induseum griseum*); IAM – jądro pośrednio-przyśrodkowe wzgórza (ang. *interanteromedial nucleus of the thalamus*); RH – jądro równoległoboczne (ang. *rhomboid nucleus*); IF – jądro międzypęczkowe szwu (ang. *interfascicular nucleus raphe*); ACVII – dodatkowe jądro nerwu twarzowego (ang. *accessory facial motor nucleus*); VII – jądro nerwu twarzowego (ang. *facial motor nucleus*); MARN – jądro wielkokomorowe siatkowate (ang. *magnocellular reticular nucleus*); SFO – narząd podsłepieniowy (ang. *subfornical organ*).

### 3.7. Analiza statystyczna

#### 3.7.1. Analiza statystyczna danych z eksperymentów behawioralnych

Wyniki uzyskane z eksperymentów behawioralnych analizowano programem GraphPad Prism 9. Wyniki z tych eksperymentów zostały przedstawione na rycinach jako średnie dla danych wariantów doświadczalnych wraz z odchyleniami w postaci błędu standardowego średniej (ang. *standard error of the mean*; SEM). Dokładne dane dotyczące wielkości grup oraz nagranych komórek umieszczono w podpisach do rycin. Istotność statystyczną porównywano tylko dla ostatnich siedmiu dni eksperymentu testem analizy wariancji (ANOVA) dla powtórzonych pomiarów. Różnice pomiędzy grupami uznano za istotne statystycznie, gdy  $p < 0,05$ .

#### 3.7.2. Analiza statystyczna danych z mikroskopii konfokalnej oraz elektrofizjologii

Wyniki uzyskane z eksperymentów przy użyciu mikroskopii konfokalnej oraz technik elektrofizjologicznych analizowano programem GraphPad Prism 9. Podczas eksperymentów wyniki powtórzeń nagrań (z kolejnych komórek) lub obrazowań (z kolejnych zdjęć) z jednego zwierzęcia uśredniano, by później porównywać je pomiędzy grupami. Wyniki z tych eksperymentów zostały przedstawione na rycinach jako średnie dla danych wariantów doświadczalnych wraz z odchyleniami w postaci SEM. Na wykresach kolumnowych

umieszczono również uśrednione wyniki dla każdej myszy. Dokładne dane dotyczące liczby powtórzeń w obrębie grup i zwierząt umieszczono w podpisach do rycin.

Normalność rozkładu danych dla każdej z grup mierzono testem Shapiro-Wilka. Za punkt odniesienia uznawano wyniki uzyskane dla wariantów kontrolnych, oznaczonych dalej jako „Woda” lub „Sól”. W przypadku wyników tylko dla dwóch grup, istotność statystyczną mierzono testem t dla prób niezależnych lub jego nieparametrycznym odpowiednikiem, testem Manna-Whitneya, dla danych niereprezentujących rozkładu normalnego. W przypadku porównywania trzech grup, istotność statystyczną mierzono testem jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) lub jego nieparametrycznym odpowiednikiem, testem Kruskalla-Wallisa, dla danych niereprezentujących rozkładu normalnego. W przypadku porównywania rozkładów częstości oraz amplitud sEPSCs wykorzystano test Kolmogorova-Smirnova. Pobudliwość neuronów porównywano dwuczynnikową analizą wariancji ANOVA, a pomiędzy modelami pobudliwości badając resztkową sumę kwadratów. Różnice pomiędzy grupami uznano za istotne statystycznie, gdy  $p < 0,05$ .

Podczas porównywania wpływu aktywacji receptorów DREADD hM3Dq i hM4Di, różnice statystyczne określono testem t dla prób zależnych lub jego nieparametrycznym odpowiednikiem, testem Wilcoxon’a.

### 3.7.3. Analiza statystyczna danych z mikroskopii arkusza światła

Dane uzyskane podczas obrazowania oczyszczonych mózgów analizowano skryptami napisanymi w języku R. Skrypty te są dostępne na stronie projektu pod poniższym adresem: <https://github.com/BijochLukasz/Whole-brain-tracking-of-cocaine-and-sugar-rewards-processing>.

Analiza danych wykonana testem Shapiro-Wilka wykazała brak normalności rozkładu dla wyników dla wielu struktur mózgowych, i do porównania istotności statystycznych pomiędzy grupami użyto uogólnionego modelu liniowego (ang. *generalized linear model*; GLM) oraz *post hoc* testu Dunnetta. W związku z tym, że porównywano dane o wielkim wymiarze, dodatkowo zastosowano też test Benjamini-Hochberga i różnice pomiędzy grupami uznano za istotne statystycznie, gdy  $p < 0,1$ . Istotności statystyczne dla wszystkich struktur zostały przedstawione na wykresach ze średnimi gęstościami komórek c-Fos+ na rycinie 27.

Korelacje poziomu c-Fos pomiędzy strukturami wyznaczono obliczając współczynnik korelacji Pearsona. Wyniki korelacji dla konkretnych struktur zorganizowano w grupy struktur

nadrzędnych, wg. podziału anatomicznego zastosowanego w Allen'owskim Atlasie Mysiego Mózgu. Następnie, wyliczone korelacje pomiędzy strukturami posłużyły do określenia dystansu euklidesowego pomiędzy nimi. Dystanse te umożliwiły pogrupowanie struktur o podobnym poziomie *c-Fos* w moduły. Poziom modułowości dla różnych grup przedstawiono jako liczbę modułów w zależności od poziomu stopnia podobieństwa (relatywnego przecięcia dendrogramu podobieństwa). Różnice modułowości pomiędzy badanymi grupami zmierzono testem Mantela-Coxa.

Do przedstawienia stopnia zmian ekspresji *c-fos* po jednokrotnej i po siedmiokrotnej ekspozycji zwierzęcia na nagrody, wyliczono współczynnik poziomu zmiany (ang. *fold index*) dla grupy otrzymującej cukier oraz kokainę wg wzoru:

$$\text{Współczynnik poziomu zmiany} = \log_{10} \left( \frac{\text{średnia dla nagrody 1 d}}{\text{średnia dla nagrody 7 d}} \right),$$
 gdzie *średnia dla nagrody 1 d* i *średnia dla nagrody 7 d* oznaczają kolejno średnią liczbę komórek *c-Fos+* po jednokrotnej i po siedmiokrotnej ekspozycji zwierzęcia na nagrodę.

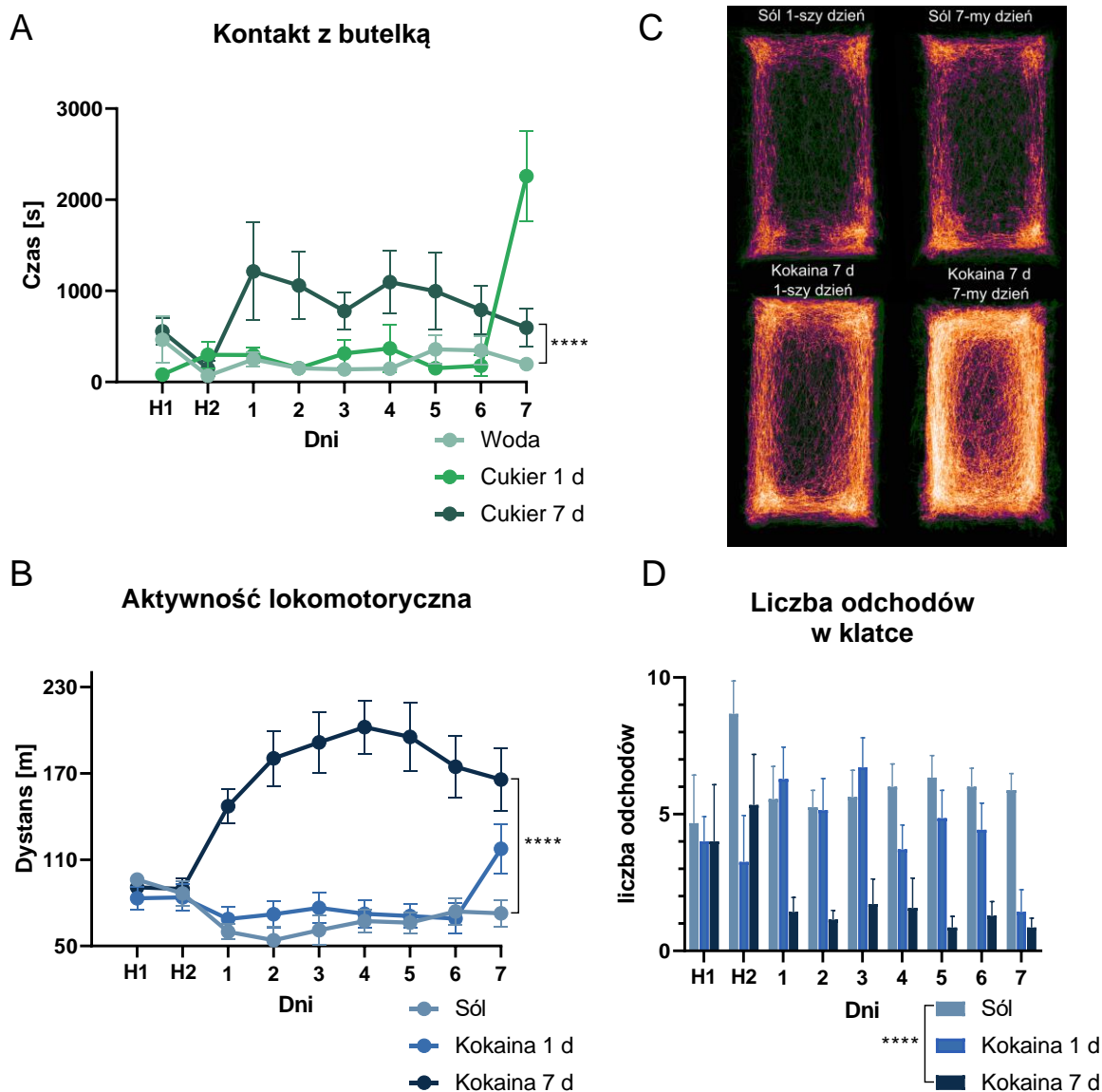
## 4. WYNIKI

### 4.1. Analiza behawioru zwierząt eksponowanych na nagrody

Analiza zachowania myszy linii GAD65-TdTomato wykazała ich preferencję do sacharozy, objawiającą się tym, że zwierzęta więcej czasu spędzały na picciu roztworu cukru niż świeżej wody (Ryc. 20A).

Badane myszy linii GAD65-TdTomato eksponowane na kokainę, podobnie jak inne mysie szczepy, charakteryzowały się również zwiększoną aktywnością lokomotoryczną po zastrzykach z kokainy w dawce 20 mg/kg m.c (Ryc. 20B). Podczas siedmiokrotnej ekspozycji na narkotyk zaobserwowano u nich również sensytyzację, objawiającą się zwiększeniem behawioralnych efektów wywołanych przez narkotyk przy kolejnych podaniach. Oprócz tego, zaobserwowano że kokaina zmniejszyła defekacje myszy, i w grupie myszy eksponowanych na narkotyk znajdowano mniejszą liczbę odchodów w klatce (Ryc. 20D).

Efekty behawioralne ekspozycji myszy linii D1-TdTomato/D2-GFP zarówno na kokainę, jak i na cukier były podobne do tych prezentowanych przez myszy linii GAD65-TdTomato. Zwierzęta te również wykazywały zwiększoną aktywność lokomotoryczną z widocznym efektem sensytyzacji po zastrzykach z kokainy oraz preferencję do picia słodkiej wody. Wyniki te zostały uwzględnione w rozprawie magisterskiej mgr Joanny Klos oraz w artykule Bijoch i wsp., *Transl Psychiatry*, (2023) <sup>48</sup>.



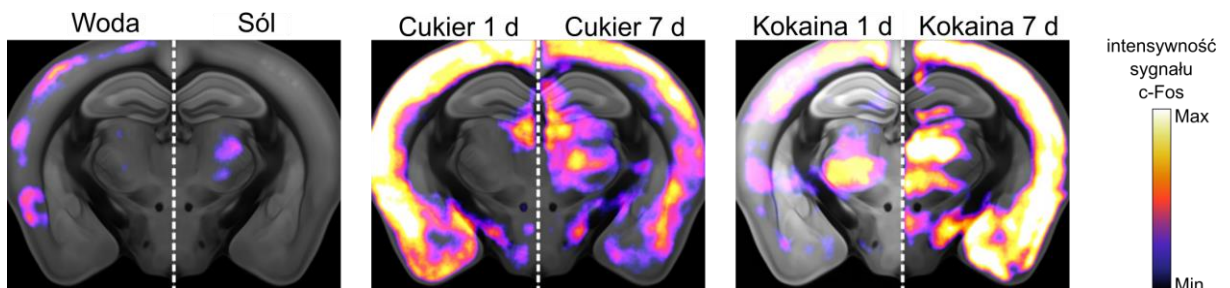
**Ryc. 20: Efekty behawioralne ekspozycji zwierzęcia na nagrodę farmakologiczną i naturalną.** **A)** Wykres przedstawiający czas spędzony przez myszy na picciu z butelki wypełnionej wodą lub 7,5% roztworem wodnym sacharozy. **B)** Wykres aktywności lokomotorycznej myszy mierzony w przeciągu pierwszych 30 min po ekspozycji ich na kokainę lub sól fizjologiczną. **C)** Uśrednione przebiegi aktywności lokomotorycznej myszy w przeciągu pierwszych 30 min po ekspozycji ich na kokainę lub sól fizjologiczną. **D)** Liczba odchodów znajdujących się w klatce po 30-minutowej ekspozycji myszy na kokainę lub sól fizjologiczną.

Liczebność grup: N Woda = 11; N Cukier 1 d = 6; N Cukier 7 d = 6; N Sól = 9; N Kokaina 1 d = 7; N Kokaina 7 d = 8, gdzie N = liczba zwierząt użytych w badaniu. Analiza statystyczna wykonana była testem ANOVA z powtarzalnymi pomiarami. Do analizy statystycznej nie uwzględniono dni habituacji zwierzęcia do klatki (H1 oraz H2). \*\*\*\* oznacza  $p < 0,0001$ . Wykresy **A**, **B** i **D** przedstawiają średnie oraz  $\pm$  SEM.



## 4.2. Analiza aktywności mózgowi myszy eksponowanych na nagrody

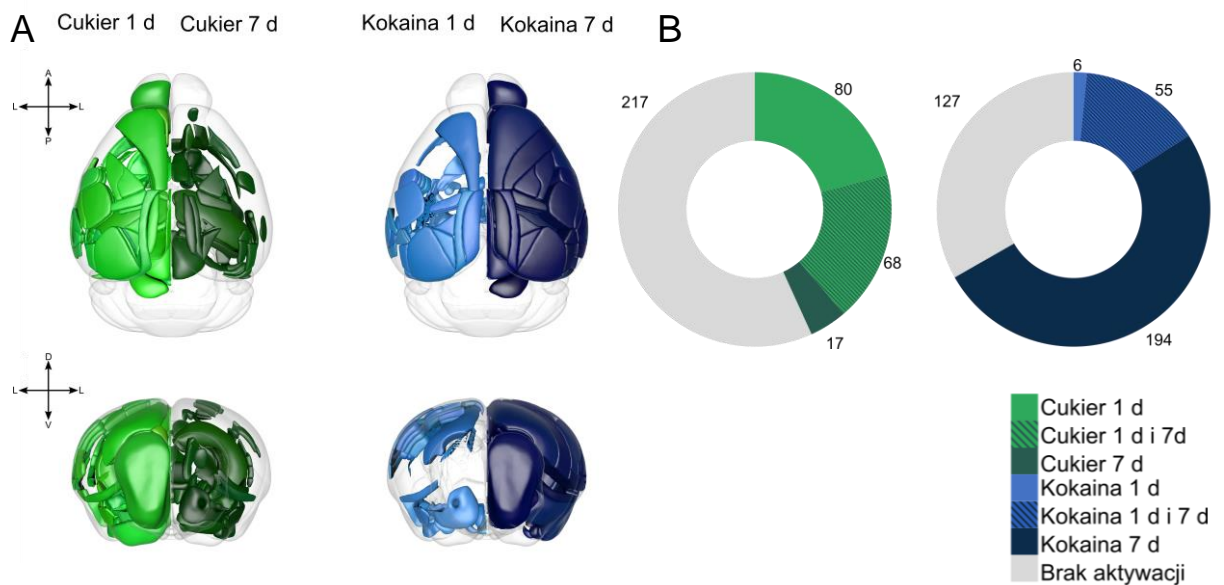
Badania przetwarzania nagród naturalnych i farmakologicznych na zwierzętach w dużej mierze skupione są na rejonach mózgu tworzących układ nagrody. Istnieje jednak coraz więcej dowodów na to, że również inne struktury mózgowe odgrywają ważną rolę w regulacji opartych na nich zachowań. Dlatego też postanowiono stworzyć mapy mózgowi myszy, które uwzględniałyby struktury aktywowane na skutek ekspozycji na cukier lub kokainę. Do tego celu wykorzystano technikę optycznego oczyszczania tkanek, w której immunohistochemicznie wybarwiono białko c-Fos, którego synteza towarzyszy aktywności neuronalnej. W zobrazowanych mózgowi użyto programu do automatycznego zliczania komórek c-Fos+ i ich współrzędne dopasowano do atlasu mózgu myszy (Ryc. 21). Wyniki przedstawiono jako liczbę komórek c-Fos+ w odniesieniu do objętości tych struktur, co umożliwiło porównanie liczby aktywnych komórek w dużych i małych strukturach.



**Ryc. 21:** Gęstość komórek c-Fos+ w mózgowi myszy kontrolnych (Woda/Sól), lub eksponowanych na nagrody naturalne (Cukier 1 d, Cukier 7 d) lub farmakologiczne (Kokaina 1 d, Kokaina 7 d). Mapy ciepłne stworzono na podstawie uśrednionej liczby wykrytych komórek c-Fos+ w poszczególnych częściach mózgowi myszy. Liczebność grup: N Woda = 7; N Cukier 1 d = 5; N Cukier 7 d = 7; N Sól = 7; N Kokaina 1 d = 6; N Kokaina 7 d = 6, gdzie N = liczba zwierząt użytych w badaniu.

### 4.2.1. Analiza struktur w mózgowi aktywowanych ekspozycją myszy na nagrody

Analiza poziomu c-Fos w mózgowi myszy eksponowanych na cukier wykazała rozległą aktywację dużych części mózgu. Z 386 badanych struktur, 148 wykazało zwiększoną liczbę komórek c-Fos+ po jednokrotnej, i 85 po siedmiokrotnej ekspozycji zwierzęcia na cukier. Podobnie ekspozycja na kokainę spowodowała znaczny wzrost poziomu c-Fos, ale w przypadku tej nagrody, więcej aktywnych struktur było w przypadku siedmio- (249) niż jednokrotnej (61) ekspozycji (Ryc. 22).



**Ryc. 22: Mapy mózgów aktywowanych przez nagrodę naturalną lub farmakologiczną.**

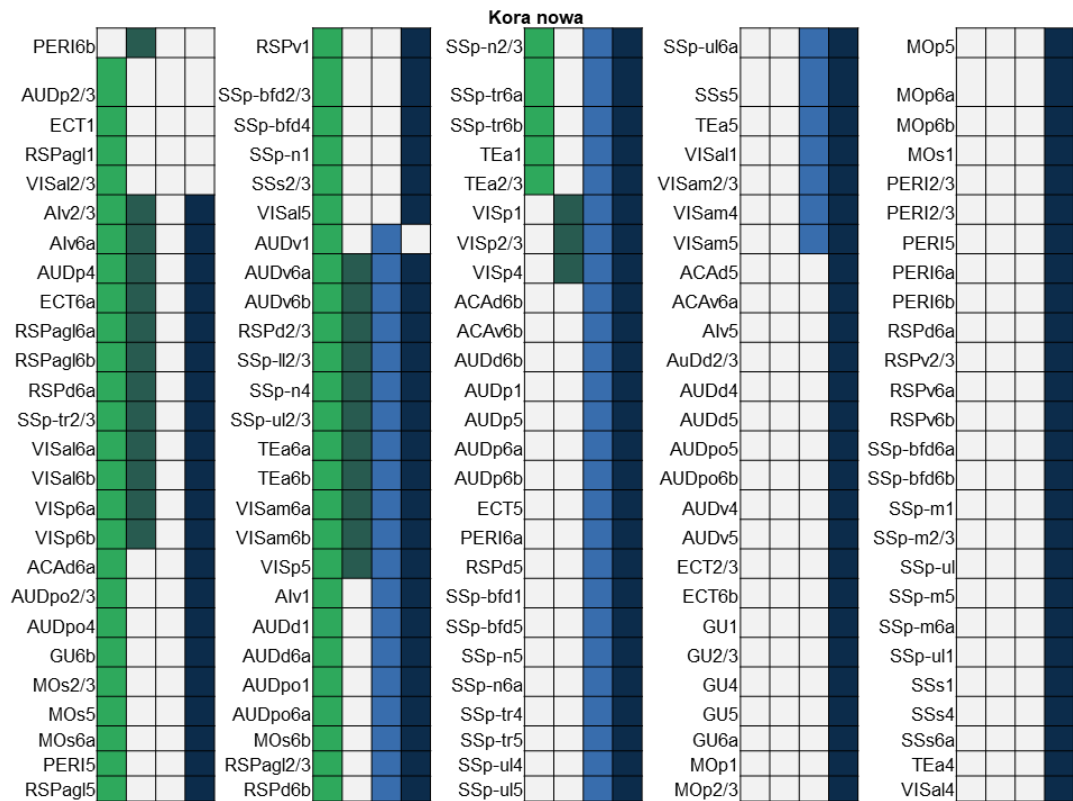
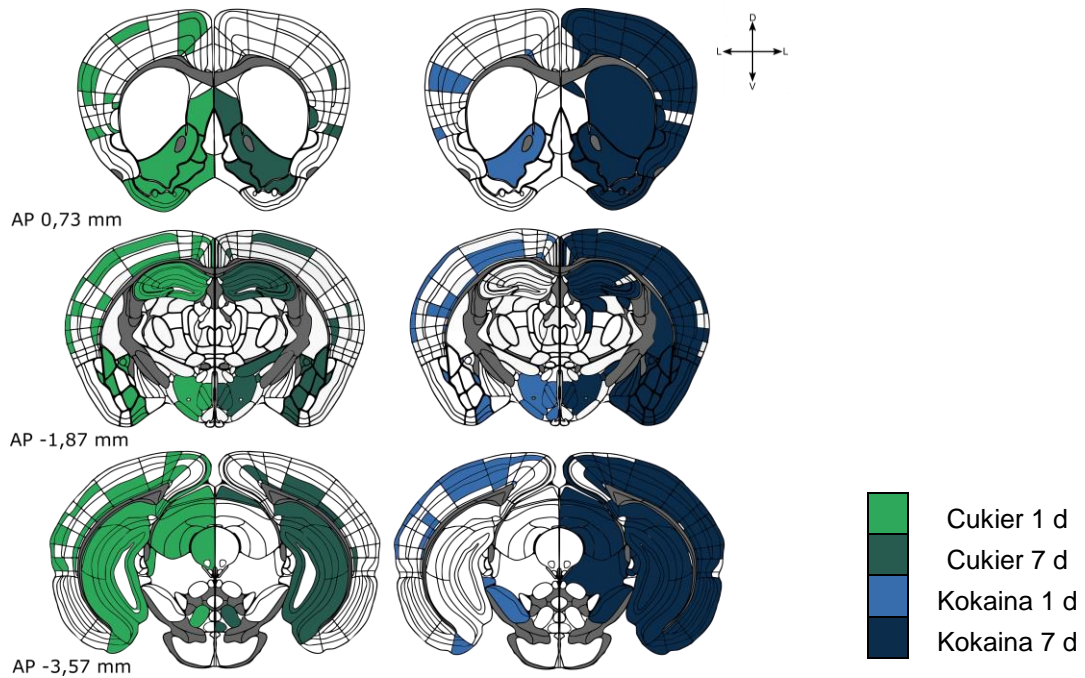
**A)** Ilustracje mózgów mysich z wyszczególnionymi strukturami na podstawie Allenowskiego Atlasu Mysiego Mózgu Mózgu, gdzie zaznaczony rejon z istotnie statystycznie zwiększoną liczbą komórek c-Fos+. **B)** Liczba struktur z istotnie statystycznie zwiększonym poziomem białka c-Fos po ekspozycji zwierzęcia na cukier lub kokainę. Prażki na wykresach oznaczają liczbę struktur wspólnych dla jednodniowej i kilkudniowej ekspozycji.

Liczebność grup: N Woda = 7; N Cukier 1 d = 5; N Cukier 7 d = 7; N Sól = 7; N Kokaina 1 d = 6; N Kokaina 7 d = 6, gdzie N = liczba zwierząt użytych w badaniu. Istotność statystyczną dla każdej struktury obliczano przy użyciu GLM z *post hoc* testem Dunnetta i korekcją testem Benjamini-Hochberga; różnice pomiędzy grupami uznano za istotne statystycznie, gdy  $p < 0,1$ . A – przedni (ang. *anterior*), P – tylni (ang. *posterior*), D – grzbietowy (ang. *dorsal*), V – brzuszny (ang. *ventral*), L – boczny (ang. *lateral*).

W przypadku obu nagród aktywowane były struktury związane z przetwarzaniem emocji i przyjemnych doznań, takie jak jądro półleżące (ACB) czy rejon ciała migdałowatego (Ryc. 23). Poza tym, zarówno jedno- jak i siedmiokrotna ekspozycja na cukier, aktywowała różne części i warstwy kory, m.in. te przetwarzające smak (część nieziarnista brzusznej kory wyspy, AIV) ale również różne części kory słuchowej (część brzuszna, AUDV; grzbietowa, AUDD; tylna, AUDPO), kory wzrokowej (przednio-boczna, VISAL; tylna, VISP) i odpowiedzialną za pamięć przestrzenną korę retrosplenialną (część grzbietowa, RSPD; boczna część nieziarnista, RSPAG; Ryc. 28). Inne części kory, zwłaszcza te powierzchniowe i przyporządkowane do warstwy 1, były aktywne tylko po jedнокrotnej ekspozycji na cukier. Tylko kilka regionów aktywowanych było selektywnie przez siedmiokrotną ekspozycję na cukier i oprócz pojedynczych fragmentów kory były to m.in. jądra warstwa niepewna (ZI), przedmurze (CLA) czy fragmenty odpowiadające za kontrolę mięśni głowy jądra przypęczkowego (SPFP).

Zastrzyki z kokainy przez siedem dni spowodowały zwiększoną liczbę komórek c-Fos+ w większości badanych struktur. Jedną ze struktur nieaktywowanych na skutek ekspozycji na kokainę było VTA, które było aktywne w przypadku nagrody naturalnej. Większość regionów mózgu aktywowanych przez jednokrotny zastrzyk z kokainy pokrywała się z tymi, które były aktywne po siedmiu dniach. Jedynymi, aktywowanymi tylko po jednokrotnym podaniu kokainy były jądra budujące podwzgórze: jądro łukowate (ARH), część przednia jądra okołokomorowego podwzgórza (PVp), jądro guzowo-suteczkowe (TMv), jądro guzowe (TU), jądro przedsuteczkowe grzbietowe (PMd) oraz warstwa 1-sza brzusznej części kory słuchowej (AUDv1).

Poziom c-Fos we wszystkich badanych częściach mózgu, wraz z objaśnieniem skrótów odpowiadających poszczególnym strukturom przedstawiono na rycinie nr. 27 na końcu rozdziału.



**Śródmoźgowie**

IPN	
PAG	
VTA	
SCop	
SCsg	
SNC	
SNr	
SCdg	
SCdw	
SCig	
SCiw	
MRN	

**Jądra podkorowe**

LSr	
CEA	
SI	
ACB	
CP	
LSc	
MEA	
OT	

**Okolica węchowa**

COAp	
PAA	

**Międzymoźgowie**

ZI	
TU	
LPO	
DMH	
LHA	
PSTN	
CL	
LGd	
LP	
MG	
PO	
STN	

**Formacja hipokampa**

CA1	
DG-mo	
DG-sg	
PRE	
SUB	
ENTmv	
POST	
ENTI	
ENTm	
PIR	

**Warstwa podpłytkowa kory**

BLAp	
BMA	
LA	
Epv	
BLAa	
BLAv	
Epd	

**Ryc. 23: Zwiększony poziom c-Fos w mózгах myszy eksponowanych na cukier lub kokainę.** **A)** Schematy mózгów w płaszczyźnie strzałkowej stworzone na podstawie Allenowskiego Atlasu Mysiego Mózgu. Kolorami zaznaczono struktury z istotnie statystycznie zwiększoną liczbą neuronów c-Fos+. **B)** Lista struktur mózgowych widoczna na schematach w **A**. Wypełnione kolorami kafelki oznaczają, że dla danej grupy struktura miała istotnie statystycznie zwiększoną liczbę komórek c-Fos+.

Liczebność grup: N Woda = 7; N Cukier 1 d = 5; N Cukier 7 d = 7; N Sól = 7; N Kokaina 1 d = 6; N Kokaina 7 d = 6, gdzie N = liczba zwierząt użytych w badaniu. Istotność statystyczną dla każdej struktury obliczano przy użyciu GLM z *post hoc* testem Dunnetta i korekcją testem Benjamini-Hochberga; różnice pomiędzy grupami uznano za istotne statystycznie, gdy  $p < 0,1$ . A – przedni (ang. *anterior*), P – tylni (ang. *posterior*), D – grzbietowy (ang. *dorsal*), V – brzuszny (ang. *ventral*), L – boczny (ang. *lateral*).

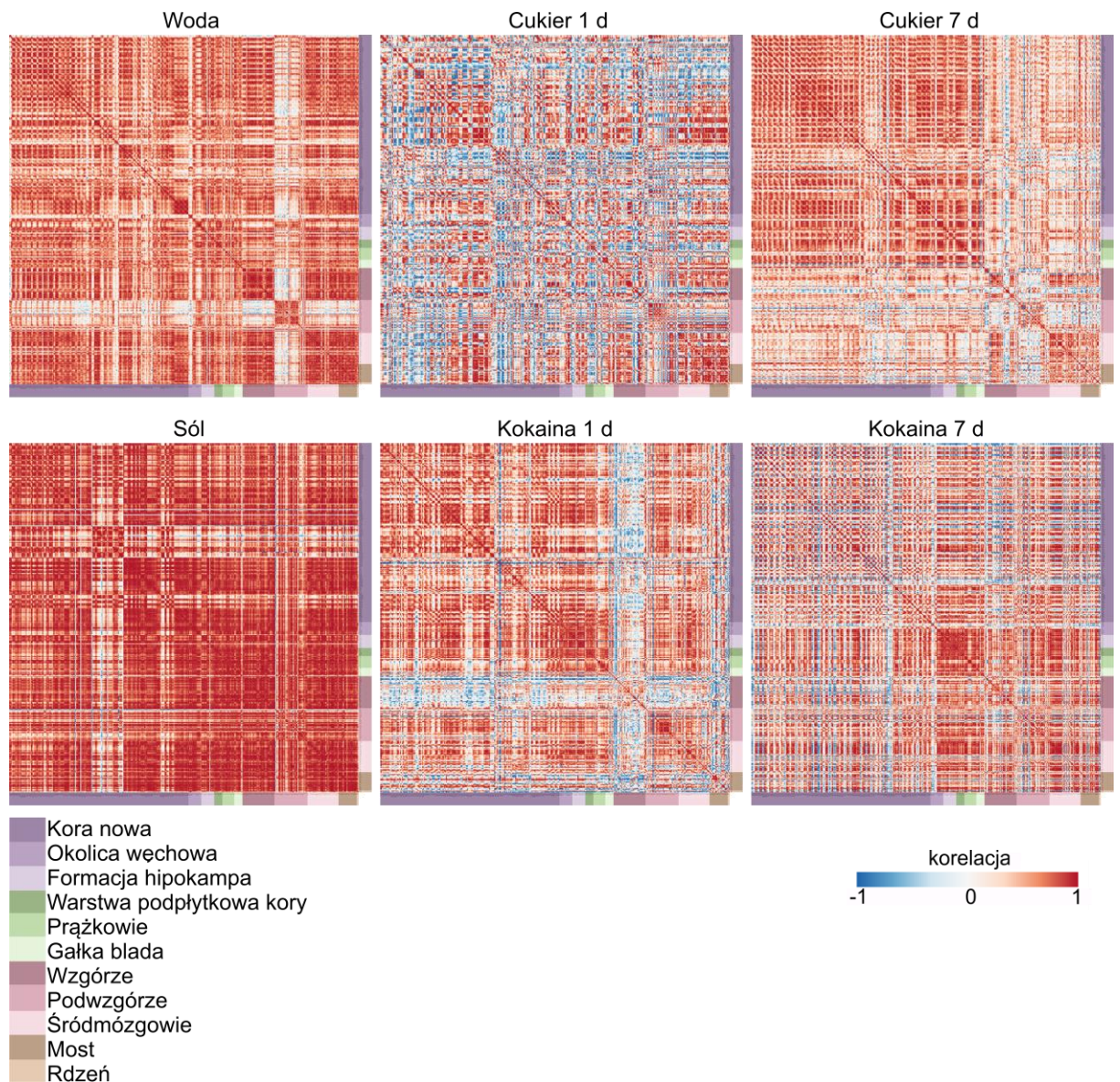
#### 4.2.2. Analiza wzoru aktywności mózгowej myszy eksponowanej na nagrody

Relatywne gęstości komórek c-Fos+ dla poszczególnych struktur posłużyły do zbadania wzoru aktywności mózгowej myszy eksponowanych na nagrody. W tym celu wyliczono korelacje aktywności pomiędzy poszczególnymi regionami. Regiony o podobnym stopniu korelacji zgrupowano w moduły i na podstawie ich liczby określono stopień reorganizacji mózgu myszy po ekspozycji na cukier lub kokainę.

##### 4.2.2.A Analiza korelacji aktywności pomiędzy strukturami

Pierwszym etapem do wyznaczenia wzoru aktywności mózgu było wyliczenia korelacji gęstości komórek c-Fos+ pomiędzy badanymi strukturami. Stworzono macierze korelacji aktywności dla struktur, które zostały zorganizowane zgodnie z podziałem anatomicznym wg. Allen'owskiego Atlasu Mysiego Mózgu (Ryc. 24). Najwięcej pozytywnie skorelowanych struktur zaobserwowano w grupach kontrolnych, które miały niską liczbę komórek c-Fos+. W tych grupach, regionami o nieskorelowanej aktywności z resztą mózgu było podwzgórze (w przypadku myszy eksponowanych na wodę) oraz kora wzrokowa (w przypadku grupy solnej). Ekspozycja na nagrody, zarówno na cukier, jak i na kokainę, spowodowała spadek korelacji aktywności w mózgu. Szczególnie dużo negatywnie skorelowanych struktur było w grupie jednokrotnie eksponowanej na cukier. W przypadku siedmiokrotnej ekspozycji, negatywnie skorelowane struktury dotyczyły głównie wzgórza oraz obszarów kory zakrętu obręczy.

W przypadku nagrody farmakologicznej, wzór macierzy korelacji był różny i więcej negatywnie skorelowanych struktur w całym mózgu znaleziono po siedmiokrotnej ekspozycji na kokainę. W przypadku jednokrotnej ekspozycji, regionem negatywnie skorelowanym z resztą mózgu było wzgórze, czyli obszar, dla którego określono wiele struktur ze zwiększoną liczbą komórek c-Fos+.

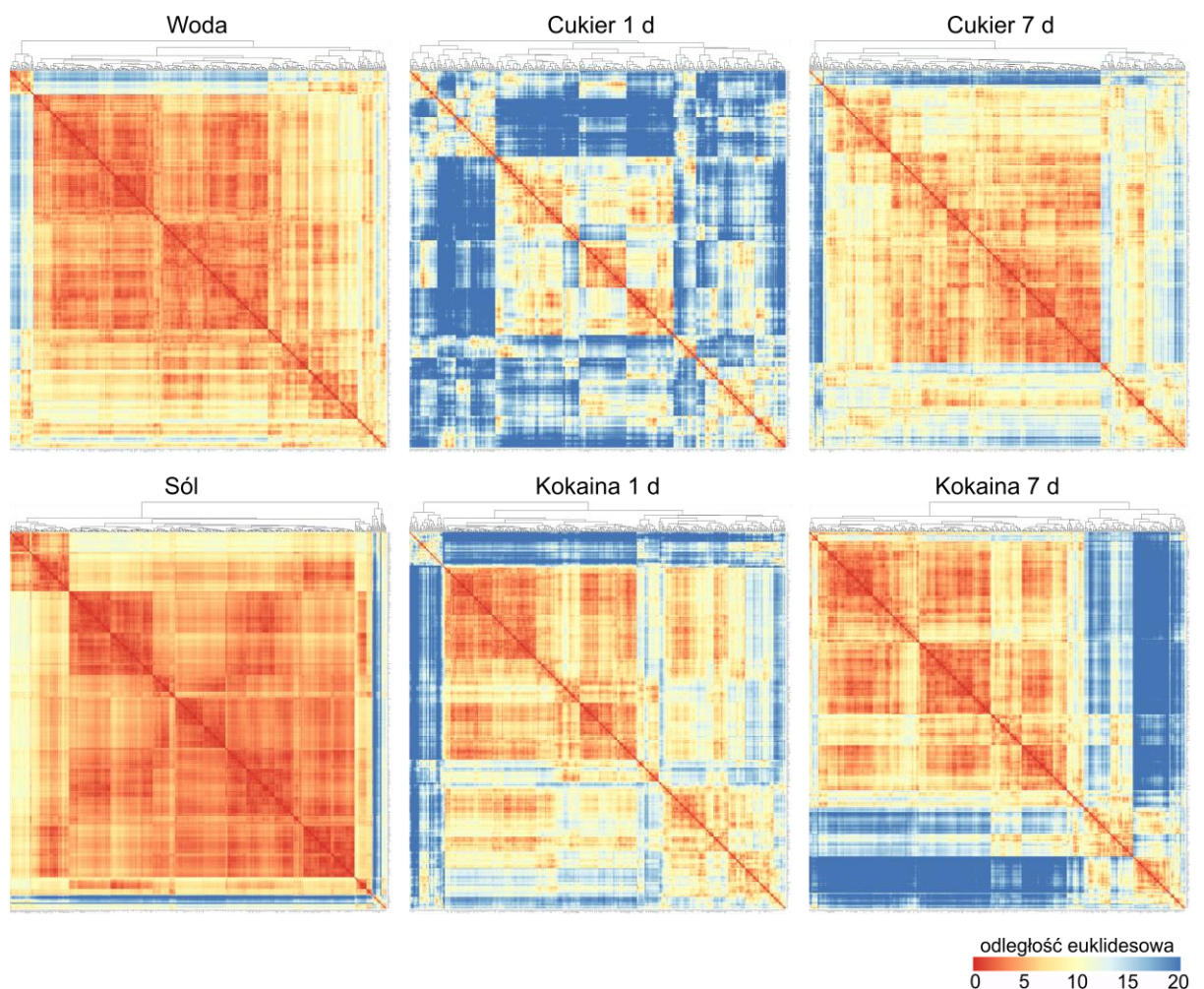


**Ryc. 24: Mapy cieplne korelacji gęstości komórek c-Fos+ pomiędzy strukturami dla grup eksponowanych na nagrody naturalne (górną) lub farmakologiczne (dolną).** Struktury zgrupowano wg. organizacji anatomicznej zaproponowanej w Allen’owskim Atlasie Mysiego Mózgu. Z prawej i dolnej strony każdej mapy zaznaczono skróty badanych struktur. Struktury są zgrupowane w struktury nadrzędne, zaznaczone kolorami z prawej i dolnej strony każdej mapy. Korelacje pomiędzy strukturami wyznaczone obliczając współczynnik korelacji Pearsona. Kolory czerwone oznaczają korelację pozytywną, a niebieskie negatywną. Liczebność grup: N Woda = 7; N Cukier 1 d = 5; N Cukier 7 d = 7; N Sól = 7; N Kokaina 1 d = 6; N Kokaina 7 d = 6, gdzie N = liczba zwierząt użytych w badaniu. Rycina

w większej rozdzielczości dostępna jest również pod linkiem <https://github.com/BijochLukasz/Whole-brain-tracking-of-cocaine-and-sugar-rewards-processing/tree/main/Additional%20Figures>

#### 4.2.2.B Analiza modułowości mózgu

Wyliczone korelacje gęstości komórek c-Fos+ pomiędzy strukturami posłużyły do wyznaczenia grup struktur, które miały zbliżoną aktywność, czyli tzw. modułów. W tym celu, na podstawie korelacji obliczono odległość euklidesową, czyli relatywną odległość pomiędzy tymi strukturami. Te relatywne odległości posłużyły następnie do utworzenia grup podobnych struktur (Ryc. 25). Zgrupowanie struktur dla każdej grupy jest hierarchiczne, co oznacza, że liczba modułów zależy w nich od przyjętego stopnia podobieństwa aktywności pomiędzy strukturami.



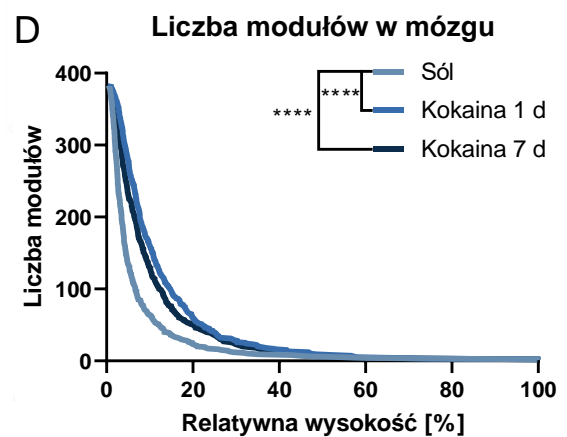
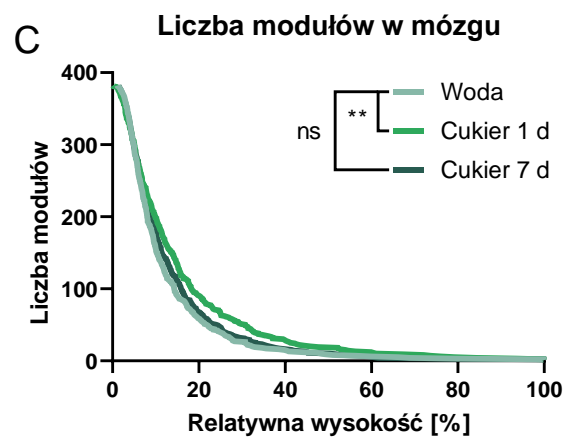
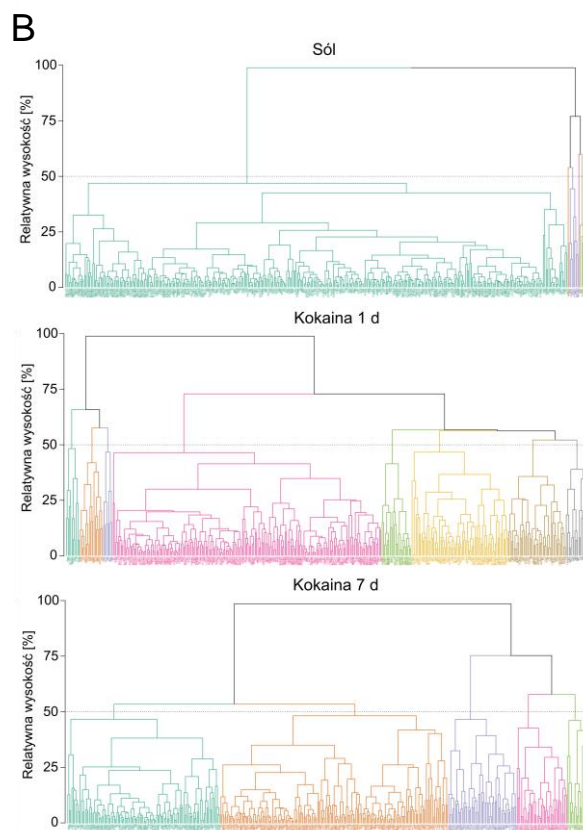
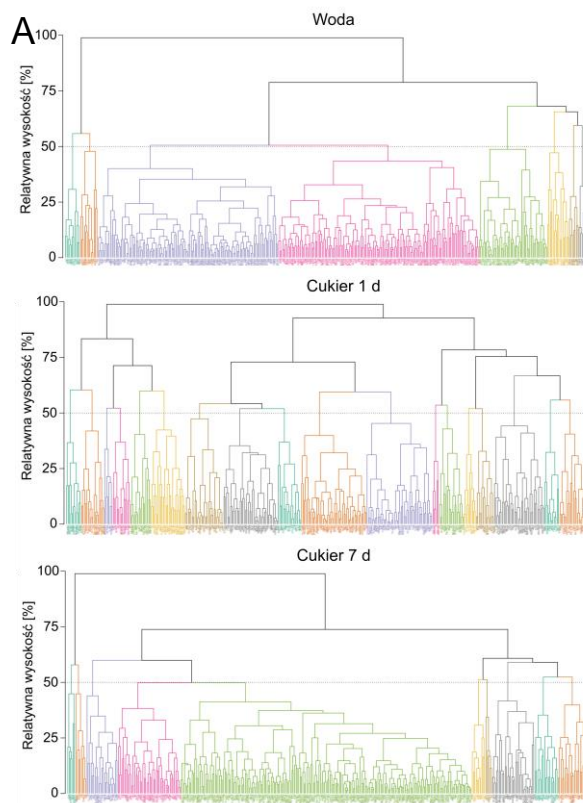
**Ryc. 25:** Mapy ciepłe podobieństwa aktywności pomiędzy strukturami dla grup eksponowanych na nagrody naturalne (górze) lub farmakologiczne (dół). Korelacje gęstości komórek c-Fos+ pomiędzy strukturami posłużyły do określenia dystansu euklidesowego

pomiędzy nimi, określającego jak poziom aktywności dla każdej ze struktur jest podobny do poziomu aktywności dla pozostałych struktur w mózgu. Dystanse te umożliwiły pogrupowanie struktur w moduły, czyli grupy struktur o podobnej gęstości komórek c-Fos+. Odległość euklidesowa (oznaczająca stopień podobieństwa aktywności) została zaznaczona kolorami, gdzie kolor czerwony oznacza wysokie podobieństwo, a kolor niebieski niskie. Na rycinie, struktury nie są zgrupowane wg. podziału anatomicznego, tylko hierarchicznie, według wyliczonego stopnia podobieństwa. Nad każdą mapą cieplną zaznaczono dendrogramy przedstawiające moduły w mózgu.

Liczebność grup: N Woda = 7; N Cukier 1 d = 5; N Cukier 7 d = 7; N Sól = 7; N Kokaina 1 d = 6; N Kokaina 7 d = 6, gdzie N = liczba zwierząt użytych w badaniu. Rycina w większej rozdzielczości dostępna jest również pod linkiem <https://github.com/BijochLukasz/Whole-brain-tracking-of-cocaine-and-sugar-rewards-processing/tree/main/Additional%20Figures>

Liczbę modułów w mózgu dla danego podobieństwa można określić na podstawie powstałych dendrogramów podobieństwa. Przykładowo, poprzez przecięcie dendrogramu na 50% jego wysokości wyróżniono 8 modułów dla grupy pijącej wodę, 18 dla grupy raz eksponowanej na cukier oraz 10 dla tej, w której myszy miały dostęp do cukru przez 7 dni (Ryc. 26A). W przypadku myszy dostających zastrzyki, przy 50% podobieństwie, grupa solna i grupa eksponowana siedmiokrotnie na kokainę miały po 5 modułów, a grupa otrzymująca jednorazowo narkotyk 8 (Ryc. 26B). Porównując liczbę modułów pomiędzy grupami uwzględniono cały zakres podobieństwa (0-100%), kiedy to liczba modułów wynosiła od 386 (każda struktura jest osobnym modułem) do 1 (wszystkie struktury traktowane są jako jeden wielki moduł). Określając zależności liczby modułów od stopnia podobieństwa pomiędzy nimi zauważono zwiększoną modułowość mózgu po jedno-, ale nie kilkukrotnym podaniu zwierzęciu słodkiej wody (Ryc. 26C). W przypadku grup dostających nagrodę farmakologiczną, oba schematy podania kokainy spowodowały wzrost modułowości mózgu myszy (Ryc. 26D).





**Ryc. 26. Modułowość mózgow myszy po ekspozycji na cukier lub kokainę. A, B) Dendrogramy stworzone na podstawie odległości euklidesowych pomiędzy strukturami (określającymi stopień podobieństwa ich aktywacji) dla myszy dostających nagrody naturalne**

(A) lub farmakologiczne (B). W zależności od podobieństwa (oznaczonego jako relatywna wysokość dendrogramu), struktury można pogrupować w różną liczbę modułów. Kolorami zaznaczono poszczególne moduły w momencie przecięcia dendrogramu w połowie jego wysokości. C, D) Wykresy przedstawiające zależność liczby modułów od relatywnej wysokości dendrogramu (przyjętego podobieństwa) dla grup eksponowanych na nagrody naturalne (C) i farmakologiczne (D).

Różnice modułowości pomiędzy badanymi grupami zmierzono testem Mantela-Coxa. \*\* oznacza  $p = 0,0013$  dla Woda vs. Cukier 1 d oraz \*\*\*\* oznacza  $p < 0,0001$  dla Sól vs. Kokaina 1 d i Sól vs. Kokaina 7 d. Liczebność grup: N Woda = 7; N Cukier 1 d = 5; N Cukier 7 d = 7; N Sól = 7; N Kokaina 1 d = 6; N Kokaina 7 d = 6, gdzie N = liczba zwierząt użytych w badaniu.

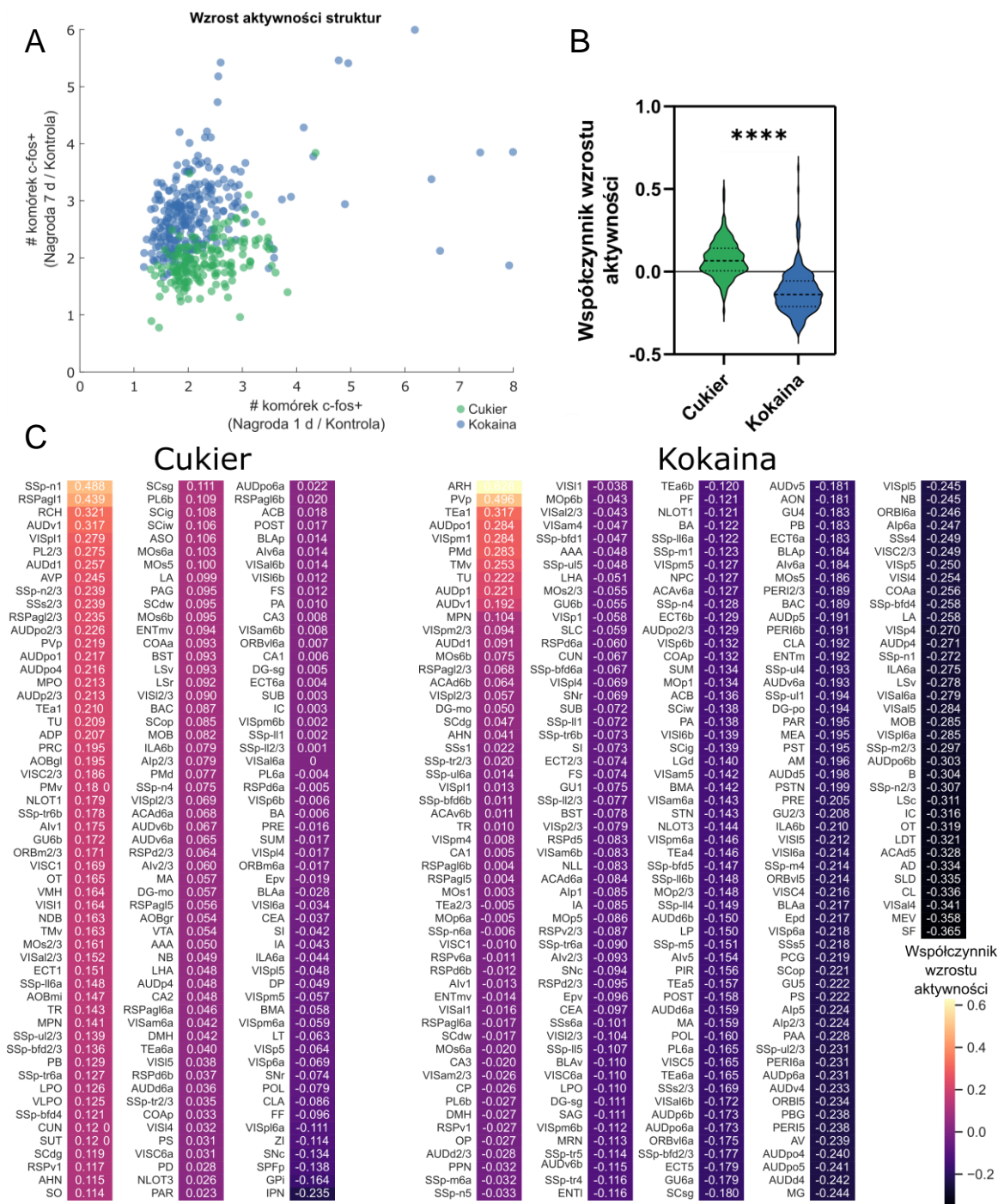
#### 4.2.3. Współczynnik wzrostu aktywności mózgu dla jedno- i kilkukrotnej ekspozycji na nagrody

Zauważono, że zarówno cukier, jak i kokaina aktywowały różną liczbę struktur w zależności od tego czy podawano je jednorazowo czy też kilkukrotnie. By dalej zobrazować efekty jedno- i kilkukrotnej ekspozycji zwierzęcia na nagrody, porównano średnie wzrosty liczby komórek *c-Fos+* w stosunku do kontroli dla poszczególnych struktur. Obliczając logarytm dziesiętny ze stosunku tych średnich wyliczono również współczynnik wzrostu aktywności dla danych struktur (Ryc. 27A). W analizie uwzględniono tylko te struktury, dla których poziom gęstości komórek *c-Fos+* był istotnie statystycznie zwiększony w przypadku jedno- lub kilkukrotnej ekspozycji na daną nagrodę.

W przypadku nagrody naturalnej średni współczynnik wzrostu aktywności dla wszystkich badanych struktur był dodatni (Ryc. 27B). Oznacza to, że średnio większa ekspresja *c-fos* nastąpiła po jednej, niż po siedmiu ekspozycjach na cukier (średnia = 0,075; SEM = 0,0083). W przypadku nagrody farmakologicznej, średnio współczynnik ten był ujemny i wyniósł -0,1202 (SEM = 0,0084; Ryc. 27B). W przypadku ekspozycji na cukier, strukturami o najwyższych współczynnikach były warstwa 1-sza pierwszorzędowej kory somatosensorycznej (SSp-n1; współczynnik = 0,488) i warstwa 1-sza części nieziarnistej kory retrosplenialnej (RSPag1; współczynnik = 0,4386; Ryc. 27C). Strukturami o najniższych współczynnikach wzrostu aktywności były jądro międzykonarowe (IPN; współczynnik = 0,235) oraz część wewnętrzna gałki bladej (Gpi; współczynnik = -0,164). Dla kokainy, strukturami, które miały więcej komórek po siedmio- niż po jednokrotnej ekspozycji, były jądra podwzgórza: jądro łukowate (ARH; współczynnik = 0,628) i jądro przykomorowe (PVp; współczynnik = 0,496). Jądrami mózgu, które miały najniższy współczynnik były jądro

trójdzielne śródmózgowia (MEV; współczynnik = -0,658) i jądro przegrodowo-strzępkowe (SF; współczynnik = -0,365; Ryc. 27C).

Spośród struktur uwzględnionych w analizach dla obu nagród, tymi o podobnych współczynnikach wzrostu aktywności były struktury wchodzące w skład formacji hipokampa: region CA1 (CA1; różnica bezwzględna = 0,0003) oraz warstwa komórkowa zakrętu zębatego (DG-mo; różnica bezwzględna = 0,0068), a także istota czarna (SNr; różnica bezwzględna = 0,0056). Strukturami najbardziej różniącymi te nagrody były warstwa pierwsza (SSp-n1; różnica bezwzględna = 0,7601) i druga/trzecia (SSp-n2/3; różnica bezwzględna = 0,5457) pierwszorzędowej kory somatosensorycznej oraz guzki węchowe (OT; różnica bezwzględna = 0,484).



**Ryc. 27: Współczynnik wzrostu aktywności mózgu dla jedno- i kilkukrotnej ekspozycji na nagrody.** A) Wykres przedstawiający stosunki liczby komórek c-Fos+ w poszczególnych strukturach dla ekspozycji jednodniowej (oś pozioma) i siedmiodniowej (oś pionowa) na nagrody do grup kontrolnych. Zielonymi punktami zaznaczono wyniki dla ekspozycji na cukier, a niebieskimi na kokainę. B) Wykres porównujący rozkład współczynnika wzrostu aktywności dla cukru i kokainy. Liniami przerywanymi zaznaczono średnie i punktowymi rozstępami kwartylne. Wzrost aktywności mierzono tylko dla struktur, które miały istotnie statystycznie więcej komórek c-Fos+ podczas jednej lub siedmiokrotnej ekspozycji na cukier lub kokainę.

Wielkość grup dla Cukru N = 165, a dla Kokainy N = 255. Różnice pomiędzy współczynnikami wzrostu aktywności dla cukru i kokainy porównano testem t dla prób niezależnych. \*\*\*\* oznacza  $p < 0,0001$ . C) Współczynniki wzrostu aktywności dla pojedynczych struktur.

#### **4.2.4. Pomiar liczby komórek c-Fos+ w poszczególnych strukturach mózgowych myszy eksponowanych na cukier lub kokainę**

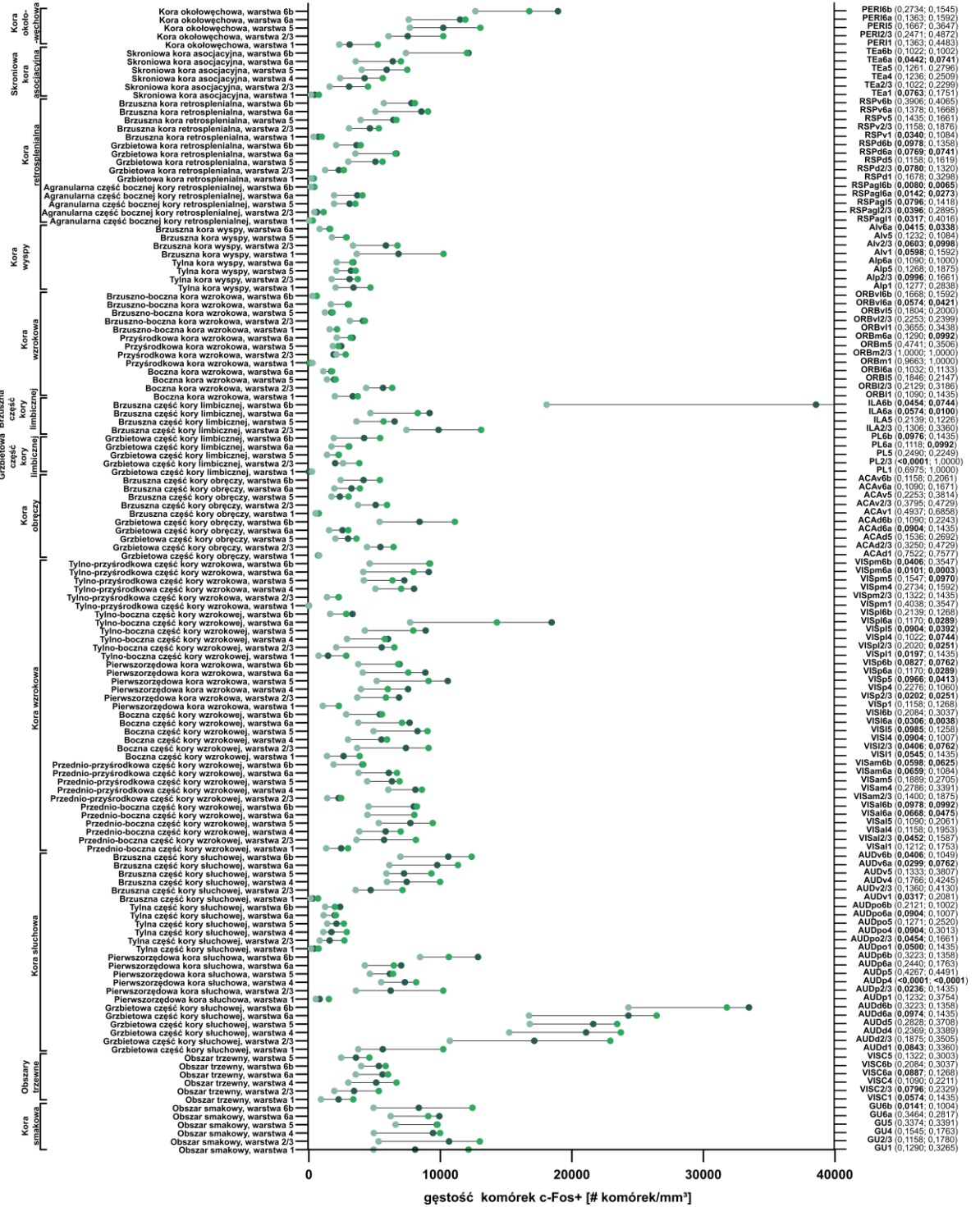
Na wykresach umieszczonych na ryc. 28 przedstawiono średnie wyniki gęstości komórek c-Fos+ w analizowanych strukturach mózgowych. W przypadku nagrody naturalnej, kolorem bładozielonym oznaczono grupę kontrolną (Woda), jasnozielonym grupę otrzymującą jednorazowo cukier (Cukier 1 d), a ciemnozielonym grupę myszy otrzymujących cukier przez siedem dni (Cukier 7 d). W przypadku nagrody farmakologicznej, kolorem bładoniebieskim oznaczono grupę kontrolną (Sól), jasnoniebieskim grupę otrzymującą jednorazowo kokainę (Kokaina 1 d), a ciemnoniebieskim grupę myszy otrzymujących kokainę przez siedem dni (Kokaina 7 d).

Struktury zgrupowano wg. organizacji anatomicznej zaproponowanej w Allen'owskim Atlasie Mysiego Mózgu. Z prawej strony wykresów są pełne nazwy struktur, a z lewej ich skróty oraz wartości p dla grup otrzymujących nagrody jednokrotnie i siedmiokrotnie. Pogrubione cyfry oznaczają, że dla danej grupy struktura miała istotnie statystycznie zwiększoną liczbę komórek c-Fos+. Klamry po lewych stronach wykresów grupują struktury w nadrzędne części mózgu.

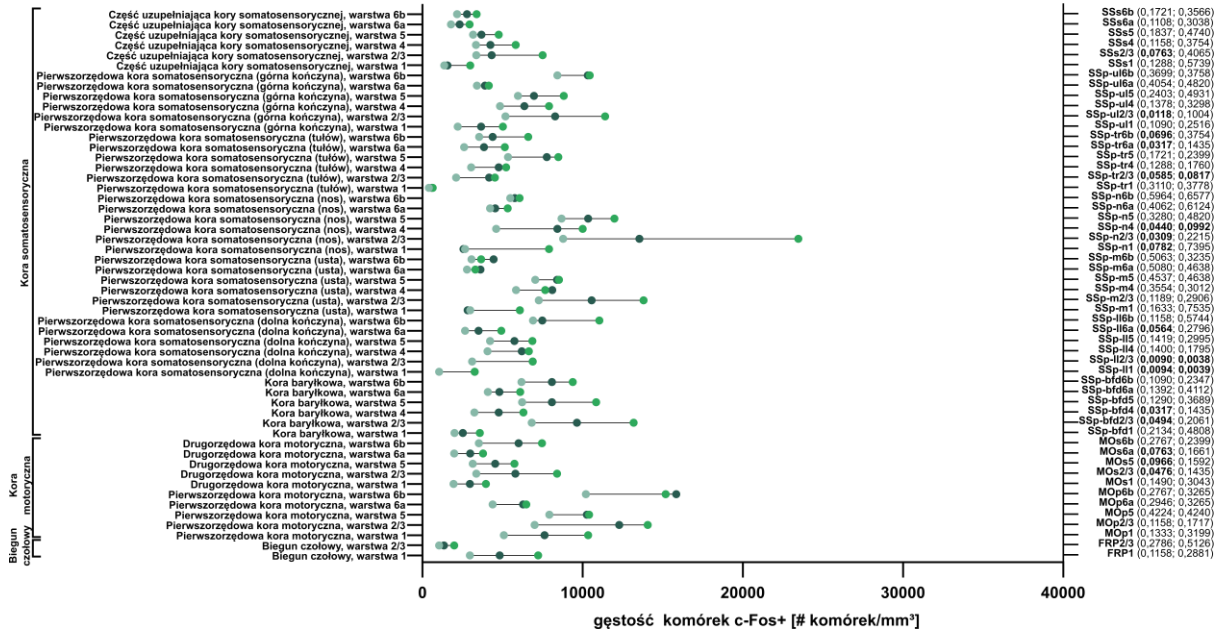
Rycina w większej rozdzielczości dostępna jest również pod linkiem:

<https://github.com/BijochLukasz/Whole-brain-tracking-of-cocaine-and-sugar-rewards-processing/tree/main/Additional%20Figures/Ryc.28>

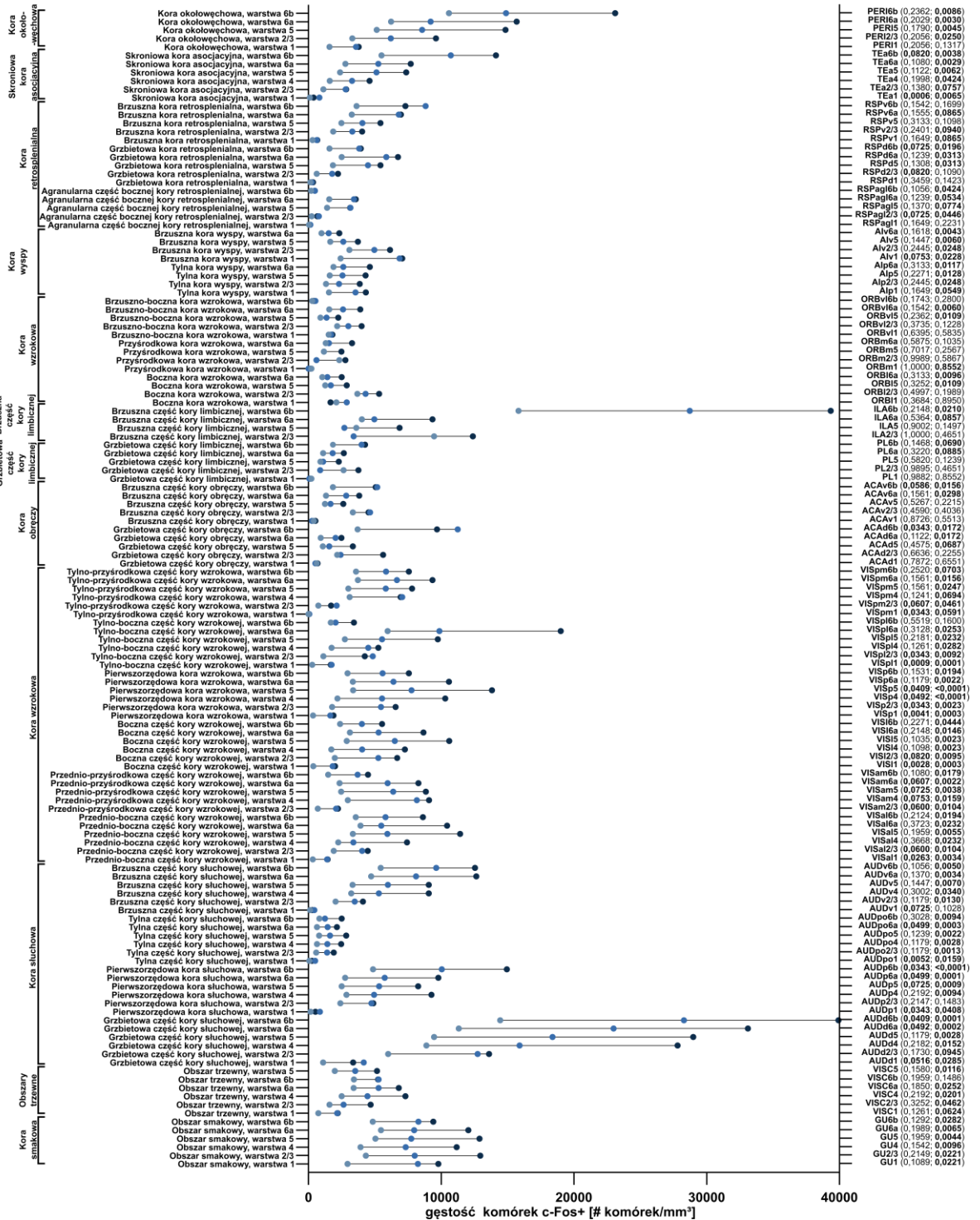
# Kora nowa



# Kora nowa (ciąg dalszy)

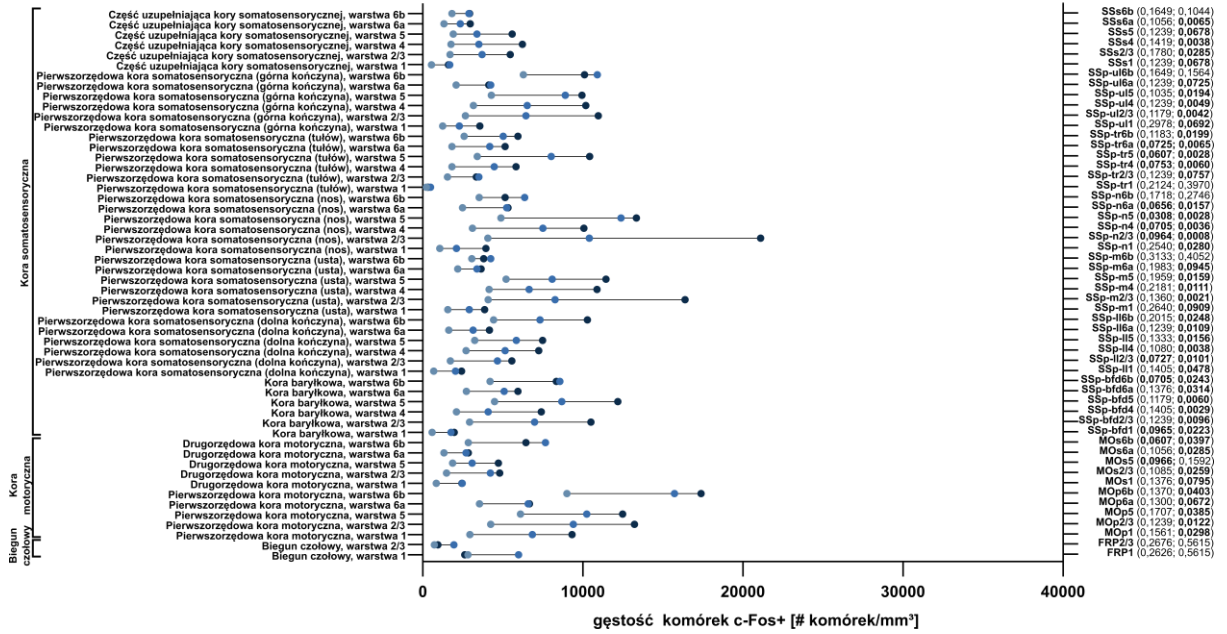


# Kora nowa

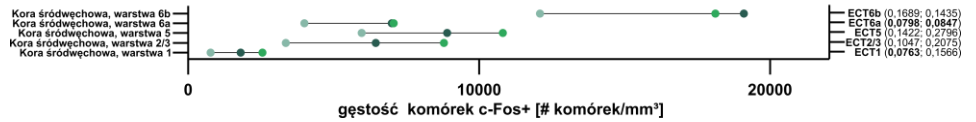




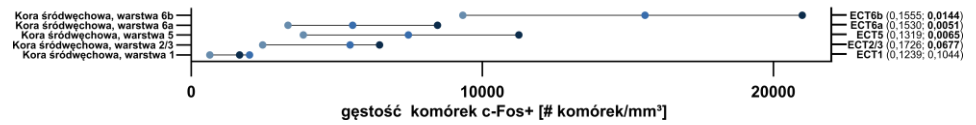
## Kora nowa (ciąg dalszy)



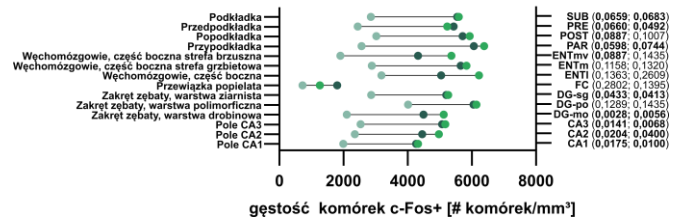
## Kora śródwęchowa



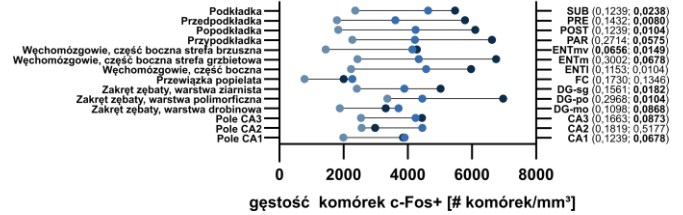
## Kora śródwęchowa



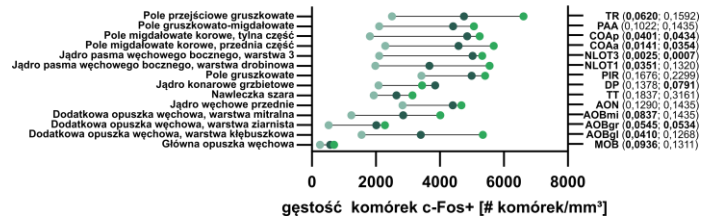
## Formacja hipokampu



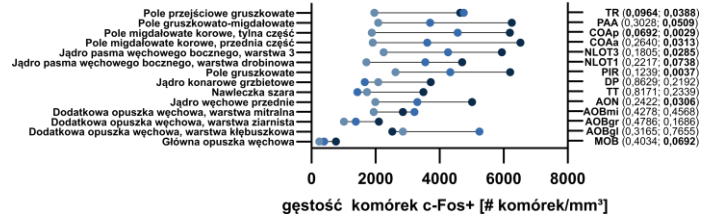
## Formacja hipokampu



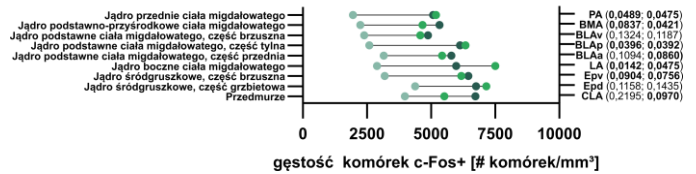
## Okolice węchowe



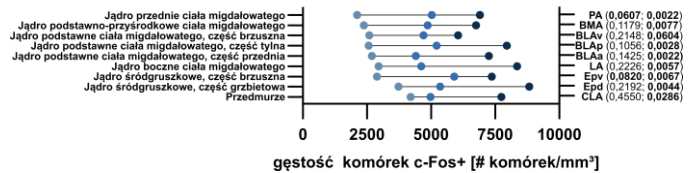
## Okolice węchowe



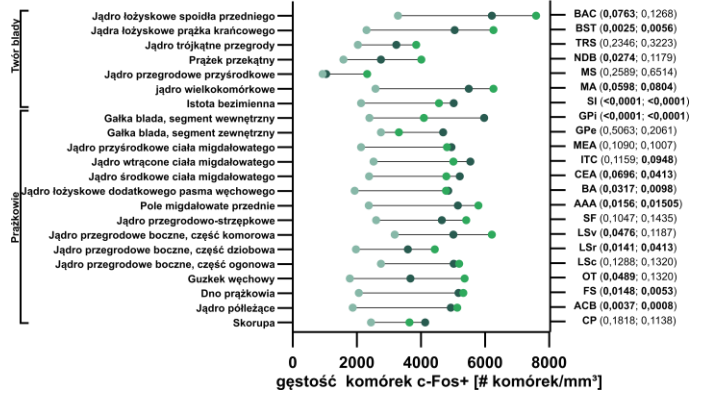
## Warstwa podpłytkowa kory



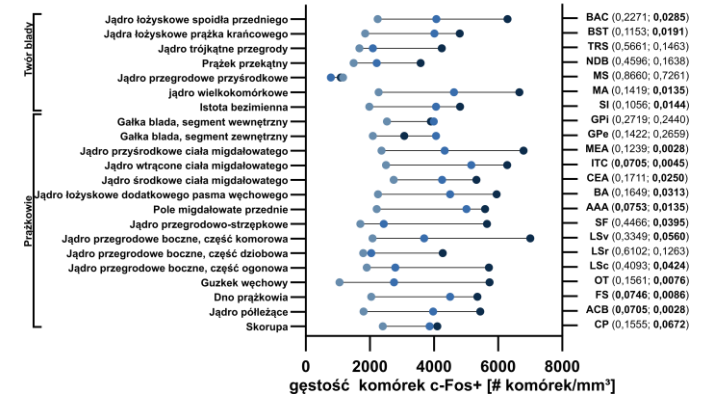
## Warstwa podpłytkowa kory



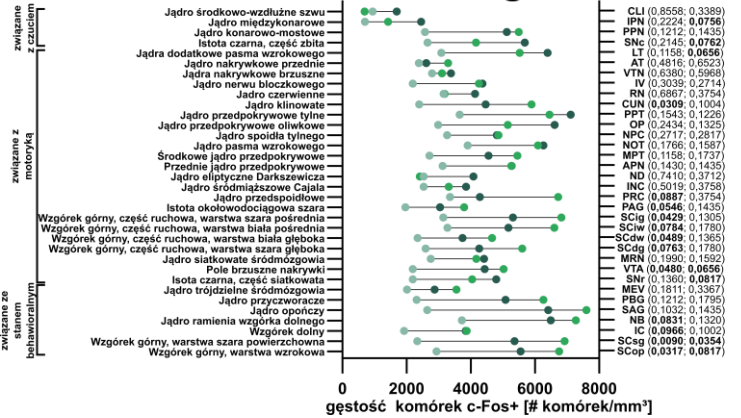
## Jądra podkorowe



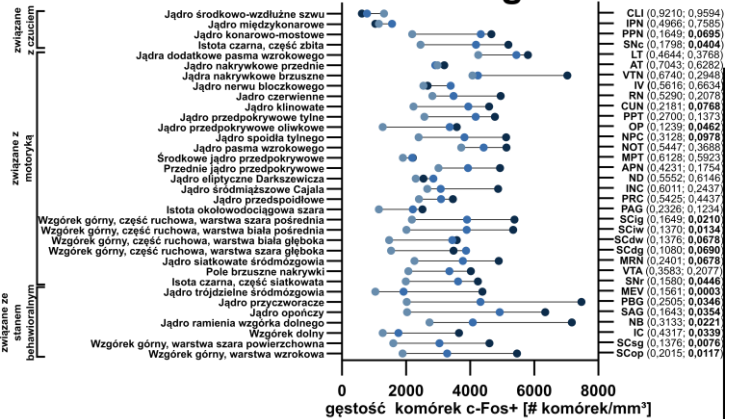
## Jądra podkorowe



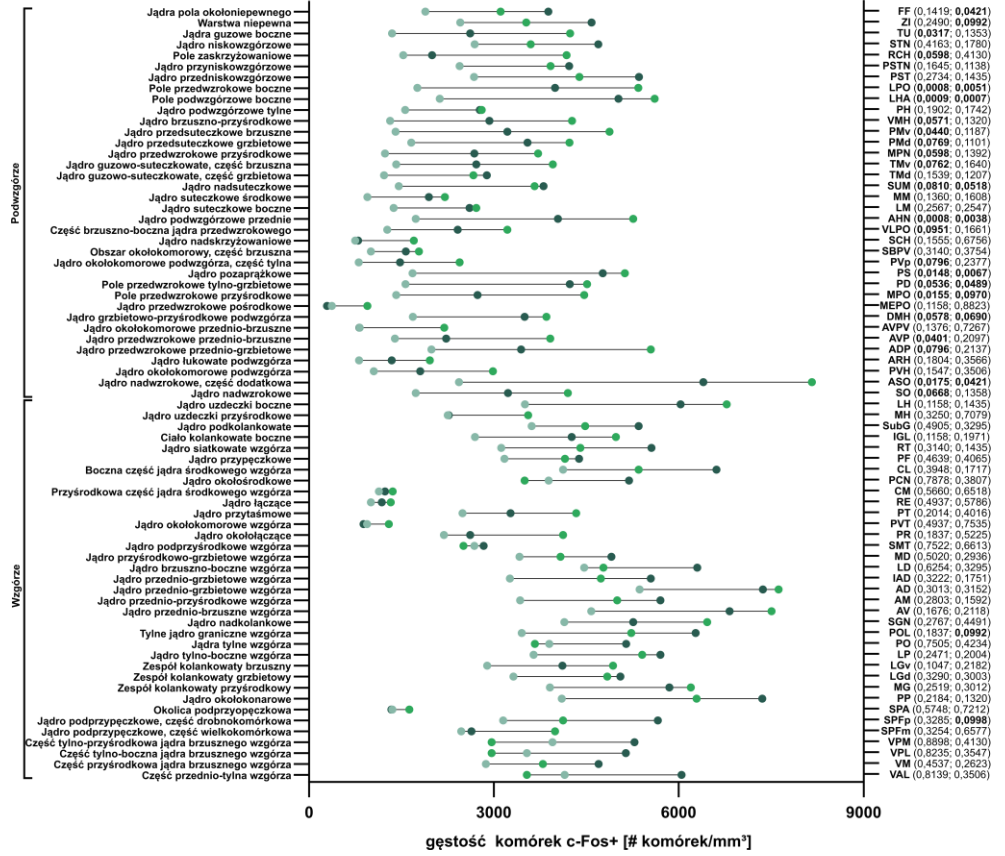
## Śródmózgowie



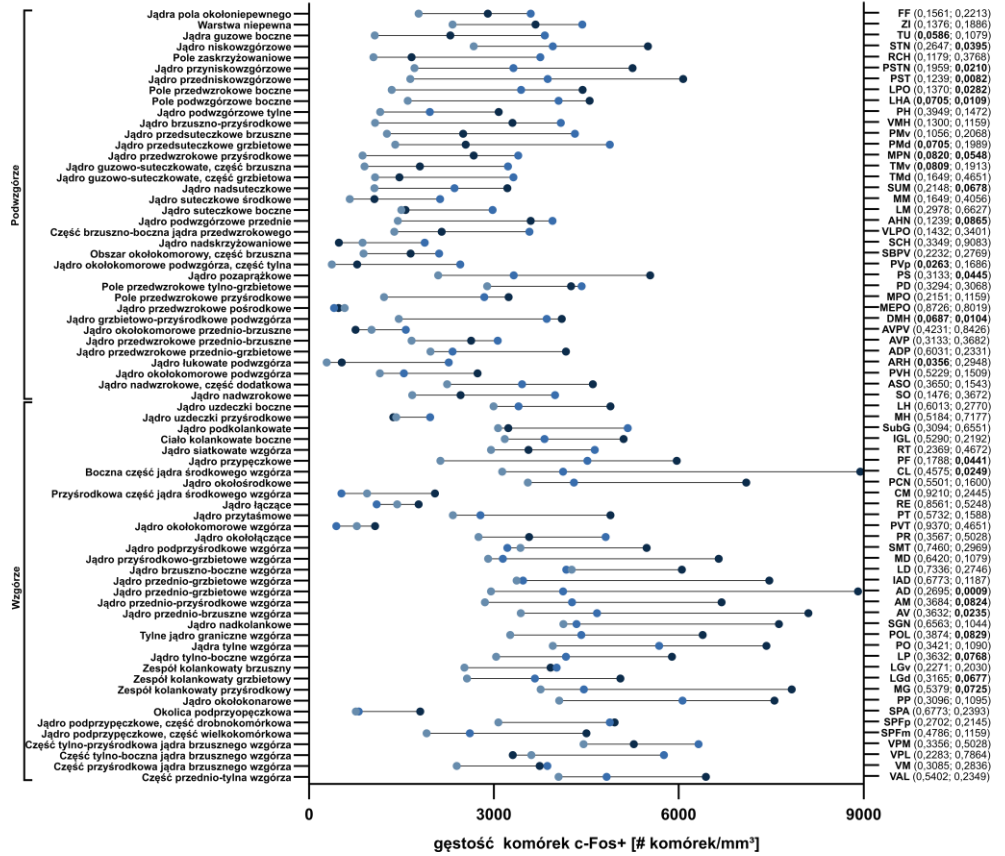
## Śródmózgowie

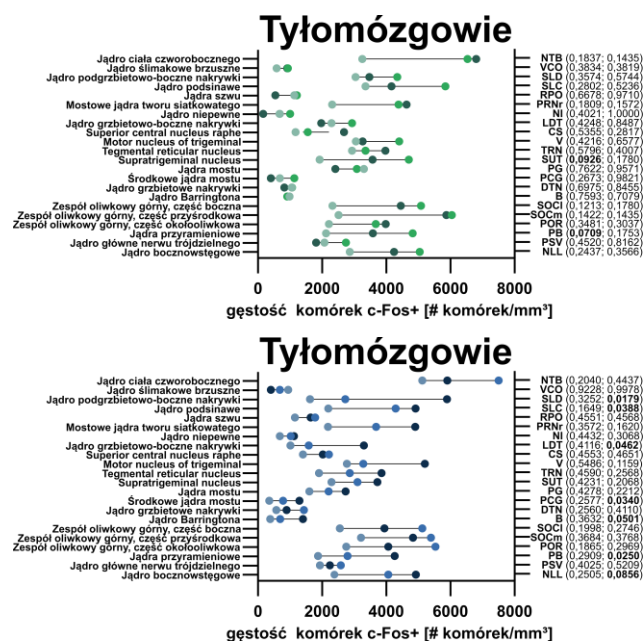


# Międzymózgowie



# Międzymózgowie





**Ryc. 28: Średnie gęstości komórek c-Fos+ w poszczególnych strukturach mózgowych myszy eksponowanych na cukier lub kokainę.** W przypadku nagrody naturalnej (odcienie zieleni), kolorem bladozielonym oznaczono grupę kontrolną (Woda), jasnozielonym grupę otrzymującą jednorazowo cukier (Cukier 1 d), a ciemnozielonym grupę myszy otrzymujących cukier przez siedem dni (Cukier 7 d). W przypadku nagrody farmakologicznej (odcienie niebieskiego), kolorem bladoniebieskim oznaczono grupę kontrolną (Sól), jasnoniebieskim grupę otrzymującą jednorazowo kokainę (Kokaina 1 d), a ciemnoniebieskim grupę myszy otrzymujących kokainę przez siedem dni (Kokaina 7 d).

Struktury zgrupowano wg. organizacji anatomicznej zaproponowanej w Allen'owskim Atlasie Mysiego Mózgu i nazwy nadrzędne umieszczono nad wykresami. Z lewej strony wykresów umieszczono pełne nazwy struktur, a z prawej odpowiadające im skróty oraz wartości p, gdzie: (p dla nagroda 1 d; p dla nagroda 7 d). Pogrubione wartości p oznaczają, że dla danej grupy struktura miała istotnie statystycznie zwiększoną liczbę komórek c-Fos+. Klamry po lewej stronie wykresów grupują struktury w struktury nadrzędne. Liczebność grup: N Woda = 7; N Cukier 1 d = 5; N Cukier 7 d = 7; N Sól = 7; N Kokaina 1 d = 6; N Kokaina 7 d = 6, gdzie N = liczba zwierząt użytych w badaniu. Istotność statystyczną dla każdej struktury obliczano przy użyciu GLM z *post hoc* testem Dunnetta i korekcją testem Benjamini-Hochberga; różnice pomiędzy grupami uznano za istotne statystycznie, gdy  $p < 0,1$ .

Rycina w większej rozdzielczości dostępna jest również pod linkiem:

<https://github.com/BijochLukasz/Whole-brain-tracking-of-cocaine-and-sugar-rewards-processing/tree/main/Additional%20Figures/Ryc.28>

### **4.3. Analiza zmian plastycznych w środkowym jądrze ciała migdałowatego po ekspozycji zwierzęcia na nagrody**

Eksperyment z objętościowym badaniem liczby komórek c-Fos+ wykazał, że zarówno nagrody naturalne, jak i farmakologiczne wywołują aktywację rozległych części mózgu. W przypadku wielu struktur, wzór aktywacji pokrywał się dla obu nagród. W innych eksperymentach wykazano, że ekspozycja na sacharozę powoduje podobne zmiany plastyczne jak ekspozycja na kokainę w neuronach ACB<sup>48</sup>. W niniejszej rozprawie doktorskiej opisany został wpływ ekspozycji na cukier oraz na kokainę na zmiany plastyczne w innej strukturze układu nagrody, CeA.

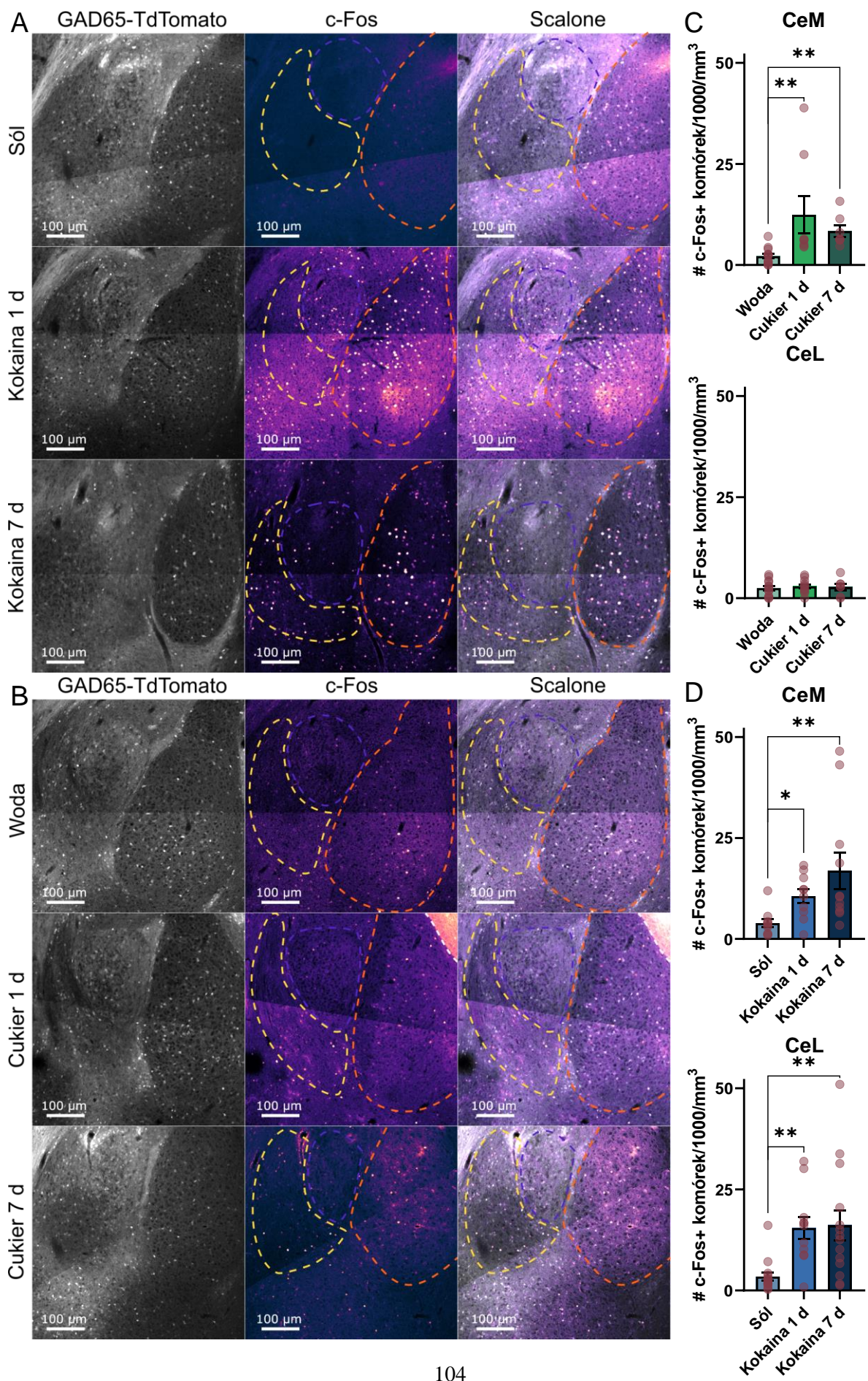
#### **4.3.1. Analiza ekspresji genów wczesnej odpowiedzi w jądrze środkowym ciała migdałowatego u myszy eksponowanej na nagrody**

##### **4.3.1.A Analiza i lokalizacja komórek c-Fos-pozytywnych**

Badania obecności komórek c-Fos+ w całym mózgu wskazało na podwyższoną aktywność CeA po siedmiodniowej ekspozycji zwierzęcia na kokainę oraz jednorazowej i kilkukrotnej na sacharozę. W badaniach tych nie rozróżniono jednak poszczególnych części CeA, a z poprzednich badań wiadomo, że jego składowe, CeM i CeL, mogą być odmiennie zaangażowane w przetwarzanie różnych bodźców o znaczeniu emocjonalnym. Dlatego też przeprowadzono badania c-Fos standardowymi technikami immunohistochemicznymi, które umożliwiają taki podział.

Ta dokładniejsza analiza poziomu c-Fos wykazała, że jego zwiększony poziom w przypadku ekspozycji na sacharozę dotyczy tylko CeM (Ryc. 29A, C). Liczba komórek c-Fos+ na mm<sup>3</sup> w porównaniu do ekspozycji na wodę (średnia = 2,186; SEM = 0,572) była wyższa zarówno po jedno- (średnia = 12,410; SEM = 4,647), jak i siedmiodniowej ekspozycji na słodką wodę (średnia = 8,396; SEM = 1,465). W CeL nie zaobserwowano zmian poziomu liczby komórek c-Fos+ na mm<sup>3</sup>, i w przypadku jednokrotnej ekspozycji na sacharozę wyniósł on średnio 2,930 (SEM = 0,519), a siedmiokrotnej 2,761 (SEM = 0,815). Wyniki te były zbliżone do warunków kontrolnych (średnia = 2,496; SEM = 0,551).

W przypadku ekspozycji na kokainę, wzrost liczby komórek c-Fos+ dotyczył zarówno CeM, jak i CeL (Ryc. 29B, D). Ponadto, inaczej do wyników zaobserwowanych z holistycznego badania poziomu c-Fos, tym razem aktywację CeA zaobserwowano również podczas pojedynczej ekspozycji zwierzęcia na narkotyk i liczba komórek c-Fos+ na mm<sup>3</sup> w CeM była średnio wyższa o 6,668, a w CeL o 12,03 od warunków kontrolnych. Po siedmiokrotnej ekspozycji na narkotyk zaobserwowano w CeM więcej o 12,998, a w CeL więcej o 12,68 komórek c-Fos+ mm<sup>3</sup> niż po ekspozycji na sól fizjologiczną.





**Ryc. 29: Poziom c-Fos w środkowym jądrze ciała migdałowatego po ekspozycji myszy na nagrody.** **A, B)** Przykładowe zdjęcia regionu ciała migdałowatego na skrawkach myszy eksponowanych na nagrody naturalne (**A**) i farmakologiczne (**B**). Bazując na obecności barwnika TdTomato w komórkach z GAD65 wyróżniono poszczególne obszary ciała migdałowatego: CeM (żółty), CeL (niebieski) i BLA (ceglasty). Środkowe panele przedstawiają sygnał pochodzący z komórek z białkiem c-Fos (białe kropki). **C, D)** Wykresy przedstawiające liczbę komórek c-Fos+ w CeM i CeL myszy eksponowanych na cukier (**C**) lub kokainę (**D**). Wykresy przedstawiają średnie oraz  $\pm$  SEM. Czerwonymi kropkami przedstawiono wyniki dla pojedynczych myszy. Na wykresach \* i \*\* oznaczają kolejno:  $p < 0,01$  i  $p < 0,01$ .

Liczebność grup: dla CeM N Woda = 13(13); N Cukier 1 d = 8(8); N Cukier 7 d = 7(7); N Sól = 10(11); N Kokaina 1 d = 10(10); N Kokaina 7 d = 11(12) i dla CeL N Woda = 13(13); N Cukier 1 d = 11(11); N Cukier 7 d = 7(7); N Sól = 15(16); N Kokaina 1 d=11(11); N Kokaina 7 d = 14(15) i dla CeL, gdzie N = liczba zwierząt użytych w badaniu (liczba użytych skrawków). Różnice pomiędzy badanymi grupami zmierzono testem Kruskalla-Wallisa (dla **C** CeM i **D**) oraz testem jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA (dla **C** CeL). Wartości p dla CeM: Woda vs. Cukier 1 d = 0,0040; Woda vs. Cukier 7 d = 0,0016; Sól vs. Kokaina 1 d = 0,0220; Sól vs. Kokaina 7 d = 0,0044. Wartości p dla CeL: Sól vs. Kokaina 1 d = 0,0026; Sól vs. Kokaina 7 d = 0,0058.

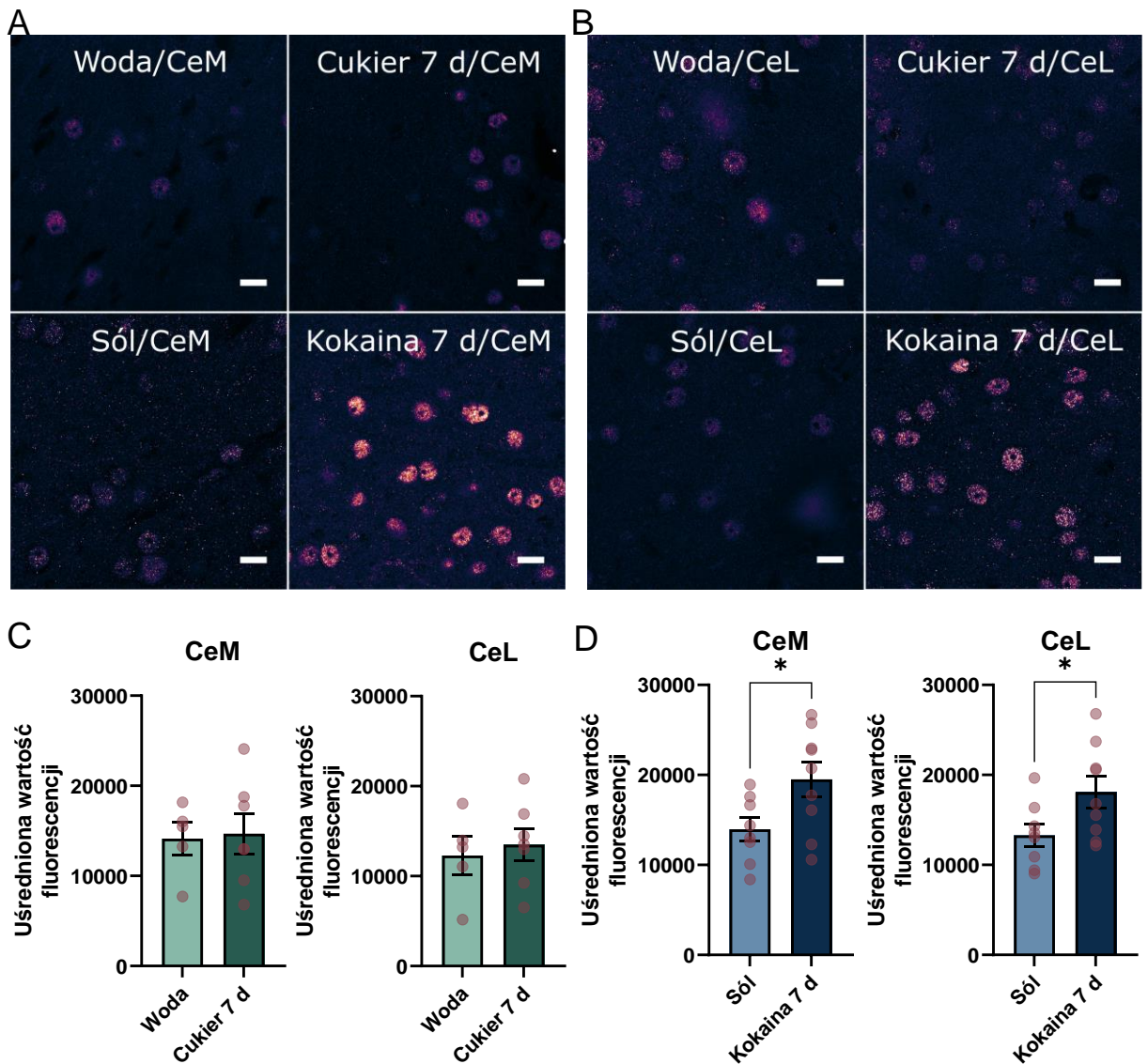
#### 4.3.1.B Analiza poziomu Arc

Kolejnym badanym genem wczesnej odpowiedzi był gen *arc*, którego rezultatem ekspresji jest białko Arc. W przeciwieństwie do c-Fos, jego obecność nie jest ograniczona tylko do jądra komórkowego i Arc znajduje się również w innych częściach neuronu, m.in. na synapsach<sup>102</sup>. Ponadto zauważono, że wszystkie badane komórki wykazywały wysoki bazowy poziom badanego białka i w przeciwieństwie do badania ekspresji *c-fos*, niemożliwym okazało się policzenie komórek Arc-pozytywnych. Z tego powodu, do określenia poziomu Arc zdecydowano się na użycie obiektywu o większym powiększeniu i badanie uśrednionego sygnału fluorescencji. W związku z tym, że obserwowalne wcześniej zwiększenie poziomu c-Fos było lepiej unaocznione podczas kilkakrotnych prezentacji nagród, poziom Arc badano tylko po siedmiokrotnej ekspozycji na sacharozę lub kokainę.

Ekspozycja na cukier nie wywołała zwiększonego poziomu Arc w CeA i uśredniona wartość fluorescencji w CeM (średnia = 14698; SEM = 2232) i w CeL (średnia = 13496; SEM = 1780) była zbliżona do warunków kontrolnych (dla CeM: średnia = 14127 i SEM = 1783 oraz dla CeL: średnia = 12299 i SEM = 2113; Ryc. 30A, C).

Zwiększony poziom Arc zaobserwowano jednak w neuronach na skrawkach mózgu pochodzących od myszy eksponowanych na nagrodę farmakologiczną (Ryc. 30B, D). Siedmiodniowa ekspozycja zwierzęcia na kokainę spowodowała wzrost poziomu Arc

w stosunku do kontroli zarówno w CeM, jak i w CeL. Wartość uśrednionej fluorescencji dla CeM wyniosła średnio 19516 (SEM = 1905), a dla CeL 18087 (SEM = 1715) i była wyższa od warunków kontrolnych o 5565 (w CeM) i o 4801 (w CeL).



**Ryc. 30: Poziom Arc w środkowym jądrze ciała migdałowatego po ekspozycji myszy na nagrody. A, B** Przykładowe zdjęcia komórek CeM i CeL z wyznakowanym białkiem Arc na skrawkach myszy ekspozowanych na nagrody naturalne (A) i farmakologiczne (B). Skala 25  $\mu$ m. **C, D** Wykresy przedstawiające uśrednioną wartość fluorescencji pochodzącą z Arc w komórkach CeM i CeL myszy ekspozowanych na cukier (C) lub kokainę (D). Wykresy przedstawiają średnie oraz  $\pm$  SEM. Czerwonymi kropkami przedstawiono wyniki dla pojedynczych myszy. Na wykresach \* oznacza  $p < 0,05$ .

Liczebność grup dla CeM wynosiła N Woda = 5(65); N Cukier 7 d = 7(78); N Sól = 8(125); N Kokaina 7 d = 9(124) oraz dla CeL N Woda = 5(60); N Cukier 7 d = 7(68); N Sól = 8(118); N Kokaina 7 d = 9(116), gdzie N = liczba zwierząt użytych w badaniu (liczba zobrazowanych płaszczyzn). Różnice pomiędzy badanymi grupami zmierzono testem t dla prób niezależnych, gdzie wartości p dla CeM: Sól vs. Kokaina 7 d = 0,0328. Wartości p dla CeL: Sól vs. Kokaina 7 d = 0,0436.

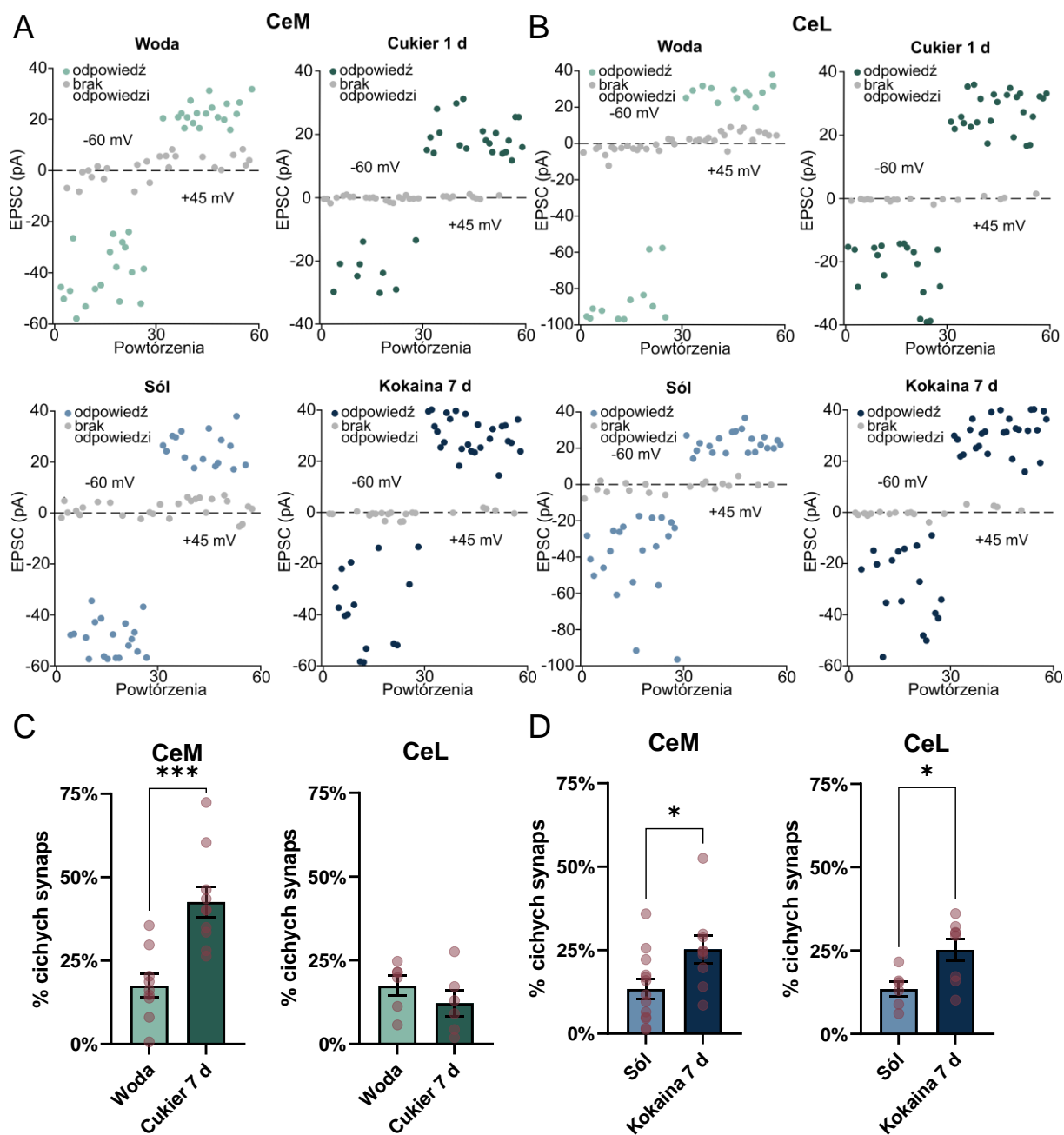
#### **4.3.2. Analiza plastyczności synaptycznej w jądrze środkowym ciała migdałowatego**

Ekspresja IEGs towarzyszy późnym fazom LTP i LTD. By potwierdzić, że zaobserwowanym wcześniej zwiększonym poziomom c-Fos i Arc w CeA towarzyszą zmiany w plastyczności synaptycznej, zmierzono markery tych procesów w neuronach myszy eksponowanych na cukier lub kokainę.

##### **4.3.2.A Analiza poziomu milczących synaps w jądrze środkowym ciała migdałowatego**

Analiza poziomu milczących synaps w CeA wykazała odrębne zaangażowanie CeM i CeL w przetwarzanie informacji o nagrodach farmakologicznych i naturalnych. Podobnie jak w przypadku badania poziomu białka c-Fos, ekspozycja zwierzęcia na słodką wodę spowodowała wzrost liczby milczących synaps tylko w CeM. Po siedmiu dwugodzinnych ekspozycjach zwierzęcia na słodką wodę wyniósł on średnio 30,15% (SEM = 2,77%), a w przypadku grupy kontrolnej 17,52%. W CeL nie zaobserwowano zwiększonego poziomu milczących synaps i ich średni poziom w obu grupach wyniósł poniżej 20% (Ryc. 31C).

Ekspozycja na kokainę spowodowała wzrost procentowego udziału milczących synaps zarówno w neuronach CeM, jak i CeL. W CeM wzrost ten wyniósł średnio 25,20% (SEM = 4,11%) po siedmiodniowej ekspozycji zwierzęcia na kokainę i był wyższy o 11,79% od warunków kontrolnych. Podobny wzrost poziomu milczących synaps zaobserwowano w CeL. Siedmiodniowa ekspozycja na kokainę spowodowała wzrost ich poziomu do 25,21% (więcej o 11,73% w stosunku do grupy kontrolnej; Ryc. 31D).



**Ryc. 31: Wpływ ekspozycji zwierzęcia na nagrodę uzależniającą lub naturalną na poziom milczących synaps w CeA myszy. A, B) Przykładowe nagrania poziomu milczących synaps dla komórki CeM z myszy eksponowanej na nagrodę naturalną (A) lub farmakologiczną (B). Kropkami zaznaczono amplitudę nagranych prądów zależnych od AMPAR (dla potencjału -60 mV) i od NMDAR (dla potencjału +45 mV). Szare kropki oznaczają brak odpowiedzi na stymulację, a kolorowe jej wystąpienie. C, D) Wykresy przedstawiające procentowy poziom milczących synaps w komórkach CeM i CeL myszy eksponowanych na cukier (C) lub kokainę (D). Wykresy przedstawiają średnie oraz  $\pm$  SEM. Czerwonymi kropkami przedstawiono wyniki dla pojedynczych myszy. Na wykresach \* i \*\*\* oznaczają kolejno  $p < 0,05$  i  $p < 0,001$ .**

Liczebność grup dla CeM wynosiła N Woda = 9(30); N Cukier 7 d = 10(38); N Sól = 13(39); N Kokaina 7 d = 9(26) oraz dla CeL N Woda = 6(34); N Cukier 7 d = 6(25); N Sól = 6(19); N Kokaina 7 d = 8(30), gdzie N = liczba zwierząt użytych w badaniu (liczba nagranych

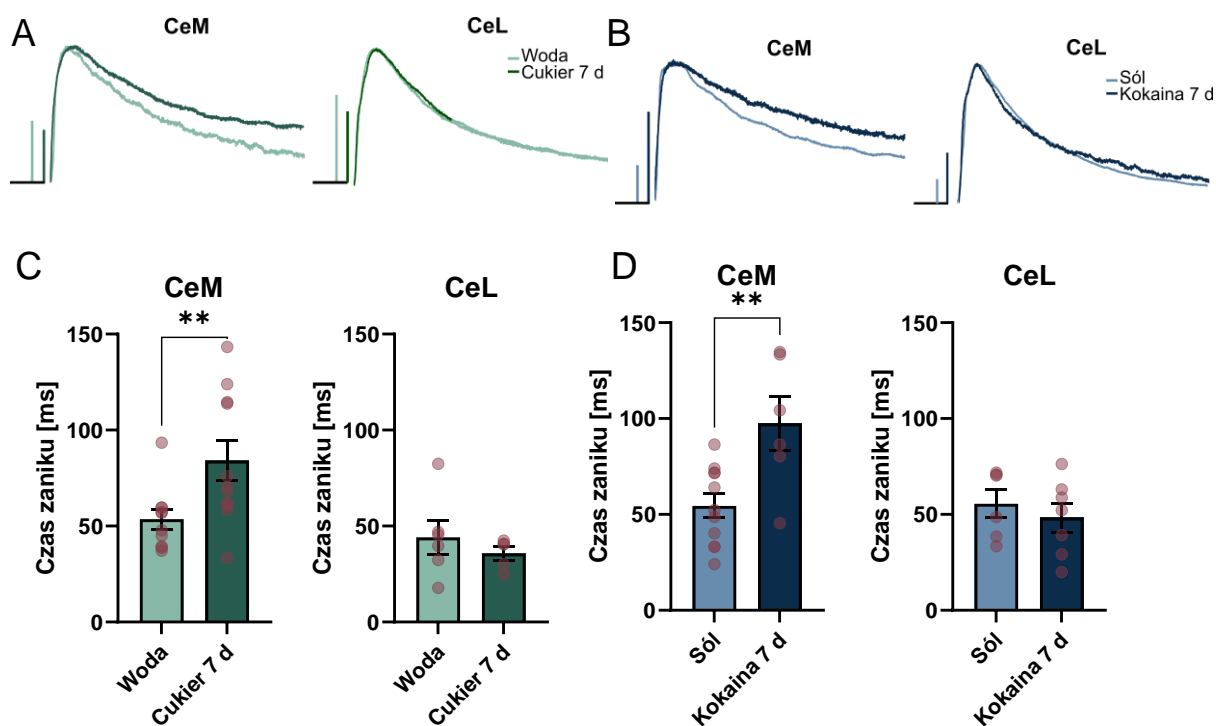
komórek). Różnice pomiędzy badanymi grupami zmierzono testem t dla prób niezależnych, gdzie wartości p dla CeM: Woda vs. Cukier 7 d = 0,0005 oraz Sól vs. Kokaina 7 d = 0,0242. Wartości p dla CeL: Sól vs. Kokaina 7 d = 0,0187. EPSCs – (postsynaptyczne prądy pobudzające; ang. *excitatory postsynaptic currents*).

#### **4.3.2.B Analiza kinetyki prądów zależnych od receptora dla NMDA w jądrze środkowym ciała migdałowatego**

Zmiany plastyczne w neuronach prowadzą do wzmocnienia lub osłabienia transdukcji sygnału w sieci nerwowej, co może następować przez tworzenie nowych synaps lub eliminację tych już istniejących. Nowopowstałe synapsy na kolcach dendrytycznych charakteryzują się obecnością specyficznej podjednostki GluN2B (dawniej znane też jako NR2B) w NMDAR. Wpływa ona na kinetykę otwierania NMDAR, powodując że pozostaje on dłużej przepuszczalny dla kationów, a jej obecność można zbadać technikami elektrofizjologicznymi mierząc zależne od NMDAR EPSCs.

Analiza kinetyki prądów zależnych od NMDAR neuronów w CeM wykazała, że uległa ona zmianie po ekspozycji zwierzęcia zarówno na nagrodę naturalną, jak i uzależniającą (Ryc. 32). W grupie zwierząt dostających słodką wodę, czas zaniku nagrywanych prądów wyniósł średnio 70,45 ms (SEM = 10,29 ms) i był on o 18,07 ms dłuższy niż w neuronach nagranych od zwierząt w grupie kontrolnej (Ryc. 32A, C). W przypadku kokainy, czas zaniku tych prądów wyniósł średnio 97,45 ms (SEM = 13,96 ms) i był on o 42,97 ms dłuższy niż u zwierząt, które dostawały zastrzyki z soli fizjologicznej (Ryc. 32B, D).

W CeL nie zaobserwowano podobnych zmian w kinetyce prądów zależnych od NMDAR. Średni czas zaniku prądów nagranych z neuronów myszy dostającej sacharozę (średnia = 35,71 ms; SEM = 3,5 ms) nie różnił się od tych nagranych z myszy kontrolnych (średnia = 44,08 ms; SEM = 8,81 ms; Ryc. 32C). Ekspozycja na kokainę również nie wpłynęła na kinetykę tych prądów (średnia = 48,37 ms; SEM = 7,53 ms), która była podobna jak w grupie kontrolnej (średnia = 55,57 ms; SEM = 7,18 ms; Ryc. 32D).



**Ryc. 32: Czas zaniku prądów zależnych od NMDAR w CeA myszy eksponowanych na nagrody naturalne lub farmakologiczne** **A, B**) Przykładowe nagrania prądów zależnych od NMDAR nagranych z komórek CeA myszy eksponowanych na nagrody naturalne **(A)** lub farmakologiczne **(B)**. Pozioma skala przy wykresach oznacza 20 ms i pionowa 30 pA. **C, D**) Wykresy przedstawiające czas zaniku prądów zależnych od NMDAR w komórkach CeM i CeL myszy eksponowanych na cukier **(C)** lub kokainę **(D)**. Wykresy przedstawiają średnie oraz  $\pm$  SEM. Czerwonymi kropkami przedstawiono wyniki dla pojedynczych myszy. Na wykresach \*\* oznacza  $p < 0,01$ .

Liczebność grup dla CeM wynosiła N Woda = 11(35); N Cukier 7 d = 11(26); N Sól = 11(25); N Kokaina 7 d = 6(9) oraz dla CeL N Woda = 6(27); N Cukier 7 d = 7(27); N Sól = 6(22); N Kokaina 7 d = 6(24), gdzie N = liczba zwierząt użytych w badaniu (liczba nagranych komórek). Różnice pomiędzy badanymi grupami zmierzono testem Manna-Whitney'a dla **B** CeM i testem t dla prób niezależnych dla **B** CeL oraz **C**. Wartości p dla CeM: Woda vs. Cukier 7 d = 0,0005 oraz Sól vs. Kokaina 7 d = 0,0242. Wartości p dla CeM: Woda vs. Cukier 7 d = 0,0079 oraz Sól vs. Kokaina 7 d = 0,0051.

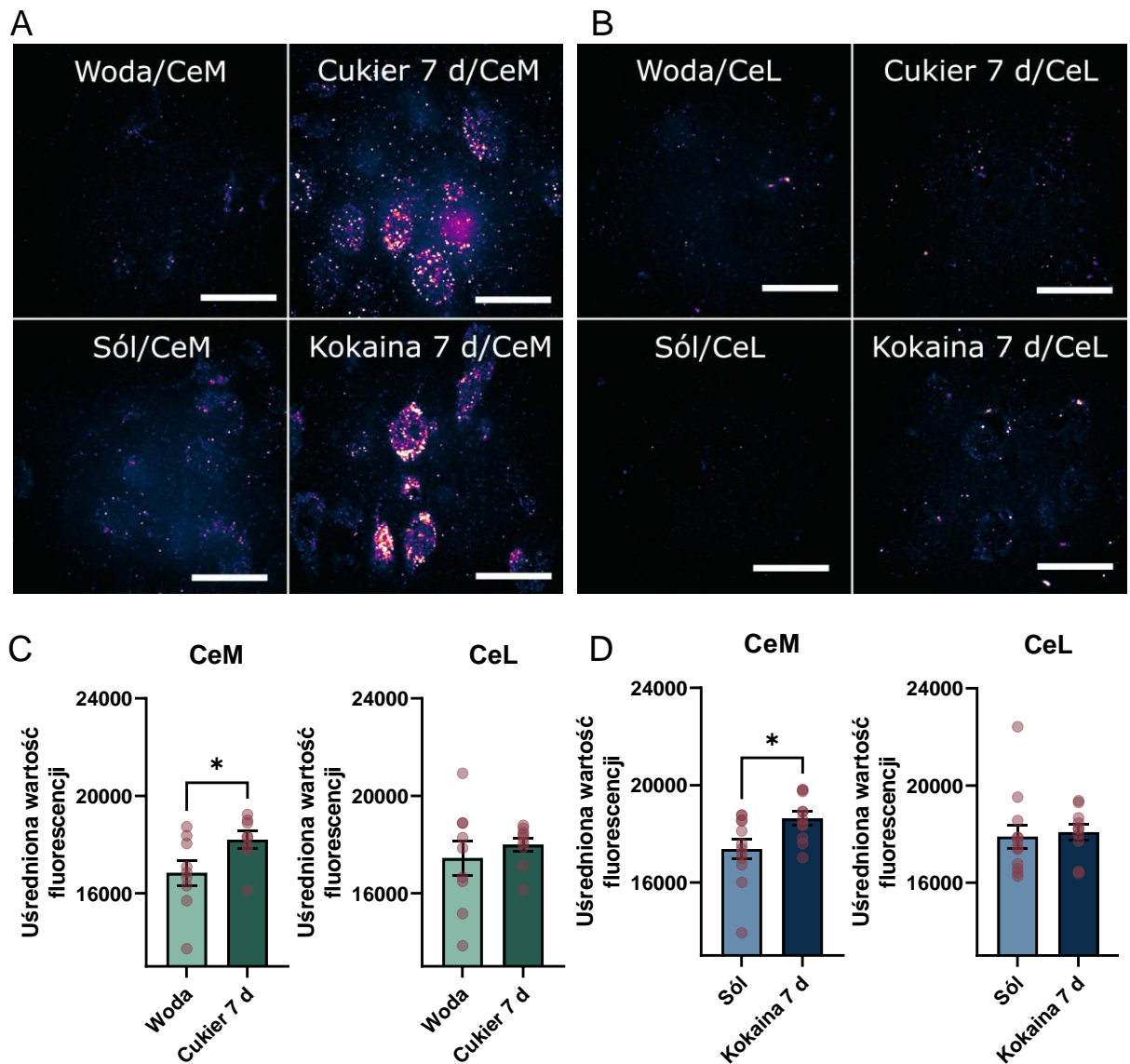
#### 4.3.2.C Analiza obecności podjednostki GluN2B receptora NMDA w jądrze środkowym ciała migdałowego

By potwierdzić, że zaobserwowana zmieniona kinetyka prądów zależnych od NMDAR w CeM spowodowana jest obecnością podjednostek GluN2B, wykonano barwienia immunohistochemiczne tej podjednostki.

Analiza zdjęć spod mikroskopu konfokalnego wykazała zwiększony sygnał fluorescencji pochodzący z GluN2B w neuronach CeM myszy po ekspozycji na sacharozę

(Ryc. 33A, C). Jego średnia wartość wyniosła 18205 (SEM = 347,8) i była o 1373 wyższa od sygnału ze skrawków mózgu myszy eksponowanych na zwykłą wodę. Podobnie wyższy sygnał w CeM zaobserwowano w preparatach pochodzących od myszy eksponowanych na kokainę (średnia = 18633; SEM = 280,5), który był wyższy od sygnału z warunków kontrolnych o 1252 (Ryc. 33A, D). W CeL nie zaobserwowano zmian w sygnale pochodzącym od GluN2B i jego średnie wartości wynosiły: dla wody 17443 (SEM = 714,7), sacharozy 17990 (SEM = 282,5), soli 17897 (SEM = 491,4) i kokainy 18079 (SEM = 321,3; Ryc. 33B, C, D).

Razem z wynikami badań kinetyki prądów zależnych od NMDAR, powyższe wyniki wskazują na obecność podjednostki GluN2B w CeM po ekspozycji myszy zarówno na nagrodę naturalną, jak i farmakologiczną. Sugerują również, że zaobserwowane zmiany plastyczne w CeM powstały na drodze wzmocnienia synapsy i powstawania nowych połączeń synaptycznych.



**Ryc. 33: Obecność podjednostki GluN2B receptora NMDA w CeA myszy eksponowanych na nagrody naturalne i farmakologiczne** **A, B)** Przykładowe zdjęcia wybarwionych podjednostek GluN2B receptora NMDA w CeA ze skrawków myszy eksponowanych na nagrody naturalne (**A**) lub farmakologiczne (**B**). Skala 25  $\mu\text{m}$ . **C, D)** Wykresy przedstawiające uśrednioną wartość fluorescencji pochodzącą z GluN2B na komórkach CeM i CeL myszy eksponowanych na cukier (**C**) lub kokainę (**D**). Wykresy przedstawiają średnie oraz  $\pm$  SEM. Czerwonymi kropkami przedstawiono wyniki dla pojedynczych myszy. Na wykresach \* oznacza  $p < 0,05$ .

Liczebność grup dla CeM wynosiła N Woda = 8(67); N Cukier 7 d = 7(46); N Sól = 12(75); N Kokaina 7 d = 10(50) oraz dla CeL N Woda = 8(72); N Cukier 7 d = 8(55); N Sól = 13(93); N Kokaina 7 d = 11(61), gdzie N = liczba zwierząt użytych w badaniu (liczba nagranych komórek). Różnice pomiędzy badanymi grupami zmierzono testem Manna-Whitney'a dla **C** i testem t dla prób niezależnych **D**. Wartości p dla CeM: Woda vs. Cukier 7 d = 0,0468 oraz Sól vs. Kokaina 7 d = 0,0208.

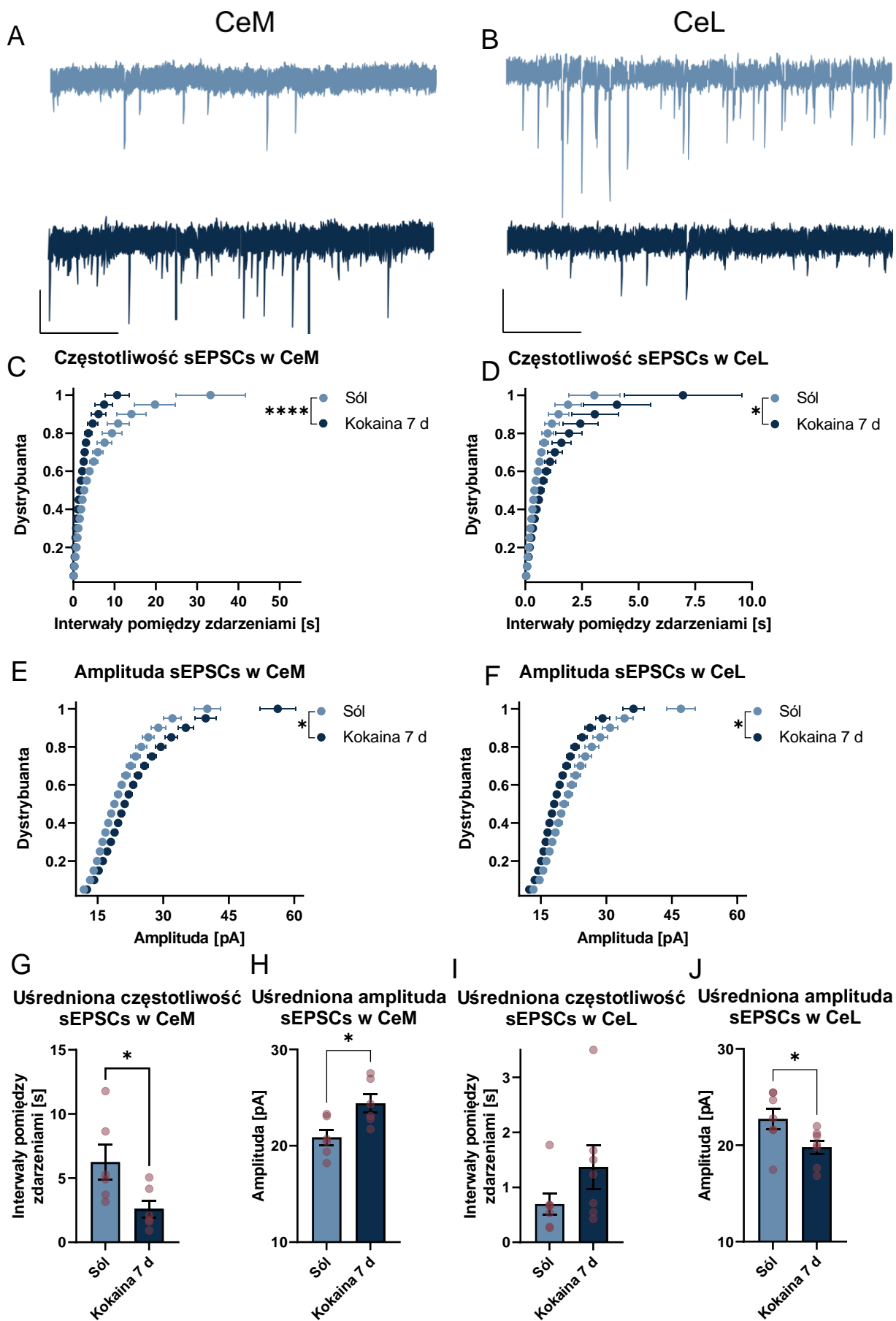


#### **4.3.2.D Analiza spontanicznej aktywności neuronów w jądrze środkowym ciała migdałowatego po ekspozycji zwierzęcia na kokainę**

Zwiększona ekspresja c-Fos oraz zwiększony poziom cichych synaps w CeL po ekspozycji zwierzęcia na kokainę wskazują, że w jądrze tym wystąpiły zmiany plastyczne po ekspozycji zwierzęcia na ten narkotyk. Jednocześnie, analiza immunohistochemiczna oraz badanie kinetyki prądów zależnych od NMDAR wykluczyły w CeL obecność towarzyszącej wzmocnieniu synaptycznemu podjednostki GluN2B. Dlatego też postanowiono sprawdzić, czy w CeL doszło w takim razie do przeciwstawnego procesu plastycznego, osłabienia postsynaptycznego. W tym celu w CeM i CeL zbadano spontaniczną aktywność neuronów, nagrywając tam prądy glutaminianergiczne zależne od AMPAR.

Zaobserwowano, że spontaniczne prądy nagrane z neuronów w CeM myszy uprzednio ekspozowanej na kokainę miały zwiększoną zarówno amplitudę, jak i częstotliwość występowania, co sugeruje wystąpienie LTP w tych neuronach (Ryc. 34A). Obserwacje te potwierdzono porównując dystrybuantę amplitud i odstępów pomiędzy kolejnymi zależnymi od AMPAR sEPSCs (zdarzeniami; Ryc. 34C, E). Również uśrednione wartości tych parametrów pokazały, że średnia wartość amplitud zdarzeń wzrosła o 3,56 pA w grupie myszy traktowanych kokainą. Średnio, zdarzenia te występowały częściej o 3,652 s (Ryc. 34G, H).

W CeL kokaina wywołała przeciwstawne efekty na parametry sEPSCs w porównaniu do CeM, co sugeruje wystąpienie LTD w tych neuronach (Ryc. 34B). Kolejne zdarzenia miały niższą częstotliwość występowania, co pokazano przez porównanie dystrybuant interwałów pomiędzy nimi (Ryc. 34D, F). Średnia wartość pomiędzy interwałami dla grupy kokainowej (średnia = 1,37 s; SEM = 0,398) była wyższa niż dla grupy solnej (średnia = 0,695 s; SEM = 0,192 s), ale wyniki te nie uzyskały istotności statystycznej ( $p = 0,1649$ ; Ryc. 34I). Średnia amplituda sEPSCs nagrywana w neuronach CeL w grupie kokainowej (średnia = 19,78 pA; SEM = 0,398 pA) była niższa w grupie solnej (średnia = 22,73 pA; SEM = 1,081 pA), i podobnie jak dystrybuanty amplitud dla tych grup, różniły się istotnie statystycznie (Ryc. 34J).



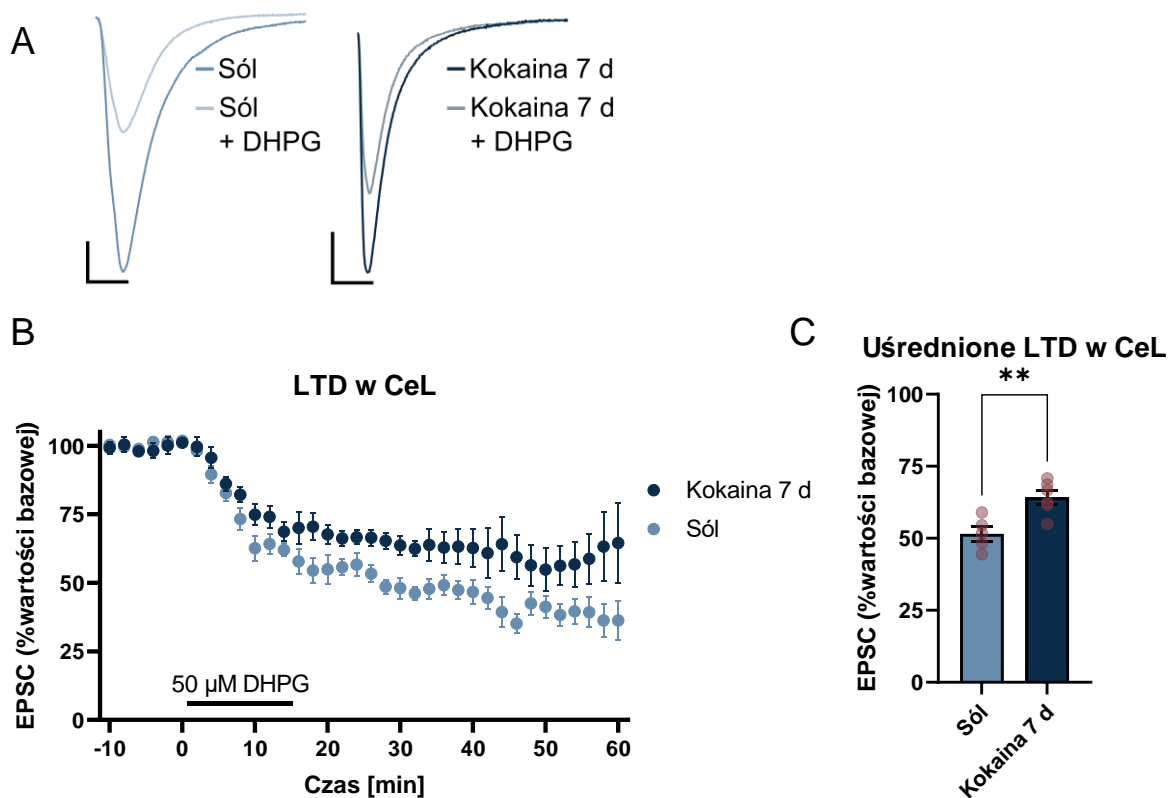
**Ryc. 34: Wpływ kokainy na spontaniczną aktywność neuronów w CeA A, B)** Przykładowe nagrania sEPSCs nagrane w komórkach CeM (A) i CeL (B) myszy eksponowanych na sól (jasnoniebieski) lub kokainę (ciemnoniebieski). Pozioma skala przy wykresie oznacza 1 s, a pionowa 10 pA. C, D, E, F) Wykresy przedstawiające dystrybuanty częstotliwości (C, D) i amplitud (E, F) sEPSCs nagranych z komórek CeA myszy eksponowanej na sól lub kokainę. G, H, I, J) Uśrednione częstotliwości (G, I) i amplitudy (H, J) sEPSCs nagranych z komórek CeA myszy eksponowanej na sól lub kokainę. Wykresy przedstawiają średnie oraz  $\pm$  SEM. Czerwonymi kropkami przedstawiono wyniki dla pojedynczych myszy. Na wykresach \* i \*\*\*\* oznaczają kolejno  $p < 0,05$  i  $p < 0,0001$ .

Liczebność grup dla CeM wynosiła N Sól = 6(30); N Kokaina 7 d = 6(31) oraz dla CeL N Sól = 7(18); N Kokaina 7 d = 7(22), gdzie N = liczba zwierząt użytych w badaniu (liczba nagranych komórek). Różnice pomiędzy badanymi grupami zmierzono testem Kolmogorova-Smirnova dla dystrybuant, gdzie w CeM dla częstotliwości  $p < 0,0001$  i amplitudy  $p = 0,354$  oraz w CeL dla częstotliwości i amplitudy  $p < 0,0001$ . Średnie porównywano testem t dla prób niezależnych i w CeM  $p = 0,0183$  dla porównania amplitud oraz  $p = 0,036$  dla porównania częstotliwości oraz w CeL  $p = 0,042$  dla porównania amplitud. Średnie częstotliwości w CeL porównano testem Manna-Whitney'a uzyskując  $p = 0,1649$ .

#### **4.3.2.E Analiza długotrwałego osłabienia postsynaptycznego w bocznej części jądra środkowego ciała migdałowatego myszy eksponowanych na kokainę**

Nagrane sEPSCs w neuronach CeL myszy otrzymujących kokainę charakteryzowały się niższą amplitudą i częstotliwością, co wskazuje na wystąpienie w tych komórkach procesów osłabiających połączenia synaptyczne, LTD. Innym wskaźnikiem wystąpienia LTD podczas treningu behawioralnego jest jego utrudnione ponowne wywołanie w neuronach, które ten proces uprzednio przeszły<sup>136,137</sup>. By potwierdzić wystąpienie osłabienia synaptycznego w CeL po ekspozycji myszy na kokainę, nagrano prądy zależne od AMPAR podczas wywołania LTD przy wykorzystaniu agonisty mGluR1 – DHPG.

Zaobserwowano redukcję wywołanego LTD, co objawiło się tym, że DHPG miało mniejszy efekt na amplitudę EPSC (Ryc. 35A, B). Wstandaryzowana do wartości bazowej średnia procentowa wartość EPSC dla grupy solnej (średnia = 51,57 pA; SEM = 2,501 pA) była niższa niż w grupie kokainowej (średnia = 64,18 pA; SEM = 2,337 pA) o 12,61 pA (Ryc. 35C). Spadek ten był więc częściowy i nie zaobserwowano całkowitej eliminacji LTD w CeL.



**Ryc. 35: Zaburzone LTD w neuronach CeL po ekspozycji na kokainę.** **A)** Przykładowe odpowiedzi zależne od AMPAR nagrane przed i po wywołaniu LTD przez inkubację neuronów w 50 μM DHPG w ACSF. Pionowa linia obok przebiegu oznacza 50 pA, a pozioma 20 ms. **B)** Wykres przedstawiający zmianę amplitudy EPSC po indukcji LTD. **C)** Uśrednione amplitudy EPSC w zakresie 12-60 min po indukcji LTD. Wykres przedstawia średnie oraz ± SEM. Czerwonymi kropkami przedstawiono wyniki dla pojedynczych myszy. Na wykresie \*\* oznacza  $p < 0,01$ .

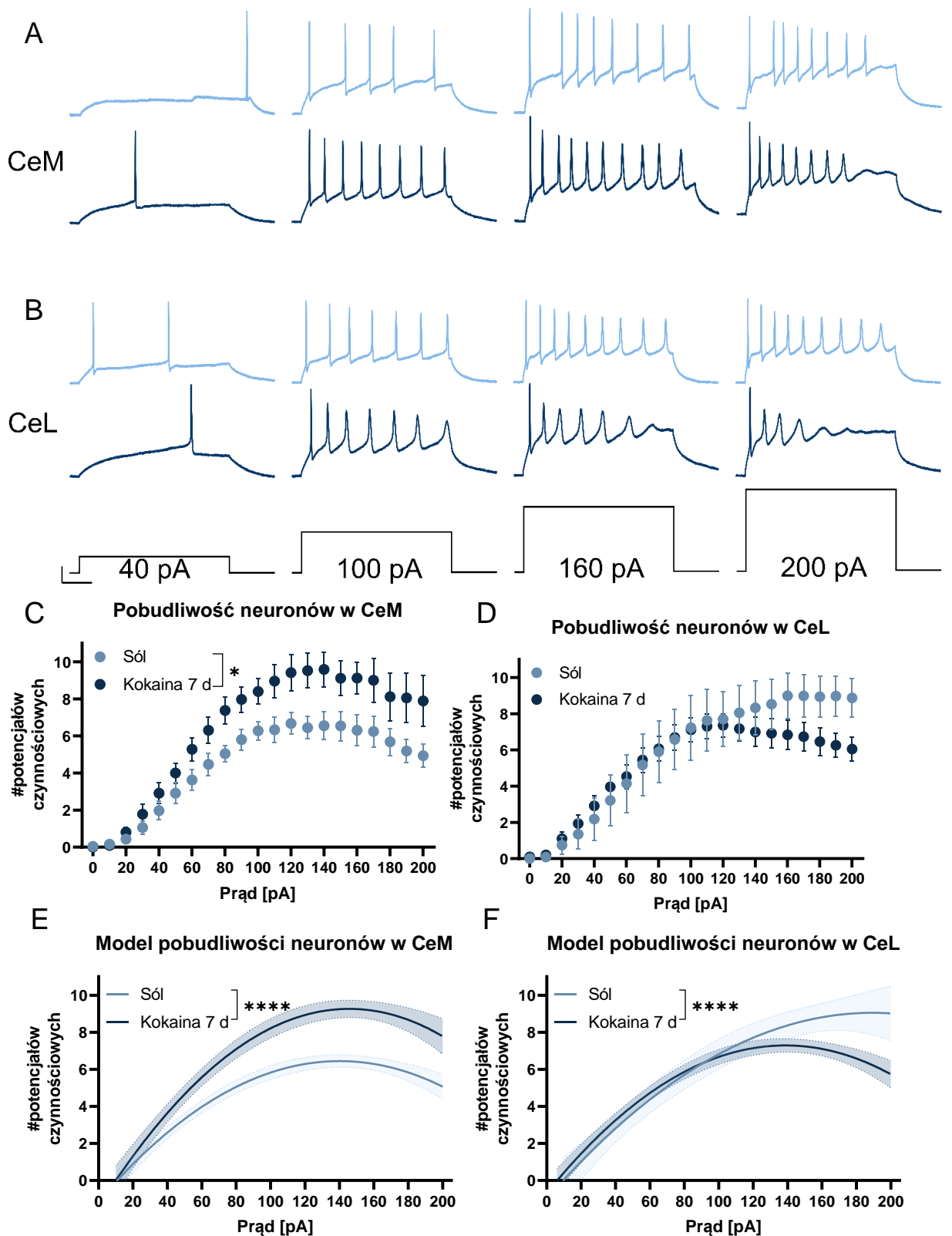
Liczebność grup wynosiła N Sól = 5(14); N Kokaina 7 d = 6(15), gdzie N = liczba zwierząt użytych w badaniu (liczba nagranych komórek). Różnice pomiędzy badanymi grupami porównywano testem t dla prób niezależnych, gdzie  $p = 0,0051$ . LTD – długotrwałe osłabienie postsynaptyczne; DHPG – dihydroksyfenyloglicyna.

#### 4.3.2.F Analiza pobudliwości neuronów jądra środkowego ciała migdałowatego u myszy eksponowanych na kokainę

Dotychczasowe badania opisane w rozdziale skupiały się na plastyczności synaptycznej w CeA. Inną formą neuroplastyczności jakiej podlegają neurony jest zmiana ich pobudliwości, która wynika z modyfikacji napięciowo-zależnych kanałów na ich powierzchni.

Sprawdzono, czy zauważonym wcześniej zmianom plastycznym w CeA towarzyszy zmiana pobudliwości jego neuronów. Zaobserwowano, że w CeM kokaina spowodowała zwiększoną pobudliwość neuronów (Ryc. 36A, C). W CeL nie zauważono istotnych

statystycznie różnic pomiędzy grupami (Ryc. 36B, D). Zaobserwowano jednak, że przy stymulacji komórek prądem o wysokim natężeniu (140-200 pA) neurony często miały obniżoną zdolność generowania ciągu potencjałów czynnościowych przy wydłużonej stymulacji. Dlatego też do dalszego porównania pobudliwości pomiędzy grupami postanowiono dopasować krzywe do wykresu zależności liczby potencjałów od nadanego natężenia prądu. Powstałe modele pobudliwości różniły się między sobą zarówno w CeM, jak i w CeL (Ryc. 36E, F).



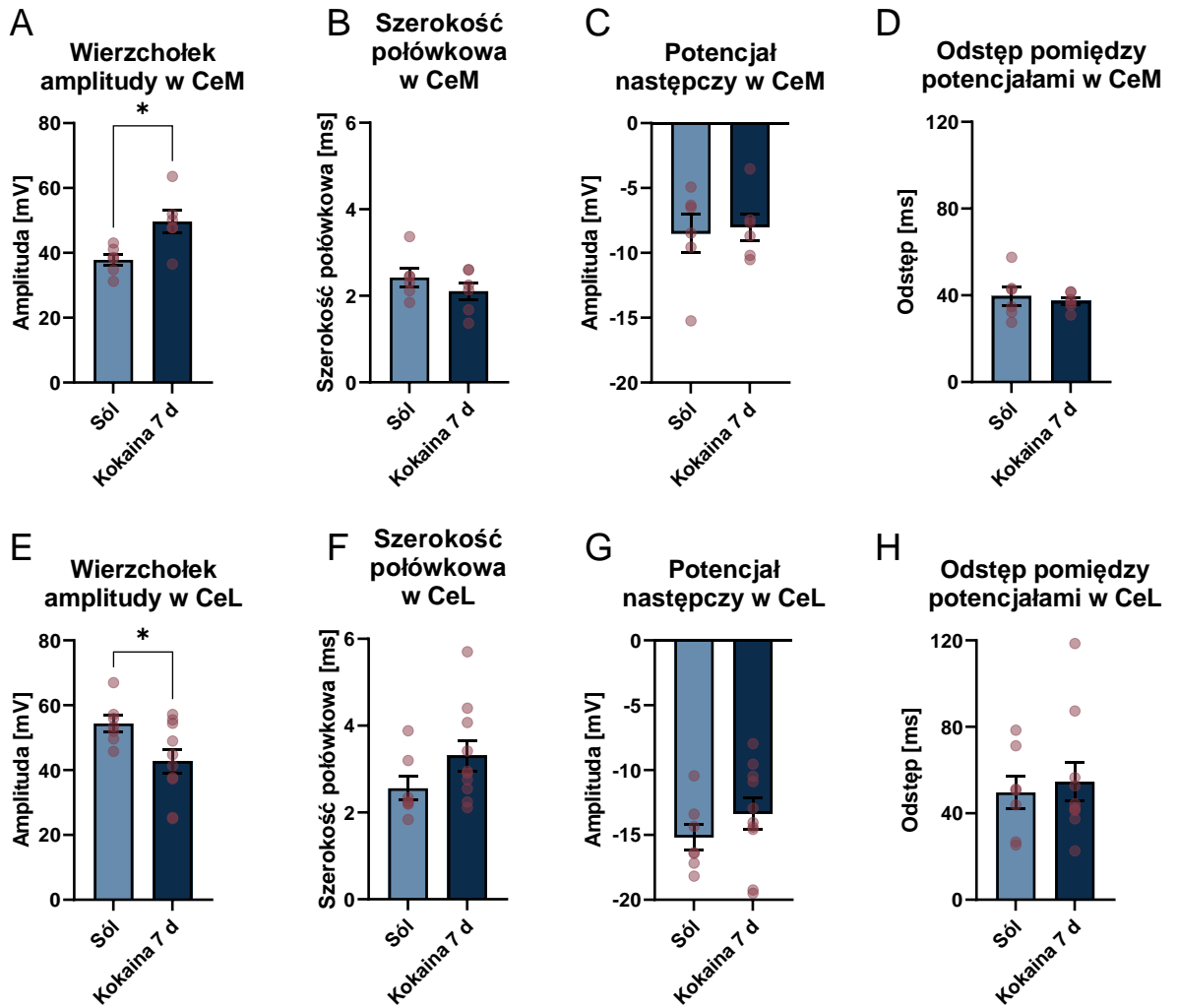
**Ryc. 36: Zaburzona pobudliwość neuronów w CeA po ekspozycji myszy na kokainę.** **A, B)** Przykładowe potencjały neuronów wywołane stymulacją prądem o natężeniu 40-200 pA nagrane w CeM (**A**) i CeL (**B**) myszy ekspozowanej na sól (jasnoniebieski) lub kokainę (ciemnoniebieski). Pionowa linia obok przebiegu oznacza 20 mV, a pozioma 100 ms. **C, D)** Wykres przedstawiający zależność liczby wywołanych potencjałów od natężenia prądu stymulującego dla neuronów w CeM (**C**) i CeL (**D**). Wykres przedstawia średnie oraz  $\pm$  SEM

liczby potencjałów dla danej stymulacji. Na wykresie \* oznacza  $p < 0,01$ . **E, F)** Modele zależności liczby wywołanych potencjałów od natężenia prądu stymulującego dla neuronów w CeM (**E**) i CeL (**F**) powstałe metodą regresji nieliniowej. Na wykresie \*\*\*\* oznacza  $p < 0,0001$ .

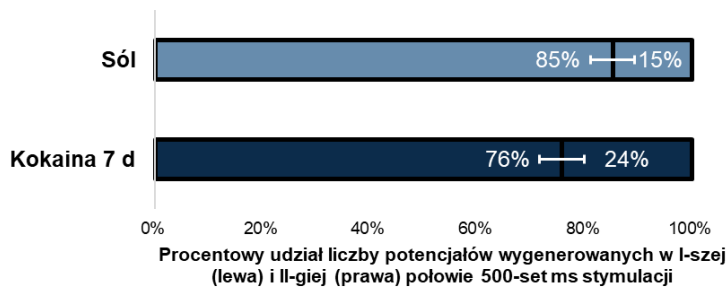
Liczebność grup wynosiła dla CeM N Sól = 6(23) i N Kokaina 7 d = 6(20) oraz dla CeL dla CeM N Sól = 7(21) i N Kokaina 7 d = 10(32) gdzie N = liczba zwierząt użytych w badaniu (liczba nagranych komórek). Różnice pomiędzy badanymi grupami porównywano testem dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA z  $p = 0,0269$  dla CeL i  $p = 0,5794$  dla CeM. Modele pobudliwości porównano badając resztkową sumę kwadratów. Uzyskano  $p < 0,0001$ , co oznacza, że krzywych nieliniowych nie można było zamodelować jednym wzorem.

Do zmian pobudliwości neuronów mogą przyczyniać się różne własności potencjałów czynnościowych, m.in. długość potencjału następczego, wartości progowej lub szerokości połówkowej. Dlatego też zmierzono te parametry dla potencjałów wywołanych przez stymulację prądem o wartości 160 pA. Zarówno w CeM, jak i w CeL jedynym parametrem, który zmienił się istotnie statystycznie w grupie traktowanej kokainą, była amplituda potencjału czynnościowego (Ryc. 37A, E). W CeM była ona wyższa średnio o 11,79 mV, a w CeL niższa o 11,63 mV niż w grupie kontrolnej. Nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian w szerokości potencjałów (dla CeM  $p = 0,3038$  i dla CeL  $p = 0,1402$ ) ani w amplitudzie ich potencjałów następczych (dla CeM  $p = 0,7920$  i dla CeL  $p = 0,2937$ ; Ryc. 37B, C, F, G).

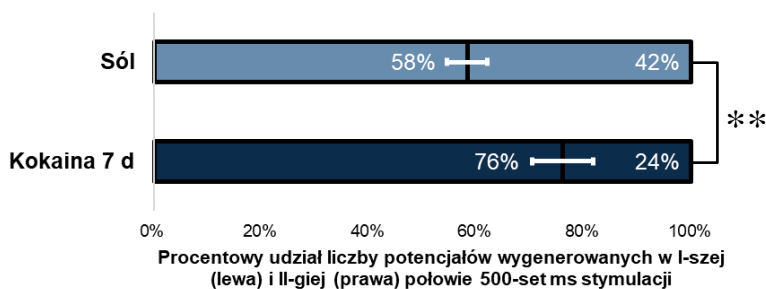
Nie zaobserwowano również różnic pomiędzy odległościami dzielącymi kolejne potencjały wywołane (Ryc. 37D, H). W CeM średnia dla grupy solnej wyniosła 39,66 ms i była zbliżona do grupy kokainowej (37,38 ms;  $p = 0,6353$ ). Podobnie zbliżone wyniki zaobserwowano w CeL ( $p > 0,9999$ ), gdzie średnia dla grupy solnej wyniosła 49,65 ms, a dla grupy kokainowej (54,54 ms). Podczas badania pobudliwości zauważono, że podczas stymulacji prądem 160 pA przez 500 ms, liczba generowanych potencjałów spada wraz z czasem jej trwania. Porównano, procentowy udział potencjałów w pierwszej i drugiej połowie trwania stymulacji. Zauważono, że w CeL po ekspozycji na kokainę istotnie rzadziej pojawiały się potencjały w drugiej połowie stymulacji (Spadek o 17,8037%,  $p = 0,0074$ ; Ryc. 37J). W CeM z kolei, po zastrzykach z kokainy nastąpił wzrost o 9,5057% udziału potencjałów z drugiej połowy stymulacji, ale wynik ten nie osiągnął istotności statystycznej ( $p = 0,1014$ ; Ryc. 37(I)). Wyniki te sugerują, że w CeL zmniejszona pobudliwość grupy badanej wynika ze zmiany zdolności do generowania ciągu potencjałów czynnościowych.



**I Rozkład generowanych potencjałów podczas 500 ms stymulacji prądem (CeM)**



**J Rozkład generowanych potencjałów podczas 500 ms stymulacji prądem (CeL)**





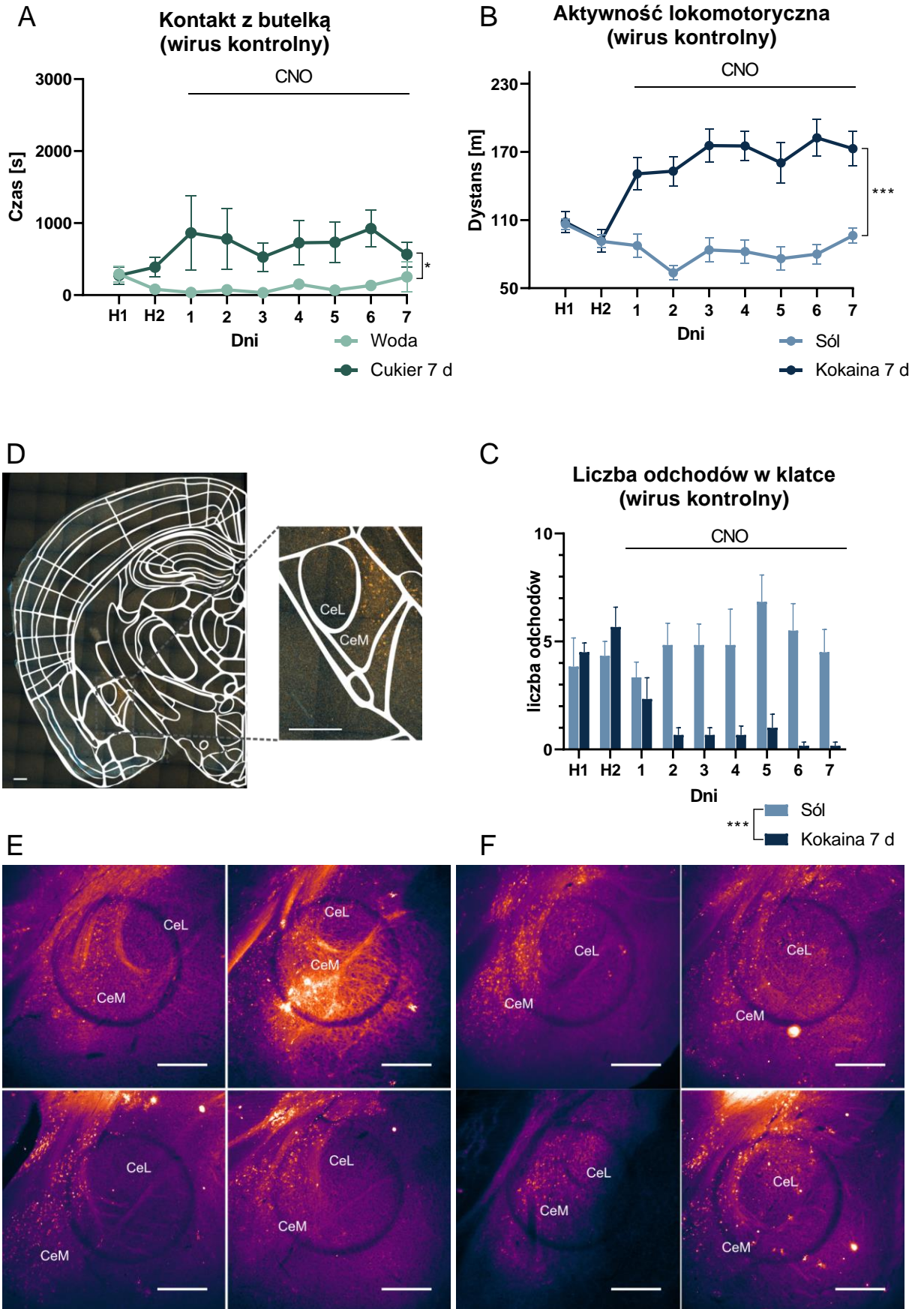
**Ryc. 37: Własności składowe potencjałów wywołanych przez stymulację 160 pA nagranych z neuronów CeA myszy eksponowanych na sól lub kokainę. A-H)** Uśrednione amplitudy (**A, E**), szerokości połówkowe (**B, F**), wartości amplitud potencjałów następczych (**C, G**) oraz odstępy pomiędzy kolejnymi potencjałami (**D, H**) dla neuronów CeM (**A-D**) i CeL (**E-H**). Wykresy przedstawiają średnie oraz  $\pm$  SEM. Czerwonymi kropkami przedstawiono wyniki dla pojedynczych myszy. Na wykresach \* oznacza  $p < 0,05$ . (**I, J**) Średnie procentowe udziały potencjałów czynnościowych w pierwszej i drugiej połowie trwania stymulacji (500 ms o natężeniu 160 pA). Na wykresach przedstawiono średnie oraz  $\pm$  SEM. \*\* oznacza  $p < 0,01$ . Liczebność grup dla CeM wynosiła N Sól = 6(23); N Kokaina 7 d = 6(20) oraz dla CeL N Sól = 7(21); N Kokaina 7 d = 10(32), gdzie N = liczba zwierząt użytych w badaniu (liczba nagranych komórek). Różnice pomiędzy badanymi grupami dla **A-H** zmierzono testem Manna-Whitney'a z  $p = 0,0137$  dla **A** i  $p = 0,0319$  dla **E** oraz testem t dla prób niezależnych dla **I** i **J** z  $p = 0,0074$  dla CeL.

#### **4.4. Analiza roli środkowego jądra ciała migdałowatego w behawioralnej odpowiedzi zwierzęcia na nagrody**

Poprzednie eksperymenty opisane w rozprawie pokazały zaangażowanie CeA w przetwarzanie zarówno nagród naturalnych, jak i farmakologicznych. By sprawdzić jak aktywność neuronów CeA przyczynia się do odpowiedzi behawioralnej zwierzęcia eksponowanego na te nagrody, chemogenetycznie manipulowano ich aktywnością. Do mózgu myszy wprowadzono konstrukt wirusowy, który w zainfekowanych neuronach prowadził do translacji receptorów DREADD aktywowanych sztucznym ligandem, CNO. W eksperymentach wykorzystano dwa rodzaje DREADD: hM4Di (hamujący pobudliwość komórek) oraz hM3Dq (zwiększający pobudliwość). Podczas eksperymentów zauważono, że budowa anatomiczna CeA (w szczególności wiązka projekcji przychodząca z BLA) powoduje dużą specyfikę rozprzestrzeniania się wirusa tylko do obrębów CeM (Ryc. 38D). Większość transfekcji była specyficzna do CeM lub w dużej mierze dotyczyła tego jądra (Ryc. 38E, F).

CNO jest pochodną klozapiny, będącej lekiem przeciwpsychotycznym o własnościach psychoaktywnych. Sam CNO jest też częściowo metabolizowany do klozapiny i istnieje ryzyko, że jego podanie również może wywołać niespecyficzne efekty na zwierzę<sup>182</sup>. By sprawdzić jego wpływ na zachowanie zwierząt eksponowanych na nagrody, neurony CeM zainfekowano kontrolnym wirusem kodującym tylko fluorescencyjne białko mCherry (bez DREADD). Zastrzyki z CNO nie zaburzyły preferencji tych myszy do sacharozy, które spędzały więcej czasu na picu wody słodkiej niż zwykłej (Ryc. 38A). Myszy te wykazywały również zwiększoną aktywność lokomotoryczną (Ryc. 38B). Ponadto, CNO nie wpłynęła na zmniejszone wypróżnianie myszy po zastrzykach z kokainy, które średnio podczas wszystkich

ekspozycji na kokainę pozostawiały 0,810 odchodów (SEM = 0,205), co wyniosło mniej o 4,413 w porównaniu z grupą kontrolną (średnia = 4,952; SEM = 0,430; Ryc. 38C). Dlatego też uznano, że CNO w stosowanych dawkach nie wywoływał niespecyficzných objawów u myszy podczas opisanych eksperymentów.

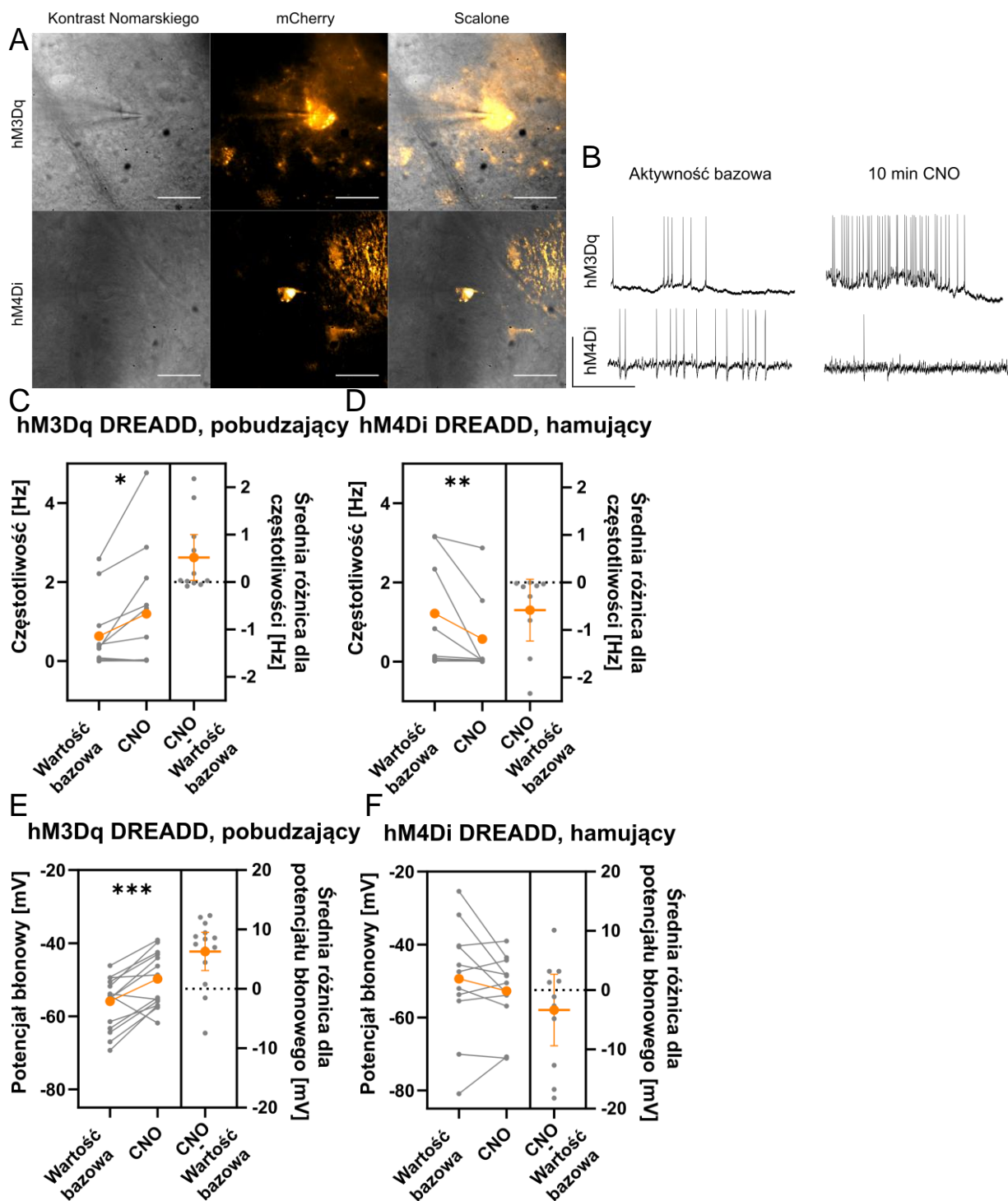


Ryc. 38: Ekspresje wirusowe oraz efekty działania CNO na behavior zwierząt nastrzykniętych wirusem kontrolnym, które były eksponowane na nagrody naturalne

**i farmakologiczne. A, B, C)** Zwierzęta posiadały w CeA translację białka kodowanego przez wirus kontrolny (h-Syn-mCherry) oraz były nastrzyknięte CNO 30 min przed ekspozycją na nagrody. **A)** Wykres przedstawiający czas spędzony przez myszy na picciu z butelki wypełnionej wodą lub 7,5% roztworem wodnym sacharozy. **B)** Wykres aktywności lokomotorycznej myszy mierzonej w przeciągu pierwszych 30 min po ekspozycji ich na kokainę lub sól fizjologiczną. **C)** Liczba odchodów znajdujących się w klatce po 30 min ekspozycji myszy na kokainę lub sól fizjologiczną. **D)** Miejsce ekspresji wirusa DREADD w CeA z zaznaczonymi granicami struktur anatomicznych mózgu wg. podziału w Allen'owskim Atlasie Mysiego Mózgu. Skala wynosi 300  $\mu\text{m}$ . **E, F)** Miejsca ekspresji wirusa DREADD w CeA w przypadku, gdy wirus był ograniczony do CeM (**E**) oraz gdy był obecny też częściowo w CeL (**F**). Skala na zdjęciach wynosi 200  $\mu\text{m}$ .

Liczebność grup: N Woda = 9; N Cukier 7 d = 8; N Sól = 6; N Kokaina 7 d = 6, gdzie N = liczba zwierząt użytych w badaniu. Analiza statystyczna wykonana była testem ANOVA z powtarzalnymi pomiarami z  $p = 0,0352$  dla **A**,  $p = 0,0002$  dla **B** oraz  $p = 0,0003$  dla **D**. Do analizy statystycznej nie uwzględniono dni habituacji zwierzęcia do klatki (H1 oraz H2). \* i \*\*\* oznaczają kolejno  $p < 0,05$  oraz  $p < 0,001$ . Wykresy **A**, **B** i **C** przedstawiają średnie oraz  $\pm$  SEM.

CNO łącząc się z DREADD zmienia pobudliwość komórek m.in. poprzez zmianę ich potencjału błonowego<sup>177</sup>. Postanowiono potwierdzić, że również w ciele migdałowatym zastosowana kombinacja DREADD/CNO miała wpływ na własności elektrofizjologiczne neuronów. W tym celu wykonano eksperymenty na skrawkach mózgu pobranych od myszy, których CeM zostało wcześniej zainfekowane wirusami powodującymi wbudowanie receptorów hM4Di lub hMDq w błony neuronów (Ryc. 39A). Badano częstotliwość spontanicznych potencjałów czynnościowych zainfekowanych neuronów oraz mierzono ich potencjał błonowy przed i po 10-minutowej inkubacji z 10  $\mu\text{M}$  CNO w ACSF (Ryc. 39B). Aktywacja hM3Dq spowodowała wzrost częstotliwości występowania spontanicznych potencjałów o 0,5187 Hz ( $p = 0,0342$ ; Ryc. 39C). Zaobserwowano również wzrost potencjału błonowego o 6,3 mV ( $p = 0,001$ ; Ryc. 39E). Aktywacja hM4Di miała przeciwstawny wpływ na fizjologię neuronów i częstotliwość spontanicznych wyładowań spadła o 0,5823 Hz ( $p = 0,0039$ ; Ryc. 39D). Obniżyła się również wartość ich potencjału błonowego o średnio 3,35 mV, ale wynik ten nie uzyskał istotności statystycznej ( $p = 0,2444$ ; Ryc. 39F).



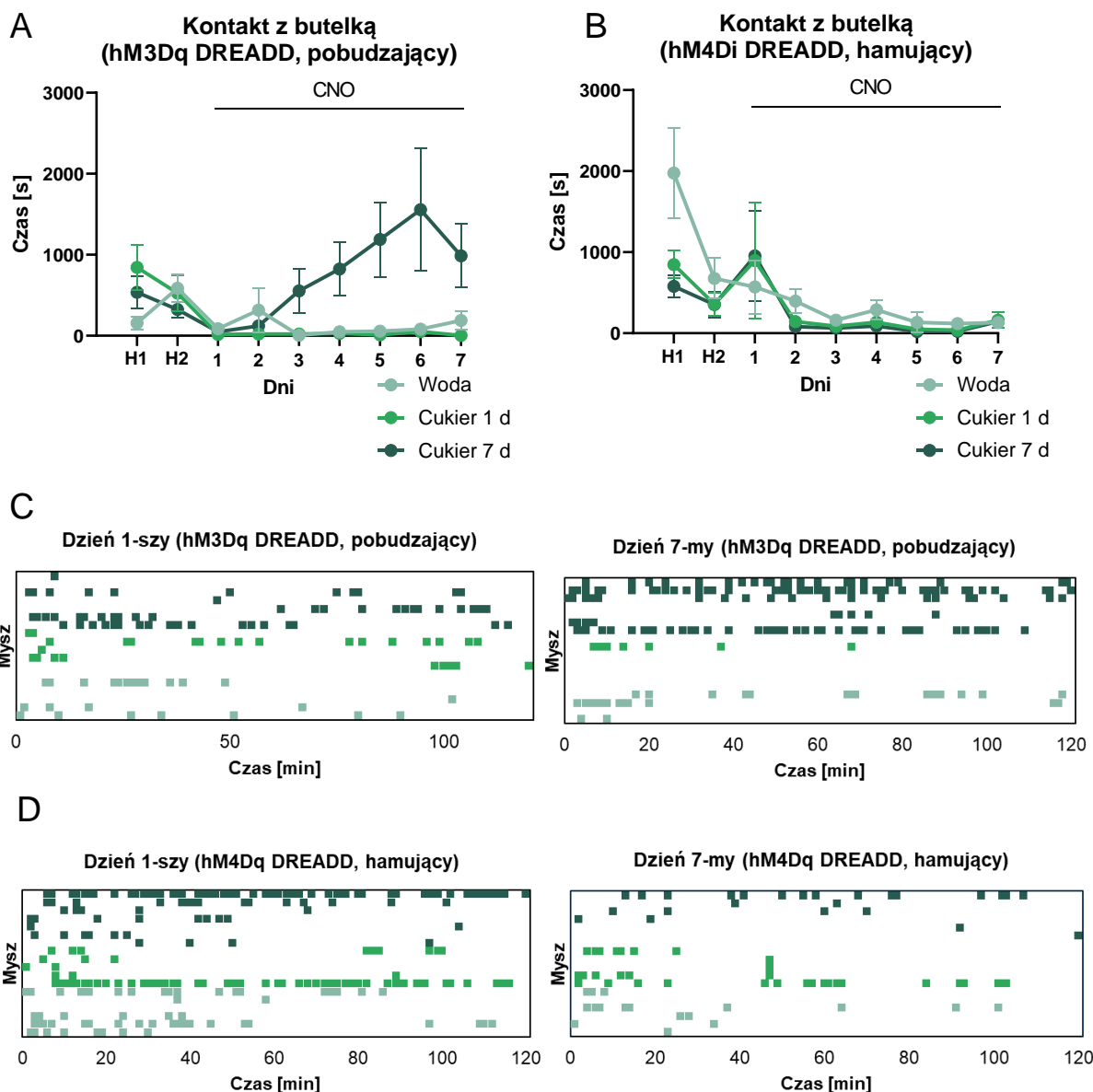
**Ryc. 39: Wpływ aktywacji receptorów DREADD na fizjologię neuronów.** **A)** Neurony CeM z ekspresją wirusa hM3Dq (panel górny) i hM4Di (panel dolny) widoczne pod mikroskopem do elektrofizjologii. Ekspresja wirusa widoczna w kolorze pomarańczowym. W odcieniach szarości widoczne neurony w mikroskopii z kontrastem Nomarskiego. Po lewej stronie zainfekowanych neuronów widoczne są elektrody nagrywające. Skala 20  $\mu\text{m}$ . **B)** Przykładowe nagrania spontanicznej aktywności neuronów CeM przed i po aktywacji receptorów hM3Dq (panel górny) i hM4Di (panel dolny). **C-F)** Wykresy przedstawiające częstotliwość (**C, D**) oraz potencjał błonowy (**E, F**) przed i po aktywacji receptorów hM3Dq (**C, E**) i hM4Di (**D, F**) spowodowaną 10-minutową inkubacją w 10  $\mu\text{M}$  CNO w ACSF. Na wykresach kolorem szarym

zaznaczono wyniki dla poszczególnych neuronów, a kolorem pomarańczowym wartości średnie. Po prawej stronie wartości pojedyncze (szare) oraz średnie  $\pm$  SEM (pomarańczowy) różnic dla wyników przed i po aktywacji receptorów DREADD. \*, \*\* i \*\*\* oznaczają kolejno  $p < 0,05$  i  $p < 0,01$  oraz  $p < 0,001$ .

Liczebność komórek dla hM3Dq wynosiła  $N = 14$  dla pomiarów potencjału błonowego i  $N = 12$  dla pomiarów częstotliwości. Liczebność komórek dla hM4Di wynosiła  $N = 11$  dla pomiarów potencjału błonowego i  $N = 9$  dla pomiarów częstotliwości. Różnice statystyczne pomiędzy grupami dla potencjału błonowego określono testem t dla prób zależnych z  $p = 0,2444$  dla hM4Di i  $p = 0,001$  dla hM3Dq. Różnice statystyczne pomiędzy grupami dla częstotliwości określono testem Wilcoxon'a z  $p = 0,0039$  dla hM4Di oraz  $p = 0,0342$  dla hM3Dq.

#### **4.4.1. Wpływ manipulacji aktywnością neuronów środkowego jądra ciała migdałowatego na odpowiedź zwierzęcia na słodką wodę**

Zarówno pobudzanie, jak i hamowanie CeM zaburzyło odpowiedź zwierząt eksponowanych na słodką wodę. W szczególności hamowanie CeM przy pomocy DREADD hM4Di zniwelowało preferencję zwierzęcia do cukru i pomimo tego, że myszy eksplorowały butelkę ze słodką wodą, o czym świadczą liczne podejścia do butelki w trakcie trwania pomiarów, to nie spędzały przy niej dużo czasu podczas pierwszej ekspozycji na cukier (Ryc. 40B, D). W kolejnych dniach nie wykazywały nią zainteresowania i ostatniego dnia eksperymentu już bardzo rzadko odwiedzały butelkę ze słodką wodą. Zwiększanie pobudliwości CeM przy pomocy DREADD hM3Dq również wpłynęło na konsumpcję słodkiej wody przez mysz, ale w bardziej skomplikowany sposób. Myszy te, podczas pierwszych dni eksperymentu spędzały mniej czasu na eksploracji butelki ze słodką wodą. W kolejnych dniach coraz więcej myszy jednak sięgało po nagrodę w butelce i spędzało coraz więcej czasu na jej spożywaniu (Ryc. 40A, C).



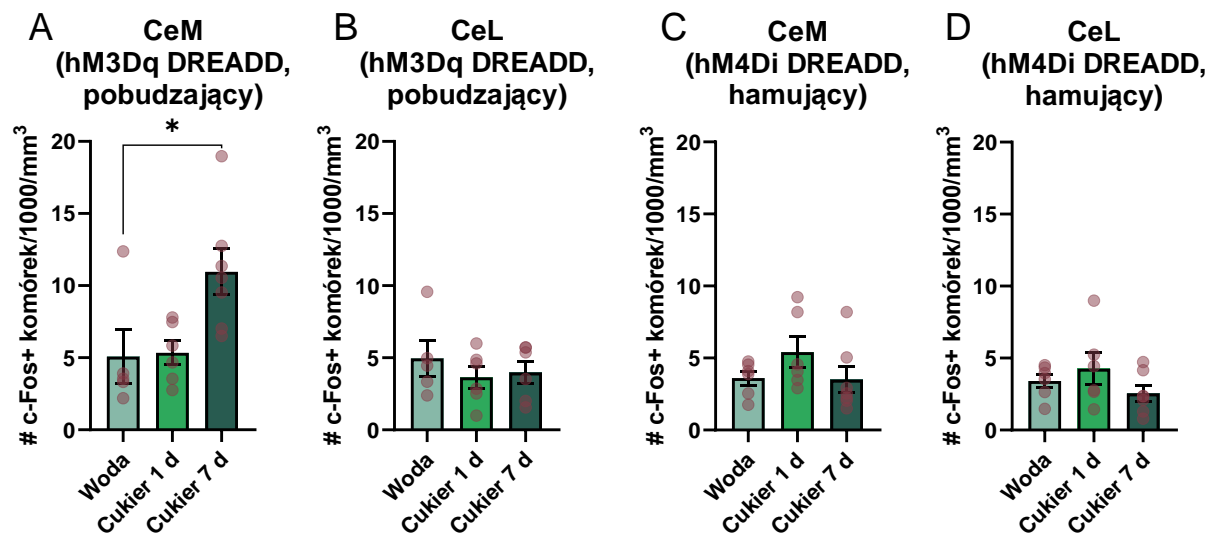
**Ryc. 40: Wpływ aktywacji DREADD na preferencję myszy do słodkiej wody.** **A, B)** Wykresy przedstawiające czas spędzony na piciu z butelki wypełnionej wodą lub 7,5% roztworem wodnym sacharozy przez myszy z aktywacją receptorów hM3Dq (**A**) lub hM4Di (**B**) w CeM. Wykresy przedstawiają średnie oraz  $\pm$  SEM. **C, D)** Wykresy obrazujące dotknięcie butelki przez poszczególne myszy w trakcie trwania 120-minutowego eksperymentu. Na wykresie zaznaczono kolorowymi kwadratami minuty, podczas których mysz chociaż raz dotknęła butelki. Wykresy po lewej stronie przedstawiają wyniki z pierwszego dnia eksperymentu, a po prawej wyniki z dnia siódmego (ostatniego). Podczas pomiarów, myszy miały aktywowane receptory hM3Dq (**C**) lub hM4Di (**D**). Kolory grup na wykresach tożsame z **A** i **B**.

Liczebność grup dla hM3Dq: N Woda = 5, N Cukier 1 d = 6; N Cukier 7 d = 7. Liczebność grup dla hM4Di: N Woda = 6, N Cukier 1 d = 6; N Cukier 7 d = 7. Analiza statystyczna wykonana była testem ANOVA z powtarzalnymi pomiarami, gdzie żaden z wyników nie uzyskał istotności statystycznej.

#### 4.4.1.A Wpływ manipulacji aktywnością neuronów środkowego jądra ciała migdałowatego na poziom c-Fos w CeA myszy eksponowanych na słodką wodę

Zwiększenie pobudliwości neuronów CeM przy pomocy hM3Dq nie zablokowało ekspresji *c-fos* w CeM myszy eksponowanych na słodką wodę przez 7 dni (Ryc. 41A). Liczba komórek *c-Fos*<sup>+</sup>/1000/mm<sup>3</sup> w tej grupie wyniosła średnio 10,960 (SEM = 1,583) wzrosła o 5,889 w porównaniu do grupy otrzymującej tylko wodę (średnia = 5,071 *c-Fos*<sup>+</sup>/1000/mm<sup>3</sup>; SEM = 1,848). Spośród myszy, które miały dostęp do cukru jedynie ostatniego dnia eksperymentu, tylko jedna mysz w czasie trwania eksperymentu w ogóle miała kontakt z butelką. Pozostałe myszy z tej grupy w czasie dwugodzinnego eksperymentu nie dotknęły butelki i, jak oczekiwano w takich warunkach, poziom *c-Fos* nie zwiększył się (średnia = 5,346 *c-Fos*<sup>+</sup>/1000/mm<sup>3</sup>; SEM = 0,839) i był zbliżony do warunków kontrolnych.

Hamowanie pobudliwości neuronów przy pomocy hM4Di zablokowało ekspresję *c-fos* w CeM i we wszystkich badanych grupach poziom komórek *c-Fos*<sup>+</sup> był zbliżony (Ryc. 41C). Podobnie jak w eksperymentach bez użycia DREADD, nie zauważono też zwiększonego poziomu *c-Fos* w CeL u myszy eksponowanych na nagrody naturalne (Ryc. 41B, D)



**Ryc. 41: Wpływ aktywacji DREADD na poziom c-Fos w CeA myszy eksponowanych na nagrody naturalne. A, B, C, D) Wykresy przedstawiające liczbę komórek c-Fos<sup>+</sup> w CeM (A, C) i CeL (B, D) myszy eksponowanych na nagrody naturalne, u których aktywowano receptory hM3Dq (A, B) lub hM4Di (C, D). Wykresy przedstawiają średnie oraz ± SEM. Czerwonymi kropkami przedstawiono wyniki dla pojedynczych myszy. Na wykresach \* oznacza  $p < 0,01$ .**

Liczebność grup dla CeM i CeL wynosiła dla hM3Dq: N Woda = 5(10); N Cukier 1 d = 6(15); N Cukier 7 d = 7(16) oraz dla hM4Di: N Woda = 6(11); N Cukier 1 d = 6(12);

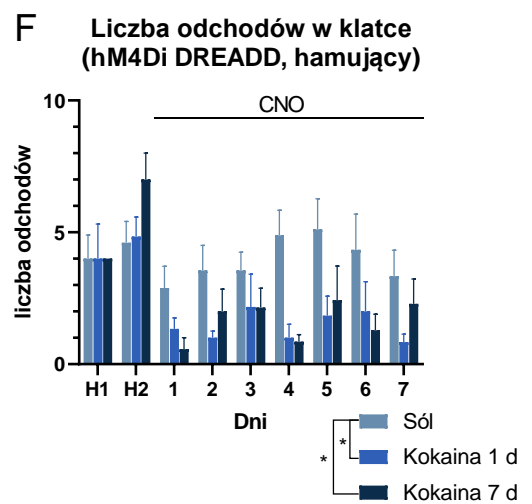
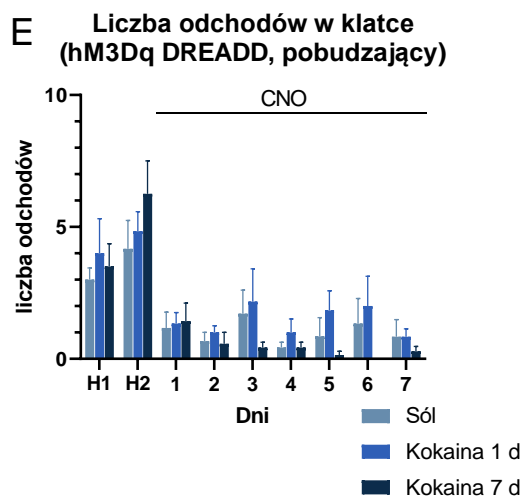
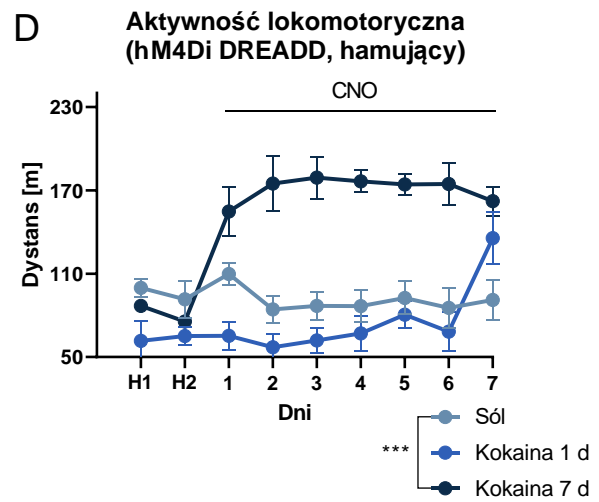
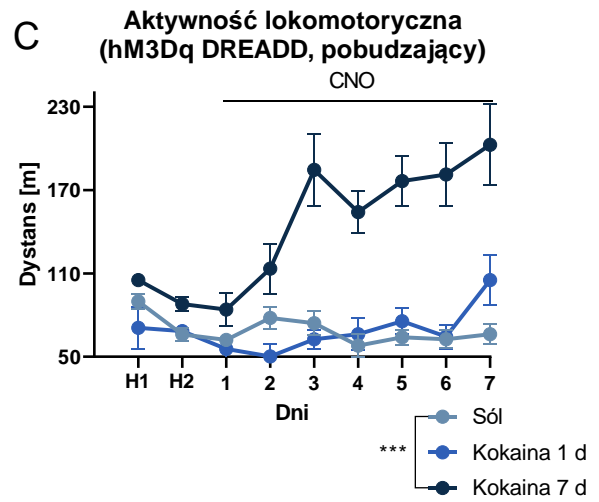
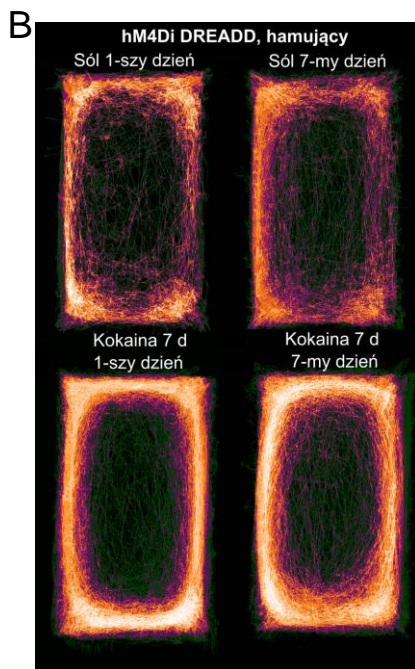
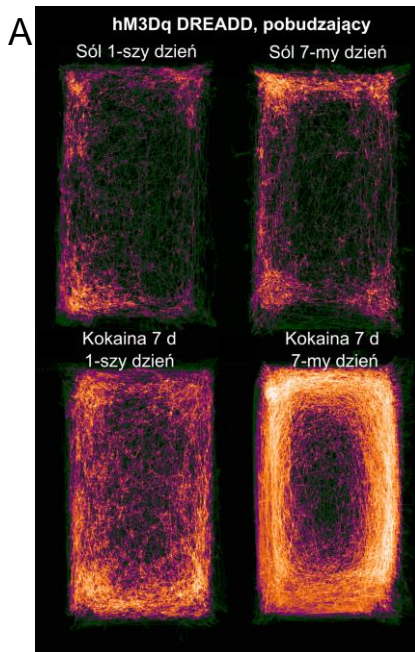


N Cukier 7 d = 7(14), gdzie N = liczba zwierząt użytych w badaniu (liczba użytych skrawków). Różnice pomiędzy badanymi grupami zmierzono testem jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA, gdzie dla A Woda vs. Cukier 7 d  $p = 0,0408$ .

#### **4.4.2. Wpływ manipulacji aktywnością neuronów środkowego jądra ciała migdałowatego na odpowiedź zwierzęcia na kokainę**

Zwiększenie pobudliwości neuronów CeM przez aktywację hM3Dq wpłynęło na aktywność lokomotoryczną zwierzęcia w dwóch pierwszych dniach trwania eksperymentu (Ryc. 42A, C). W stosunku do grupy kontrolnej, kokaina tylko nieznacznie zwiększyła aktywność lokomotoryczną myszy i po pierwszym podaniu wzrosła o 21,87 m ( $p = 0,5911$ ), a po drugim o 35,54 m ( $p = 0,5526$ ). W kolejnych pozostałych dniach wzrost wyniósł 96,17-136,31 m z  $p$  w zakresie  $<0,0021; 0,0312>$ . Zwiększenie pobudliwości neuronów CeM zmniejszyło również liczbę pozostawionych odchodów w klatce przez myszy w porównaniu do myszy z wirusem kontrolnym (Ryc. 42E). Efekt ten był jednak niezależny od tego czy zwierzę było eksponowane na sól (średnia = 1; SEM = 0,241) czy jednokrotnie (średnia = 1,452; SEM = 0,272) lub kilkakrotnie (średnia = 0,469; SEM = 0,133) na kokainę.

Zmniejszenie pobudliwości CeM nie wpłynęło na aktywność lokomotoryczną zwierzęcia eksponowanego na kokainę, ale zmniejszyło liczbę odchodów pozostawionych w klatce przez zwierzę (Ryc. 42D, F). Liczba pozostawionych odchodów obniżyła się w grupie otrzymującej kokainę przez 7 dni (średnia = 1,653; SEM = 0,295) w porównaniu do grupy myszy dostających zastrzyki z soli (średnia = 3,952; SEM = 0,372). Wynik ten był jednak niespójny i spadek liczby pozostawionych odchodów zaobserwowano również w grupie otrzymującej kokainę jednokrotnie, również w dniach, w których mysz otrzymywała jedynie sól fizjologiczną, kiedy to średnio wydalały 1,686 odchodów (SEM = 0,310).

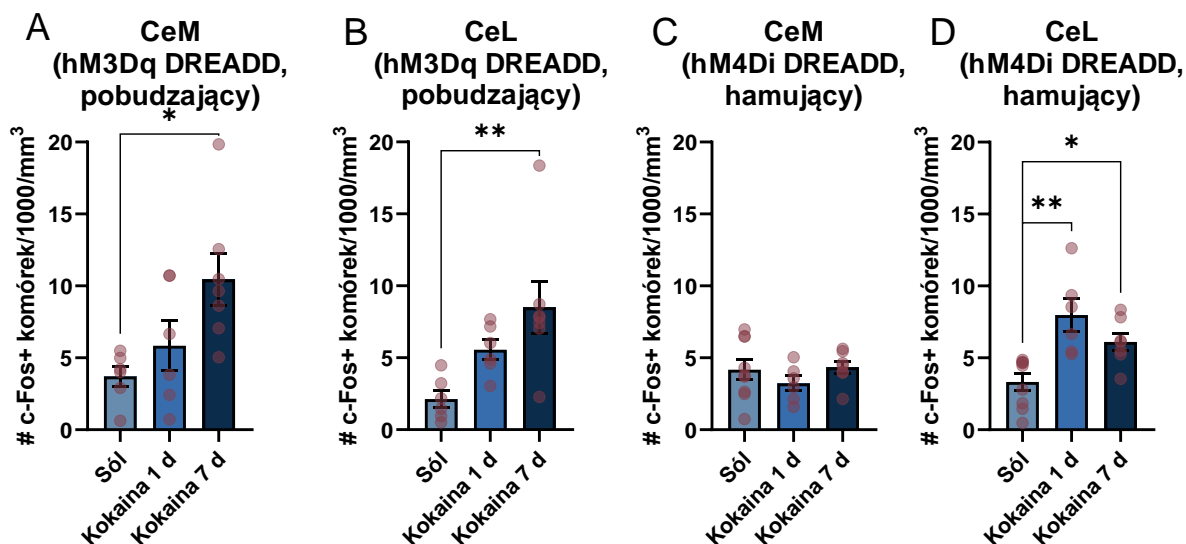


**Ryc. 42: Wpływ aktywacji DREADD w CeM na odpowiedź behawioralną myszy na kokainę.** **A, B)** Uśrednione przebiegi aktywności lokomotorycznej myszy w przeciągu pierwszych 30 min po ekspozycji ich na kokainę lub sól fizjologiczną. Podczas pomiarów, myszy miały aktywowane receptory hM3Dq (**A**) lub hM4Di (**B**) w neuronach CeM. **C, D)** Wykres aktywności lokomotorycznej myszy z aktywacją receptorów hM3Dq (**C**) lub hM4Di (**D**) w CeM, mierzone w przeciągu pierwszych 30 min po ekspozycji ich na kokainę lub sól fizjologiczną myszy. **E, F)** Liczba odchodów znajdujących się w klatce po 30 min ekspozycji myszy na kokainę lub sól fizjologiczną. Podczas pomiarów myszy miały aktywowane receptory hM3Dq (**E**) lub hM4Di (**F**) w neuronach CeM. \* i \*\*\* oznaczają kolejno  $p < 0,05$  i  $p < 0,001$ . Wykresy **C-F** przedstawiają średnie oraz  $\pm$  SEM. Liczebność grup wynosiła dla hM3Dq: N Sól = 6; N Kokaina 1 d = 6; N Kokaina 7 d = 7 oraz dla hM4Di: N Sól = 9; N Kokaina 1 d = 6; N Kokaina 7 d = 7. Analiza statystyczna wykonana była testem ANOVA z powtarzalnymi pomiarami, gdzie dla **C** Sól vs. Kokaina 7 d  $p = 0,0006$ , dla **D** Sól vs. Kokaina 7 d  $p = 0,0002$  oraz dla **F** Sól vs. Kokaina 1 d  $p = 0,0248$  i Sól vs. Kokaina 7 d  $p = 0,0278$ .

#### **4.4.2.A Wpływ manipulacji aktywnością neuronów środkowego jądra ciała migdałowatego na c-Fos w CeA myszy eksponowanych na kokainę**

Aktywacja hM3Dq podczas ekspozycji zwierzęcia na kokainę przez 7 dni nie zablokowała ekspresji *c-fos* w CeA i średni wzrost liczby komórek *c-Fos*/mm<sup>3</sup> wyniósł 675,3 w CeM ( $p = 0,0172$ ) i 636,9 w CeL ( $p = 0,0031$ ; Ryc. 43A, B). Dla grupy otrzymującej kokainę jednokrotnie, średni wzrost liczby komórek z ekspresją *c-Fos*/mm<sup>3</sup> wyniósł 213,9 dla CeM i 343,3 dla CeL. Wyniki te jednak nie uzyskały istotności statystycznej i prawdopodobieństwo testowe wyniosło  $p = 0,6168$  dla CeM oraz  $p = 0,1363$  dla CeL.

Podobnie jak w przypadku zwierząt eksponowanych na nagrodę naturalną, aktywacja receptora hM4Di zablokowała ekspresję *c-fos* w CeM (Ryc. 43C). Jednocześnie, w CeL ekspresja *c-fos* po ekspozycji zwierzęcia na kokainę nie została zaburzona i zwiększony poziom *c-Fos* zaobserwowano zarówno po jednodniowej ( $p = 0,0014$ ), jak i siedmiodniowej ekspozycji na kokainę ( $p = 0,0296$ ; Ryc. 43D).



**Ryc. 43: Wpływ aktywacji DREADD na poziom c-Fos w CeA myszy eksponowanych na nagrody farmakologiczne.** A, B, C, D) Wykresy przedstawiające liczbę komórek c-Fos+ w CeM (A, C) i CeL (B, D) myszy eksponowanych na nagrody farmakologiczne, u których aktywowano receptory hM3Dq (A, B) lub hM4Di (C, D). Wykresy przedstawiają średnie oraz  $\pm$  SEM. Czerwonymi kropkami przedstawiono wyniki dla pojedynczych myszy. Na wykresach \* i \*\* oznaczają kolejno  $p < 0,01$  i  $p < 0,001$ .

Liczebność grup dla CeM i CeL hM3Dq: N Sól = 6(10); N Kokaina 1 d = 6(17); N Kokaina 7 d = 7(13) oraz dla hM4Di: N Sól = 9(18); N Kokaina 1 d = 6(14); N Kokaina 7 d = 7(16), gdzie N = liczba zwierząt użytych w badaniu (liczba użytych skrawków). Różnice pomiędzy badanymi grupami dla A i C zmierzono testem jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA, gdzie dla A Sól vs. Kokaina 7 d  $p = 0,0172$  i testem. Różnice pomiędzy badanymi grupami dla B i D zmierzono testem Kruskal'a-Wallis'a z  $p = 0,0031$  dla Sól vs. Kokaina 7 (B) oraz  $p = 0,0014$  dla Sól vs. Kokaina 1 d i  $p = 0,0296$  dla Sól vs. Kokaina 7 d (D).

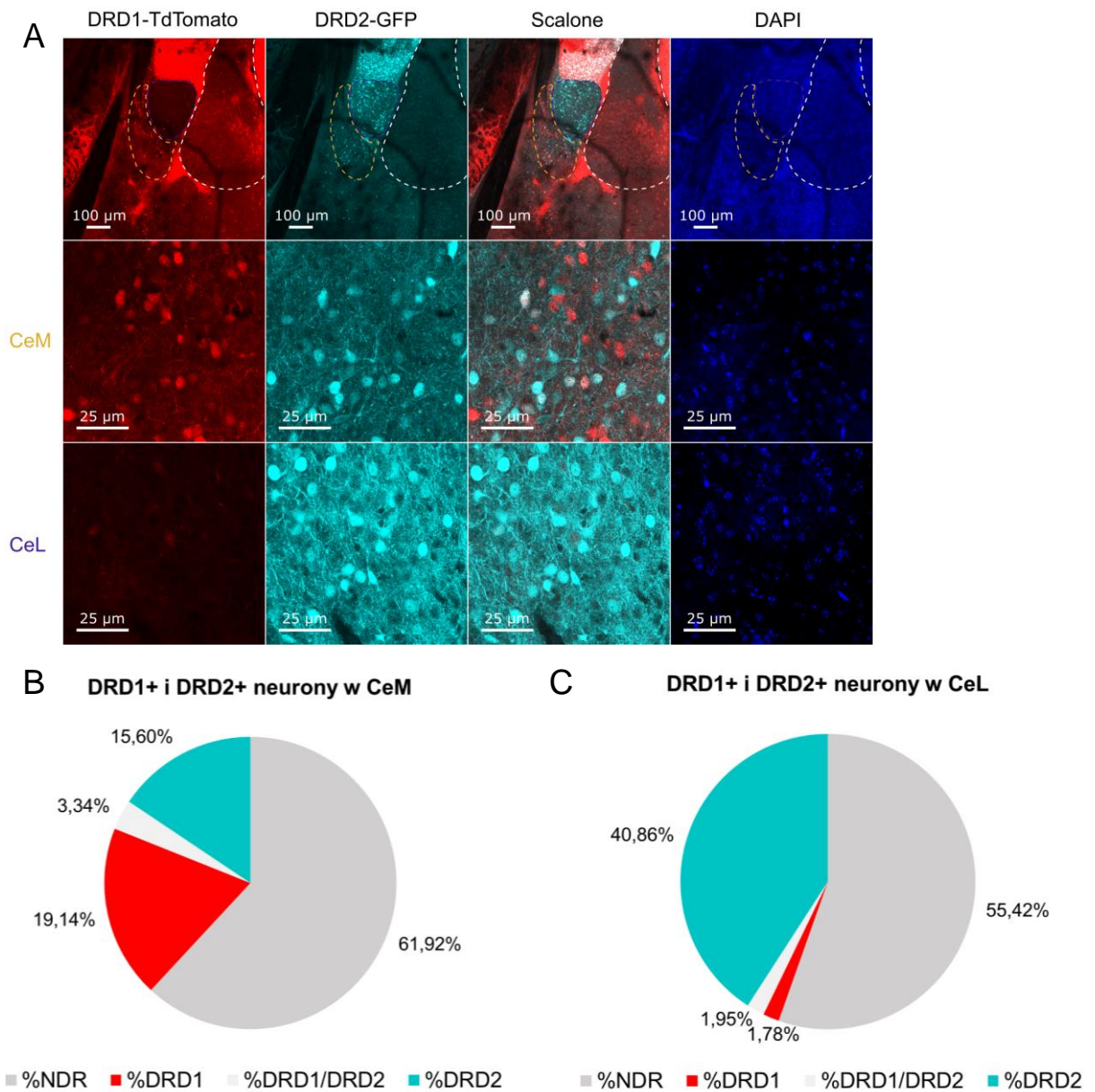
#### 4.5. Analiza roli komórek wrażliwych na dopaminę w jądrze środkowym ciała migdałowatego w odpowiedzi na nagrody

Badania w poprzedniej części rozprawy pokazały, że CeM jest zaangażowane w przetwarzanie zarówno informacji o cukrze, jak i o kokainie. W związku z tym, że poszczególne populacje neuronów mogą mieć odmienne role w odpowiedzi na różne bodźce, postanowiono sprawdzić, jakim modyfikacjom podlegają neurony DRD2+ i DRD1+ w CeA po ekspozycji myszy na badane nagrody.

#### **4.5.1. Analiza anatomiczna rozmieszczenia receptorów wrażliwych na dopaminę w jądrze środkowym ciała migdałowatego**

Jądro środkowe ciała migdałowatego składa się z kilku heterogennych typów komórek, które charakteryzują się różnym rozmieszczeniem przestrzennym w CeM i CeL. Poprzednie badania określiły możliwość występowania komórek wrażliwych na Da w CeA, jednak z powodu zastosowanych wcześniej technik były one pozbawione rozdzielczości przestrzennej. Dlatego też, przy wykorzystaniu myszy linii DRD1-TdTomato/DRD2-GFP, określono rozmieszczenie komórek z receptorami DRD1 i DRD2 w CeA.

38,08% komórek CeM oraz 44,59% komórek CeL posiadało na swojej powierzchni któryś z badanych receptorów dla Da (Ryc. 44B). Zauważono ścisłe rozmieszczenie tych receptorów w poszczególnych częściach CeA. Neurony wrażliwe na dopaminę w CeL na swojej powierzchni miały głównie DRD2 (40,86%) i tylko ich niewielka część posiadała na swojej powierzchni również, lub tylko, DRD1 (kolejno 1,95% oraz 1,78%; Ryc. 44(C)). Podobną liczbę komórek wrażliwych na Da zaobserwowano w CeM (38,08%). Tam jednak, neurony te tworzyły mozaikę i DRD2+ (15,60%) oraz DRD1+ (19,14%) występowały obok siebie. Ponadto, podobnie jak w innych częściach mózgu (np. ACB) tylko niewielka populacja neuronów posiadała na swojej powierzchni jednocześnie dwa typy badanych receptorów (3,34%).



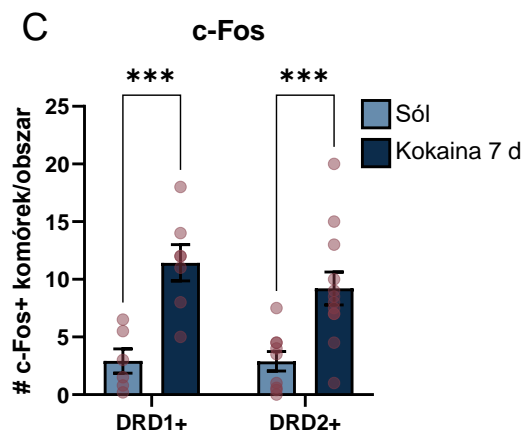
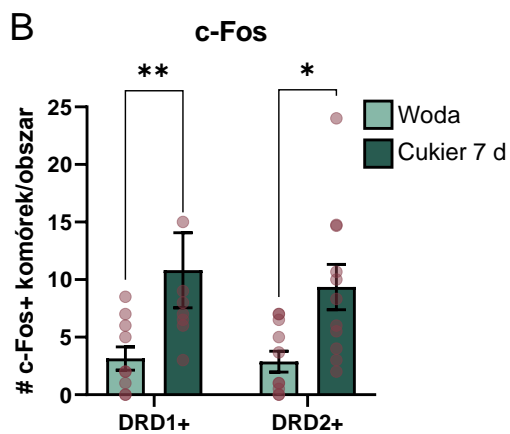
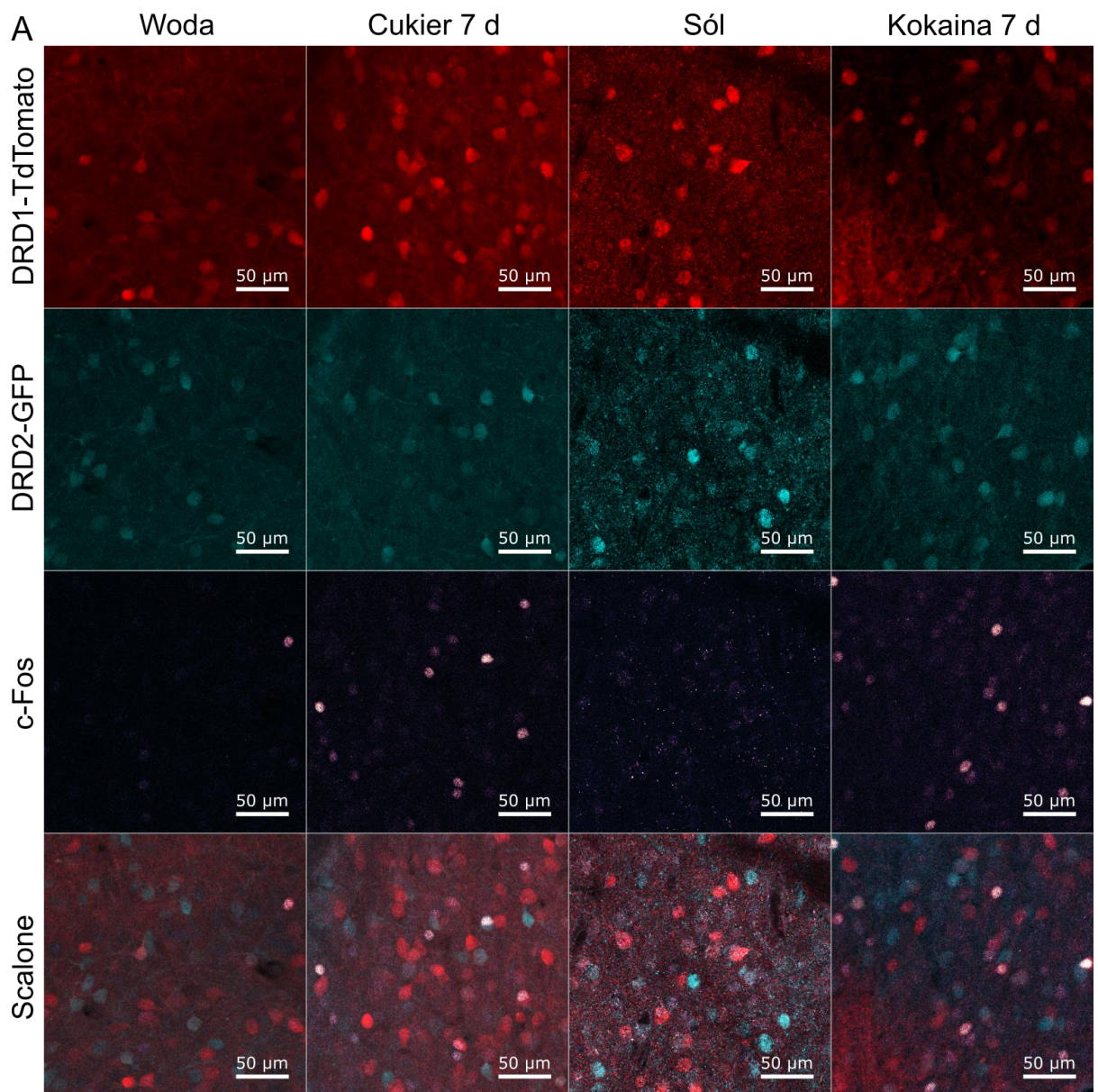
**Ryc. 44: Udział komórek z DRD1 i DRD2 w populacji neuronów CeA myszy.** **A)** Neurony z DRD1 wyznakowane białkiem TdTomato (czerwone) oraz neurony z DRD2 wyznakowane GFP (akwamaryna) widoczne pod powiększeniem 10x (rzęd górny) oraz 40x (rzęd środkowy oraz dolny). Kolorem niebieskim zaznaczono jądra komórkowe wybarwione barwnikiem DAPI. Na zdjęciach rzędu górnego wyróżniono obszary ciała migdałowatego: CeM (żółty), CeL (niebieski) i BLA (biały). **B, C)** Procentowy udział neuronów DRD1+ i DRD2+ w sumie komórek CeM (**B**) i CeL (**C**). DRD1/DRD2 oznacza, że neurony posiadały na swojej powierzchni oba typy receptorów dla dopaminy.

#### **4.5.2. Analiza poziomu c-Fos w komórkach DRD1- oraz DRD2-pozytywnych u myszy eksponowanych na nagrody naturalne i farmakologiczne**

W poprzednich badaniach opisanych w rozprawie zauważono, że CeM jest zaangażowane w przetwarzanie informacji o nagrodzie farmakologicznej oraz naturalnej. Dlatego też postanowiono sprawdzić, czy nagrody te angażują neurony DRD1+ oraz DRD2+ w CeM.

Zarówno 7-dniowa ekspozycja zwierzęcia na cukier, jak i na kokainę spowodowała zwiększony poziom c-Fos w neuronach z DRD1, jak i również z DRD2 (Ryc. 45). W warunkach kontrolnych, w przypadku ekspozycji na wodę, poziom c-Fos był zbliżony dla komórek DRD1+ (średnia = 3,15 komórek/obszar; SEM = 1,011), jak i DRD2+ (średnia = 2,879 komórek/obszar; SEM = 0,9034). W CeM myszy po ekspozycji na cukier poziom ten wzrósł do średnio 10,81 komórek/obszar (SEM = 3,26) dla neuronów DRD1+ oraz do 9,356 komórek/obszar (SEM = 1,964) dla DRD2+ (Ryc. 45B).

W przypadku ekspozycji na sól fizjologiczną, poziom c-Fos dla komórek DRD1+ wyniósł średnio 2,917 komórek/obszar (SEM = 1,143), a dla DRD2+ 2,889 komórek/obszar (SEM = 0,935). Kokaina spowodowała wzrost liczby komórek c-Fos+ do średniego poziomu 11,43 komórek/obszar (SEM = 1,571) w neuronach DRD1+ oraz do 9,208 komórek/obszar (SEM = 1,428) dla DRD2+ (Ryc. 45C).



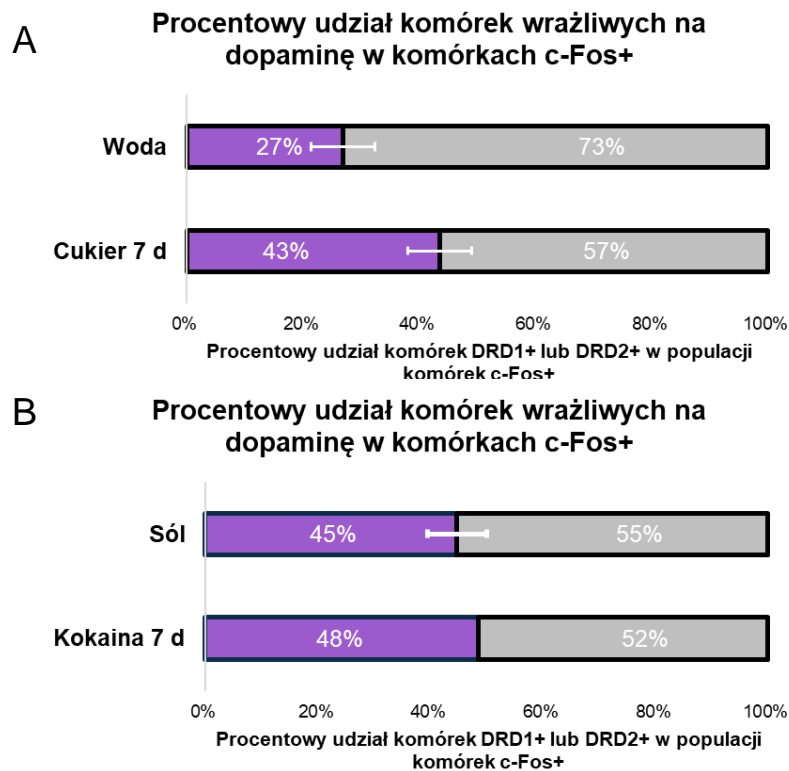
**Ryc. 45: c-Fos w komórkach DRD1+ i DRD2+ w CeM myszy ekspozowanych na nagrodę naturalną lub farmakologiczną. A) Przykładowe obrazy neuronów DRD1+ (czerwone) i DRD2+ (akwamaryna) z wybarwionym białkiem c-Fos (kolor pomarańczowy) w CeM myszy**



eksponowanych na nagrody naturalne i farmakologiczne. **B, C**) Wykresy przedstawiające liczbę komórek c-Fos+/obszar w neuronach DRD1+ i DRD2+ w CeM myszy eksponowanych na nagrody naturalne (**B**) i farmakologiczne (**C**). Wykresy przedstawiają średnie oraz  $\pm$  SEM. Czerwonymi kropkami przedstawiono wyniki dla pojedynczych myszy. Na wykresach \*, \*\* i \*\*\* oznaczają kolejno  $p < 0,01$  i  $p < 0,001$  oraz  $p < 0,0001$ .

Dla **B, C** liczebność grup dla DRD1+: N Woda = 10(14); N Cukier 7 d = 8(13); N Sól = 6(18); N Kokaina 7 d = 7(8) oraz dla DRD2+: N Woda = 11(19); N Cukier 7 d = 11(25); N Sól = 9(22); N Kokaina 7 d = 12(20) gdzie N = liczba zwierząt użytych w badaniu (liczba analizowanych obszarów). Różnice pomiędzy badanymi grupami zmierzono testem dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA, gdzie dla **B** DRD1+  $p = 0,0082$  i DRD2+  $p = 0,0125$  oraz dla **C** DRD1+  $p = 0,0005$  i DRD2+  $p = 0,0009$ .

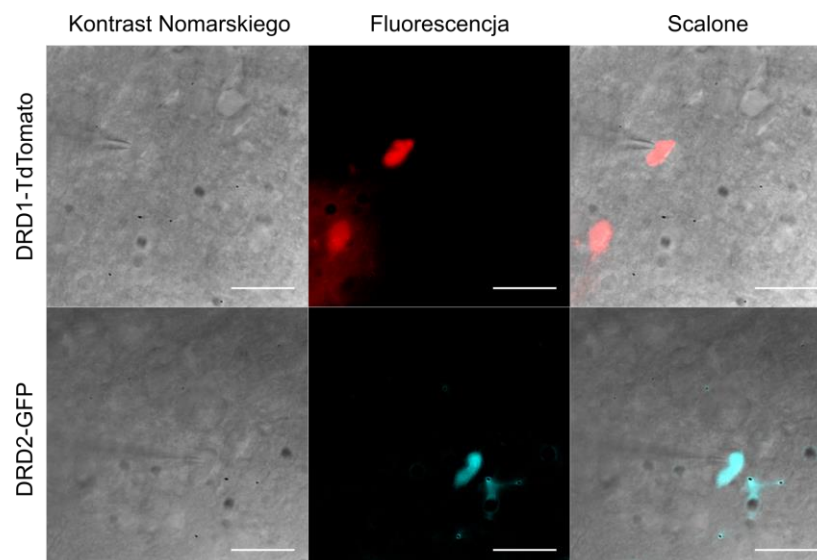
Tylko niektóre zwierzęta użyte w badaniu były podwójnie transgenicjne, co umożliwiłoby porównanie poziomu c-Fos w komórkach wrażliwych i niewrażliwych na Da. Niemniej jednak, w przypadku, gdy było to możliwe, określano procentowy udział tych typów neuronów w populacji komórek c-Fos+. Wśród komórek ze zwiększonym poziomem c-Fos, komórki DRD1+ i DRD2+ w CeM stanowiły mniej niż połowę zarówno w przypadku ekspozycji na nagrodę naturalną (średnio 26,84% dla Woda i 43,48% dla Cukier 7 d), jak i nagrodę farmakologiczną (średnio 44,76% dla Sól i 48,48% dla Kokaina 7 d; Ryc. 46).



**Ryc. 46: Procentowy udział komórek DRD1+ i DRD2+ we wszystkich komórkach c-Fos+ w CeM myszy eksponowanych na nagrodę naturalną lub farmakologiczną. A, B) Wykresy przedstawiające procentowy udział komórek DRD1+ i DRD2+ we wszystkich komórkach c-Fos+ w CeM myszy eksponowanych na nagrody naturalne (A) i farmakologiczne (B). Wykresy przedstawiają średnie oraz  $\pm$  SEM. Liczebność grup: N Woda = 8(15); N Cukier 7 d = 5(11); N Sól = 2(10); N Kokaina 7 d = 1(1), gdzie N = liczba zwierząt użytych w badaniu (liczba analizowanych obszarów).**

#### 4.5.3. Analiza aktywności spontanicznej komórek DRD1- oraz DRD2-pozytywnych w CeM myszy eksponowanych na nagrody naturalne lub farmakologiczne

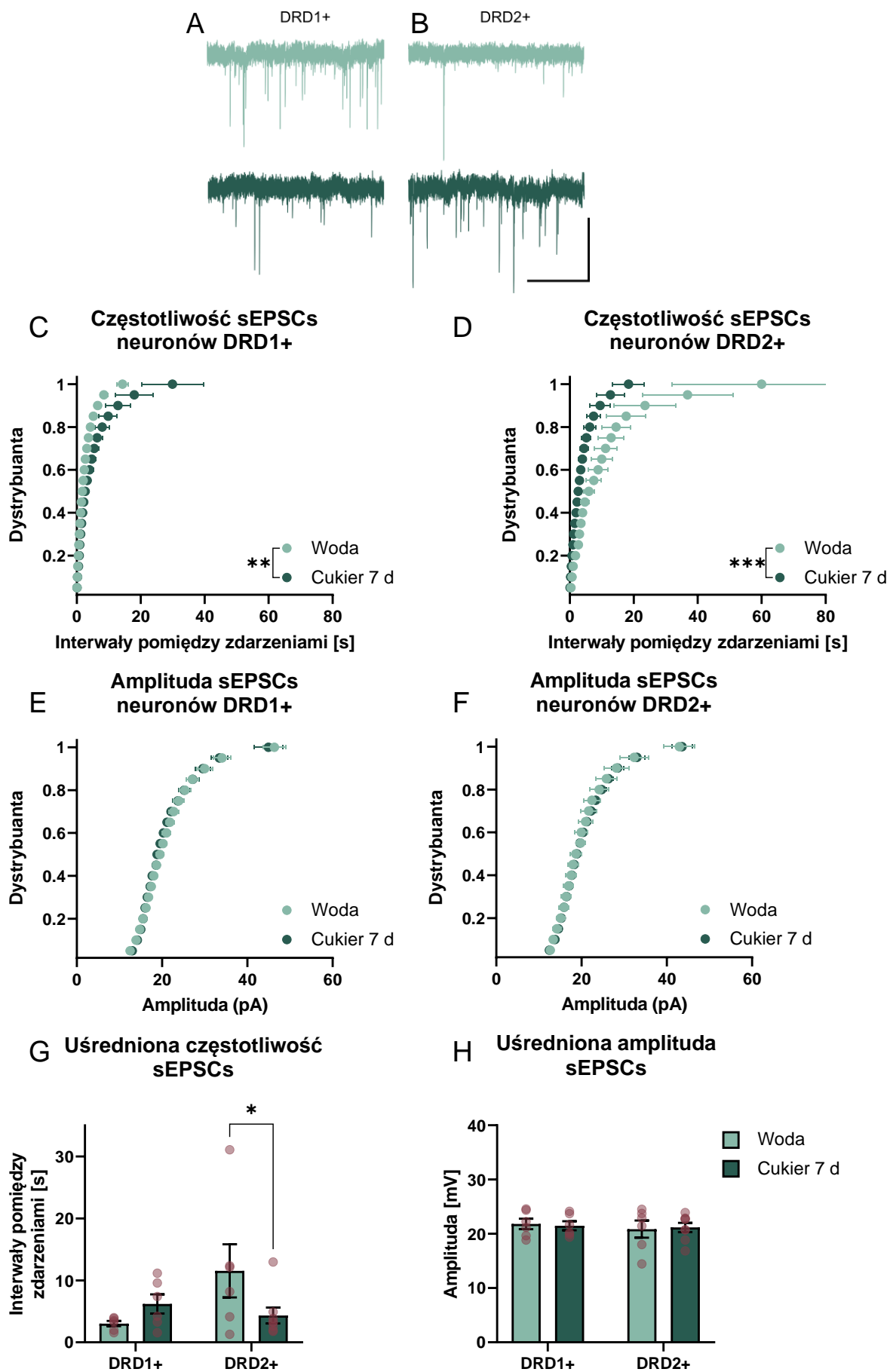
Analiza poziomu c-Fos w komórkach DRD1+ i DRD2+ wykazała, że neurony wrażliwe na Da są zaangażowane w przetwarzanie informacji zarówno o cukrze, jak i o kokainie. By sprawdzić, czy ekspresji *c-fos* w komórkach wrażliwych na Da towarzyszyły zmiany plastyczne, przeprowadzono eksperymenty elektrofizjologiczne *ex vivo* na skrawkach myszy DRD1-TdTomato/DRD2-GFP poddanych wcześniejszej ekspozycji na nagrody (Ryc. 47).



**Ryc. 47: Neurony wrażliwe na dopaminę w CeM.** Neurony z DRD1 wyznakowane białkiem TdTomato (czerwone, panel górny) oraz neurony z DRD2 wyznakowane GFP (akwamaryna, panel dolny) widoczne pod mikroskopem do eksperymentów elektrofizjologicznych. W odcieniach szarości widoczne neurony w mikroskopii z kontrastem Nomarskiego. Po lewej stronie neuronów widoczne są elektrody nagrywające. Skala wynosi 20  $\mu\text{m}$ .

#### 4.5.3.A Analiza aktywności spontanicznej komórek DRD1- oraz DRD2-pozytywnych w CeM myszy eksponowanych na cukier

Analiza sEPSCs wykazała, że neurony DRD1+ i DRD2+ ulegają przeciwstawnym zmianom plastycznym u myszy eksponowanych na cukier (Ryc. 48). Neurony z DRD1 charakteryzowały się zmienioną częstotliwością spontanicznych prądów zależnych od AMPAR, co określono porównując rozkłady interwałów pomiędzy nimi ( $p = 0,0029$ ; Ryc. 47 C, D). Porównując średnie tych częstotliwości zanotowano wydłużenie się interwałów o średnio 3,168 s dla DRD1+ i ich skrócenie o średnio 7,211 s dla DRD2+ (Ryc. 47G). Istotność statystyczną uzyskano jednak tylko w przypadku DRD2+ ( $p = 0,0295$ ), ale nie dla DRD1+ ( $p = 0,3491$ ). Jednocześnie, ekspozycja na cukier nie wywołała zmian w amplitudzie sEPSCs komórek wrażliwych na Da (Ryc. 47E, F, H).

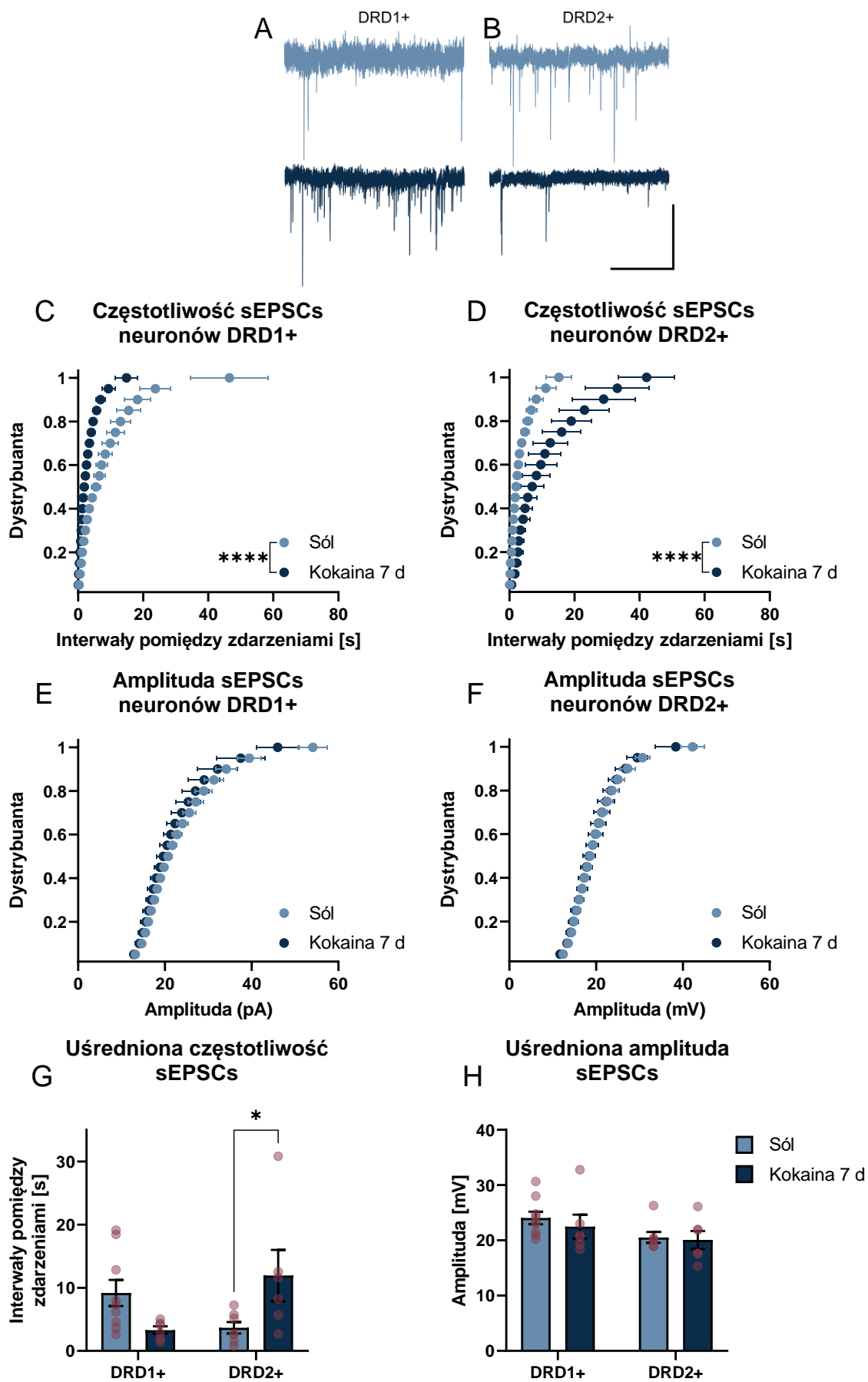


**Ryc. 48: Wpływ cukru na spontaniczną aktywność neuronów DRD1+ i DRD2+ w CeM.** **A, B)** Przykładowe nagrania sEPSCs nagrane w komórkach z DRD1 (**A**) i z DRD2 (**B**) myszy eksponowanych na wodę (jasnozielony) lub cukier (ciemnozielony). Linia pozioma odzwierciedla 2 s, a pionowa 20 pA. **C, D, E, F)** Wykresy przedstawiające dystrybuanty częstotliwości (**C, D**) i amplitud (**E, F**) sEPSCs nagranych z komórek DRD1+ (**C, E**) i DRD2+ (**D, F**) myszy eksponowanych na wodę lub cukier przez 7 dni. **F, G)** Uśrednione częstotliwości (**F**) i amplitudy (**G**) sEPSCs nagranych z komórek DRD1+ i DRD2+ myszy eksponowanych na wodę lub cukier przez 7 dni. Wykresy przedstawiają średnie oraz  $\pm$  SEM. Czerwonymi kropkami przedstawiono wyniki dla pojedynczych myszy. Na wykresach \*, \*\* i \*\*\* oznaczają kolejno  $p < 0,05$  i  $p < 0,01$  oraz  $p < 0,001$ .

Liczebność grup wynosiła dla DRD1+ N Woda = 6(30) i N Cukier 7 d = 6(17) i dla DRD2+ N Woda = 6(33) i N Cukier 7 d = 8(29), gdzie N = liczba zwierząt użytych w badaniu (liczba nagranych komórek). Różnice pomiędzy badanymi grupami zmierzono testem Kolmogorova-Smirnova dla dystrybuant, gdzie dla pomiarów częstotliwości prądów z DRD1+  $p = 0,0029$  i DRD2+  $p = 0,0003$ . Średnie porównywano testem dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA  $p = 0,0295$  dla częstotliwości DRD2+.

#### **4.5.3.B Analiza aktywności spontanicznej komórek DRD1- oraz DRD2-pozytywnych w CeM myszy eksponowanych na kokainę**

Podobnie jak w przypadku cukru, ekspozycja na kokainę nie wywołała zmian w amplitudzie sEPSCs komórek wrażliwych na Da (Ryc. 49E, F, H). Zmiany zaobserwowano jednak w przypadku częstotliwości rejestrowanych prądów. Dla komórek DRD1+, kokaina spowodowała wzrost częstotliwości sEPSCs, co wykazano porównując rozkłady dystrybuanty interwałów pomiędzy kolejnymi zdarzeniami ( $p < 0,0001$ ; Ryc. 49E, F). Odstępy te zmalały średnio o 5,892 s (brak istotności statystycznej;  $p = 0,0723$ ; Ryc. 49G). W neuronach DRD2+ zaobserwowano z kolei efekt odwrotny, czyli spadek częstotliwości nagrywanych prądów ( $p < 0,0001$ ). Średni czas pomiędzy zdarzeniami dla neuronów DRD2+ wydłużył się o 8,268 s ( $p = 0,0197$ ; Ryc. 49G).

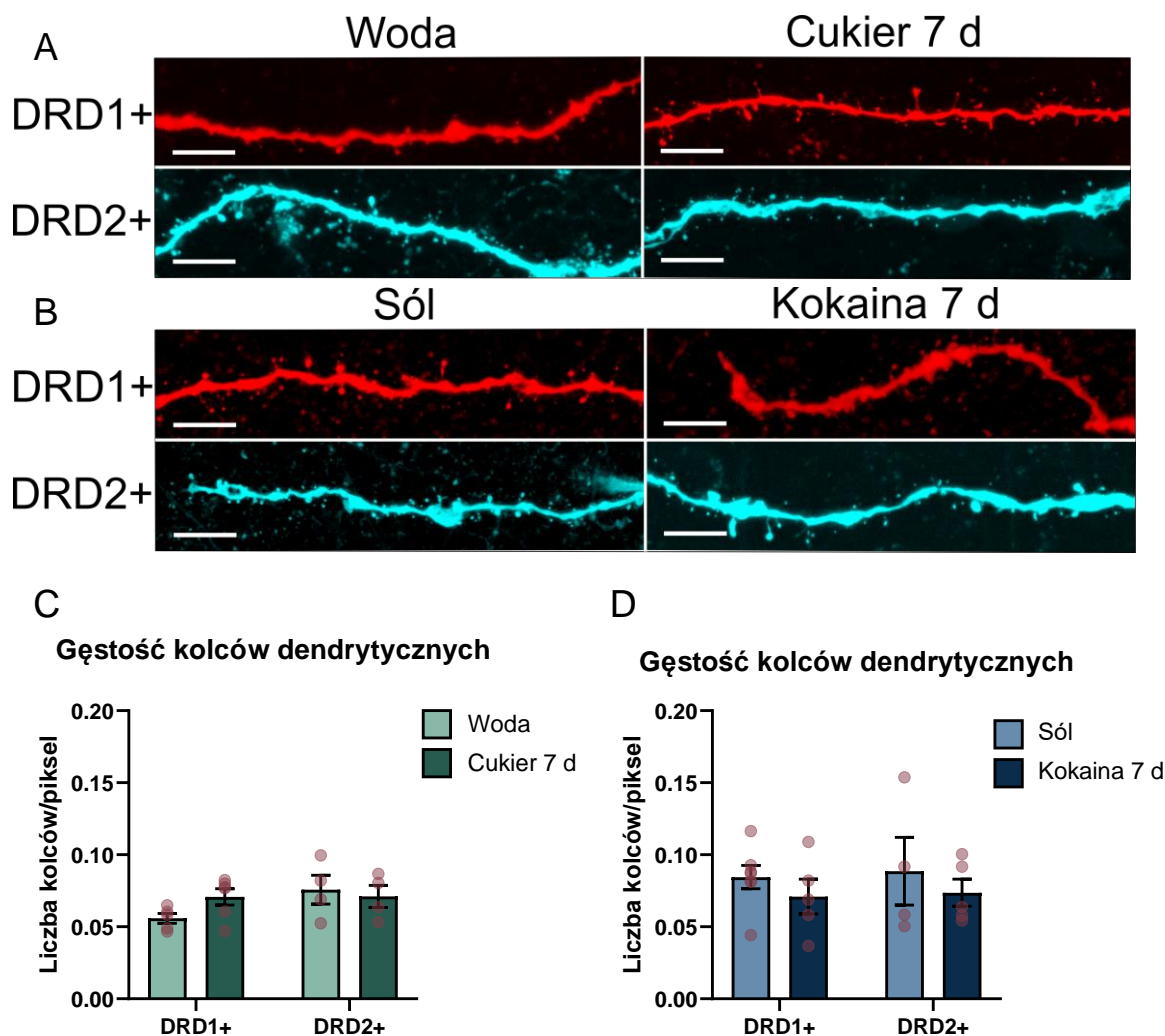


**Ryc. 49: Wpływ kokainy na spontaniczną aktywność neuronów DRD1+ i DRD2+ w CeM**  
**A, B)** Przykładowe nagrania sEPSCs nagrane w komórkach z DRD1 (**A**) i z DRD2 (**B**) myszy eksponowanych na sól fizjologiczną (jasnoniebieski) lub kokainę (ciemnoniebieski). Linia pozioma odzwierciedla 2 s, a pionowa 20 pA. **C, D, E, F)** Wykresy przedstawiające dystrybuanty częstotliwości (**C, D**) i amplitud (**E, F**) sEPSCs nagranych z komórek DRD1+ (**C, E**) i DRD2+ (**D, E**) myszy eksponowanych na sól lub kokainę przez 7 dni. **F, G)** Uśrednione częstotliwości (**F**) i amplitudy (**G**) sEPSCs nagranych z komórek DRD1+ i DRD2+ myszy eksponowanych na sól lub kokainę przez 7 dni. Wykresy przedstawiają średnie oraz  $\pm$  SEM. Czerwonymi kropkami przedstawiono wyniki dla pojedynczych myszy. Na wykresach \* i \*\*\*\* oznaczają kolejno  $p < 0,05$  i  $p < 0,0001$ .

Liczebność grup wyniosła dla DRD1+ N Sól = 9(29) i N Kokaina 7 d = 6(15) i dla DRD2+ N Sól = 7(17) i N Kokaina 7 d = 6(24), gdzie N = liczba zwierząt użytych w badaniu (liczba nagranych komórek). Różnice pomiędzy badanymi grupami zmierzono testem Kolmogorova-Smirnova dla dystrybuant, gdzie dla pomiarów częstotliwości prądów DRD1+ i DRD2+  $p < 0,0001$ . Średnie porównywano testem dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA, gdzie  $p = 0,0197$  dla częstotliwości sEPSCs DRD2+.

#### **4.5.4. Analiza gęstości kolców dendrytycznych neuronów DRD1- oraz DRD2-pozytywnych myszy eksponowanych na nagrody**

Podczas wykonywania pomiarów sEPSCs *ex vivo* neurony były jednocześnie wypełniane biocytyną, wchodzącą w skład zastosowanego płynu elektrodowego. Umożliwiło to późniejsze ich wyznakowanie streptawidyną połączoną z barwnikiem fluorescencyjnym (Ryc. 50A, B). Zdjęcia wyznakowanych w ten sposób neuronów posłużyły do sprawdzenia, czy zaobserwowanym wcześniej zmianom sEPSCs towarzyszyły zmiany w liczbie kolców dendrytycznych. Analiza gęstości kolców nie wykazała jednak zmian w liczbie kolców dendrytycznych w żadnej z badanych grup (Ryc. 50C, D).



**Ryc. 50: Wpływ cukru i kokainy na gęstość kolców dendrytycznych neuronów DRD1+ i DRD2+ w CeM.** **A, B)** Przykładowe zdjęcia dendrytów komórek z DRD1 (czerwone) i z DRD2 (niebieskie) myszy eksponowanych na nagrody naturalne (**A**) lub farmakologiczne (**B**). Biała linia na zdjęciach odpowiada 10  $\mu\text{m}$ . **C, D)** Uśrednione gęstości kolców dendrytycznych neuronów DRD1+ i DRD2+ myszy eksponowanych na nagrody naturalne (**C**) i farmakologiczne (**D**). Wykresy przedstawiają średnie oraz  $\pm$  SEM. Czerwonymi kropkami przedstawiono wyniki dla pojedynczych myszy.

Liczebność grup wyniosła dla DRD1+ N Woda = 5(39) i N Cukier 7 d=6(64), N Sól = 7(89), N Kokaina 7 d = 5(17) i dla DRD2+ N Woda = 4(19) i N Cukier 7 d = 4(23), N Sól = 4(23), N Kokaina 7 d = 5(33), gdzie N = liczba zwierząt użytych w badaniu (liczba badanych dendrytów). Różnice pomiędzy badanymi grupami zmierzono testem dwuczynnikowej analizy wariancji, gdzie żaden z wyników nie uzyskał istotności statystycznej.



## 5. DYSKUSJA

### 5.1. Badanie efektów behawioralnych ekspozycji na słodką wodę oraz na kokainę

W niniejszej rozprawie doktorskiej opisano wyniki badań, w których porównano efekty ekspozycji myszy na słodką wodę z efektami wywołanymi przez zastrzyki z kokainy. W przeprowadzonych badaniach zastosowano dwa różne modele ekspozycji na te nagrody: myszy miały swobodny, niewymuszony dostęp do 7,5% roztworu cukru, a kokaina była podawana w postaci dootrzewnowych zastrzyków w dawce 20 mg/kg m.c.

Badane zwierzęta piły więcej słodkiej wody niż wody zwykłej, co jest zachowaniem charakterystycznym dla gryzoni różnych gatunków <sup>4,163,183</sup>. Zastrzyki z kokainy również wywołały przewidywaną odpowiedź behawioralną zwierząt w postaci ich zwiększonej aktywności lokomotorycznej. Zaobserwowano też kumulację efektów działania kokainy na aktywność lokomotoryczną myszy. Ta sensytyzacja była spodziewana, ale nie jest ona regułą w badaniach nad narkotykami i przy stosowaniu zbyt wysokich dawek kokainy (powyżej 30 mg m.c. u myszy) efekt ten może nie występować <sup>14,184</sup>. Innym efektem wywołanym przez kokainę była zmniejszona defekacja myszy, co również jest znanym, ale rzadko raportowanym, efektem działania tego narkotyku na gryzonie <sup>185</sup>.

Ze względu na konieczność kontrolowania dawki kokainy zastosowano niewolicjonalny model przyjmowania substancji uzależniającej, co różni się od modelu zastosowanego w przypadku spożycia słodkiej wody. Alternatywny model, umożliwiający samo-podawanie kokainy w formie dializ do układu krwionośnego wymaga skomplikowanych operacji i nauczania zwierzęcia wykonywania czynności do otrzymania zastrzyku <sup>82</sup>. Zarówno wymuszone, jak i wolicjonalne podania kokainy mają własności nagradzające dla zwierząt <sup>184</sup>. Niemniej jednak, z literatury wiadomo, że istnieją pewne różnice w tym, jakie zmiany w mózgu one wywołują. Pokazano np., że samo-podanie kokainy, ale nie wymuszone zastrzyki z tego narkotyku, indukują wzmocnienie synaptyczne w neuronach VTA <sup>186</sup>.

## 5.2. Aktywność mózgu myszy po ekspozycji na nagrody

### 5.2.1. Wzrost poziomu c-Fos po ekspozycji myszy na nagrody

c-Fos często określany jest jako marker aktywności neuronalnej, ponieważ zauważono, że pojawia się w neuronach z podwyższoną aktywnością w odpowiedzi na różne bodźce <sup>187</sup>. Warto zaznaczyć jednak, że ekspresja *c-fos* jest przejściowa (trwa od 1 do 3 godz. po prezentacji bodźca), oraz że jego produkt bierze udział w kształtowaniu późnej fazy procesów plastycznych. Wzrastający poziom c-Fos nie zawsze prowadzi do wzmocnienia połączeń synaptycznych, a ekspresja *c-fos* może być indukowana zarówno w LTP, jak i w LTD <sup>188</sup>. W niniejszej rozprawie zaobserwowano zwiększony poziom c-Fos w komórkach CeM myszy w 2 godz. po ekspozycji na słodką wodę oraz w CeM i CeL w 2 godz. po zastrzyku z kokainy. Tym wzrostom poziomu c-Fos w neuronach CeA towarzyszyła obecność takich markerów LTP i LTD, jak milczące synapsy i zmiany prądów spontanicznych, co sugeruje, że podobnie do danych literaturowych, białko to może towarzyszyć obu procesom plastycznym.

Ekspresja *c-fos* jest nie tylko krótka i przejściowa, ale zauważono też, że w niektórych strukturach następuje po jednokrotnej ekspozycji na bodziec, ale nie będzie indukowana w przypadku wielokrotnej prezentacji tego samego bodźca <sup>161,189</sup>. Obserwacje te doprowadziły do teorii, że ekspresja *c-fos* w neuronach następuje jednorazowo w odpowiedzi na bodziec w trakcie procesu uczenia się. Ma ona służyć reorganizacji połączeń synaptycznych, i dlatego została nazwana „markerem nowości bodźca” <sup>132</sup>. W wolumetrycznych badaniach z ostatnich lat rzeczywiście zauważono, że wzór ekspresji *c-fos* w mózgu może ulec zmianie po jednokrotnym i kilkukrotnym wystawieniu zwierzęcia na bodziec awersyjny <sup>190,191</sup>. Jednak zauważono również, że obok struktur, które tylko początkowo mają ekspresję *c-fos*, są też takie które zaczynają ją wykazywać wraz z kolejnymi prezentacjami bodźca oraz takie, które mają ją przy każdorazowym podaniu bodźca. Badania opisane w rozprawie potwierdzają te obserwacje i zauważono, że w przypadku nagrody naturalnej, do indukcji wzrostu poziomu c-Fos ważną rolę odgrywa nowość bodźca, co skutkuje aktywacją wielu struktur mózgu tylko po jednorazowej ekspozycji na słodką wodę. Jednakże, zaobserwowano także struktury, w których zwiększony poziom c-Fos pojawił się dopiero po kilku prezentacjach słodkiej wody. Ponadto, spostrzeżono też struktury takie jak CeM i ACB, gdzie zwiększona liczba komórek c-Fos+ utrzymywała się w obu badanych punktach czasowych <sup>192</sup>.

W przypadku kokainy, to siedmiokrotne zastrzyki miały rozleglejsze efekty niż pojedynczy zastrzyk, co sugeruje, że kilkukrotne podania narkotyku zdają się zwiększać poziom *c-Fos* w coraz to nowych strukturach. Podobnych obserwacji dokonali również inni badacze w neuronach ACB, korze przedczołowej i BLA, gdzie pojedyncze podanie kokainy indukowało mniejszą ekspresję *c-fos* niż dwa podania kokainy<sup>193</sup>. Również w badaniach, gdzie przyżyciowo mierzono aktywność neuronów ACB pokazano, że kolejne ekspozycje na kokainę angażują coraz to więcej nowych komórek<sup>194</sup>. Badania opisane w rozprawie wraz z danymi literaturowymi wspierają więc hipotezę, że efekty działania kokainy w mózgu akumulują się wraz z kolejnymi podaniami<sup>38</sup>.

### **5.2.2. Aktywacja rozległych części mózgu w odpowiedzi na nagrody**

Barwienia immunohistochemiczne produktów ekspresji IEGs w oczyszczonych tkankach pozwalają na identyfikację komórek zaangażowanych w przetwarzanie i kodowanie nowych informacji. W niniejszej rozprawie doktorskiej stworzono mapy rejonów mózgu funkcjonalnie zaangażowanych podczas jedno- i wielokrotnego podania słodkiej wody lub kokainy. Zaobserwowano, że w przypadku obu substancji aktywowane były regiony związane z doznaniem emocjonalnymi (m.in. ACB i fragmenty ciała migdałowatego). Silną aktywację zaobserwowano również w hipokampie, obszarze związanym z kontekstualnym tworzeniem śladów pamięciowych. W niektórych z analizowanych rejonów mózgu, zwiększoną liczbę komórek *c-Fos+* zaobserwowano tylko po podaniu konkretnego typu nagrody i np. selektywnie aktywowane podczas ekspozycji na kokainę były różne rejony kory mózgowej, w tym obszary wzrokowe. Te obszary wzrokowe wykazują dużą aktywność podczas prezentacji bodźców wizualnych ale również podczas wzmożonej ruchliwości<sup>195</sup>. Pewnym zaskoczeniem może być to, że ekspozycja na cukier, ale nie na kokainę, spowodowała wzrost liczby komórek *c-Fos+* w VTA, które produkuje *Da*, neuroprzekaźnik uwalniany podczas ekspozycji na nagrody<sup>38</sup>. W literaturze opisanym jest jednak fakt, że ekspozycja na kokainę powoduje aktywację hamujących autoreceptorów typu D2 na neuronach VTA, co może prowadzić do zmniejszonej aktywności tego jądra po ekspozycji zwierzęcia na ten narkotyk<sup>196,197</sup>. Ponadto, w przypadku aktywacji VTA znaczenie może mieć forma podania nagrody i zauważono, że to samo-podanie kokainy lub cukru, ale nie wymuszone iniekcje kokainy, indukują zmiany plastyczne w neuronach VTA<sup>186</sup>.

Technikę badania poziomu c-Fos w całym mózgu wykorzystano wcześniej w innych badaniach do określania aktywności mózgu myszy po zażyciu leków obniżających łaknienie oraz po ekspozycji na różne substancje psychoaktywne, takie jak przeciwpsychotyczny haloperidol, czy narkotyki z grupy psychodelików: ketaminy i psylocybiny<sup>106,198,199</sup>. Porównania wyników takich badań może pomóc w lepszym zrozumieniu podstaw efektów behawioralnych wywoływanych przez różne klasy narkotyków, np. psylocybiny i badanej w rozprawie kokainy. Oba te narkotyki są substancjami wywołującymi silne stany emocjonalne i oba angażują m.in. różne jądra ciała migdałowatego<sup>199</sup>. Kokaina jest jednak silnie uzależniająca i, inaczej niż niezależniająca psylocybina, ekspozycja na nią powoduje wzrost poziomu c-Fos również w ACB i podwzgórze.

Ekspresję IEGs w całym mózgu po ekspozycji na kokainę zbadano już wcześniej w innych badaniach, podczas których mierzono poziom ekspresji *arc* oraz *npas4* w 3 godz. po zastrzyku z narkotyku<sup>106</sup>. Porównanie wyników opisanych w rozprawie do wyników z Ye i wsp., *Cell*, (2016) jest niestety utrudnione, ponieważ cytowany artykuł powstał jeszcze przed stworzeniem wystandaryzowanych procedur klasyfikacji rejonów mózgu na podstawie atlasu<sup>200</sup>. Mimo to, można stwierdzić, że wyraźnym wspólnym wynikiem dla obu analiz jest aktywacja rejonów związanych z bodźcami emocjonalnymi i pamięcią, takimi jak ACB, ciało migdałowate i hipokamp. Wspólnym aspektem jest też jądro uzdeczki boczne (LH). Struktura ta związana jest z uczeniem awersyjnym i w obu badaniach pozostała nieaktywna, zarówno po ekspozycji na cukier, jak i na kokainę<sup>201</sup>.

Zaskakującym wynikiem analizy przedstawionej w rozprawie jest brak zwiększonej liczby komórek c-Fos+ w CeA po pojedynczej ekspozycji na kokainę, który został stwierdzony tradycyjnymi technikami immunohistochemicznymi i opisany w innej części rozprawy. Ta rozbieżność może być wynikiem błędu statystycznego pierwszego rodzaju, który musiał wystąpić przy porównywaniu tak wielu struktur. Wynik ten podkreśla ograniczenia tego typu badań i wskazuje, że wnioski na temat aktywności pojedynczych struktur należy formułować ostrożnie. Znacznie pewniejsze interpretacje można uzyskać, analizując ogólne zmiany wzorca aktywności całego mózgu.

### **5.2.3. Rozproszone kodowanie informacji o nagrodach w mózgu myszy**

W badaniach opisanych w rozprawie zaobserwowano, że zarówno ekspozycja na kokainę, jak i na cukier zwiększają poziom c-Fos w rozległych częściach niemal całego mózgu.

Te aktywowane obszary stanowiły nawet 65% badanych struktur. Wyniki te sugerują, że przetwarzanie informacji o nagrodach angażuje rozległą sieć różnych struktur mózgowych.

Podobnie rozległą aktywację mózgu w procesie przetwarzania bodźców obserwowano w innych badaniach, m.in. w tych, gdzie mierzono poziom c-Fos w oczyszczonych mózgach myszy poddanych warunkowaniu strachu. W tych badaniach pokazano, że w przetwarzanie informacji o bodźcach awersyjnych zaangażowana jest prawie połowa struktur mózgu<sup>111</sup>. Obserwacji tych dokonano również w badaniach wykorzystujących inne techniki pozwalające na badanie aktywności kilku tysięcy neuronów jednocześnie. Wykazały one, że struktury mózgowie, które dotychczas były przypisywane określonym funkcjom, mogą być aktywowane w wielu innych sytuacjach behawioralnych<sup>202-204</sup>. Zaobserwowano również, że podobnie funkcjonuje mózg człowieka, co można zaobserwować za pomocą czułych pomiarów w skanerach fMRI – nawet proste zadania angażują rozległą sieć komórek nerwowych w całym mózgu<sup>205</sup>. Wszystkie te doniesienia zaburzyły dotychczasowe spojrzenie na mózg jako zbioru wyspecjalizowanych podzespołów, z których każdy zajmuje się ściśle określonymi funkcjami i obecnie często postuluje się koncepcję, zgodnie z którą mózg pracuje jako system kodowania rozproszonego (ang. *sparse coding*). Według tej teorii, różne rozproszone części mózgu wspólnie biorą udział w przetwarzaniu różnych aspektów zachowań<sup>97,112,206</sup>.

Wyniki opisane w rozprawie doktorskiej wpisują się w tę koncepcję, ponieważ myszy, które pasywnie przyjmowały kokainę oraz te, które aktywnie spożywały słodką wodę, miały zwiększony poziom c-Fos w strukturach zlokalizowanych w niemal wszystkich częściach mózgu, również tych, które tradycyjnie nie były związane z układem nagrody.

#### **5.2.4. Zmieniona modułowość mózgu myszy po ekspozycjach na nagrody**

Koncepcja kodowania rozproszonego mózgu jest ściśle powiązana z terminem modułowości mózgu. Termin ten odnosi się do całościowej aktywności sieci neuronów i określa grupy komórek, które wspólnie zaangażowane są w przetwarzanie określonych zachowań<sup>68,113</sup>. W niniejszej rozprawie doktorskiej przedstawiono wyniki wskazujące na zwiększoną modułowość mózgow myszy eksponowanych na kokainę lub na słodką wodę. W przypadku cukru, zmiany te były przejściowe i po siedmiu dniach parametry te wróciły do poziomu obserwowanego w warunkach kontrolnych. W przypadku kokainy, modułowość była podwyższona zarówno po jednym, jak i wielokrotnym jej podaniu.

Modułowość mózgu jest terminem zwykle używanym w badaniach psychologicznych do określania plastyczności mózgu, ale zmiany w modułowości obserwuje się również w przypadku niektórych schorzeń psychicznych, takich jak schizofrenia czy uzależnienia<sup>207–210</sup>. W badaniach na ludziach pokazano, że kokaina i inne stymulanty zaburzają funkcjonalną architekturę mózgu i zmieniają układ wspólnie aktywnych ze sobą struktur<sup>209,211</sup>. W ostatnich latach modułowość mózgu zaczęto badać również u zwierząt, wykorzystując do jej określenia poziom ekspresji *c-fos* w różnych częściach mózgu<sup>190,191</sup>. Pokazano w nich, że ekspozycja na alkohol zwiększa modułowość mózgu myszy<sup>100</sup>. Wolumetryczne barwienia *c-Fos* zostały również wykorzystane do określenia zmiany wzorca aktywności mózgu po nagłym ograniczeniu dostępu do narkotyku u zwierząt wykazujących uzależnienie od stymulantów lub alkoholu. Stwierdzono w nich, że modułowość mózgu w tym przypadku maleje<sup>109,110</sup>. Razem z wynikami opisanymi w rozprawie, doniesienia te sugerują, że substancje psychoaktywne zwiększają modułowość mózgu myszy, a ograniczenie dostępu do nich powoduje spadek tego parametru.

Modułowość mózgu u ludzi określa się poprzez badanie korelacji aktywności pomiędzy strukturami przy wykorzystaniu sygnału fMRI, co pozwala na uzyskanie 4-wymiarowego nagrania poziomu aktywności mózgu<sup>209</sup>. Do określenia poszczególnych modułów, analizuje się funkcjonalne połączenia w mózgu, mierząc stopień ich ko-aktywacji. W przypadku modułowości opartej na poziomie ekspresji IEGs, parametr ten jest określany tylko dla jednego punktu czasowego i nie uwzględnia dynamiki ekspresji genów i ich produktów białkowych, która w przypadku *c-Fos* może obejmować czas od 1 do 3 godz.<sup>132</sup>. Dlatego też, pewnym ograniczeniem metody wyznaczania modułowości na podstawie ekspresji genów i translacji białek jest to, że różne części mózgu mogły być aktywne na różnych etapach prezentacji bodźca i punkt czasowy 2 godz. użyty w badaniu stanowi tylko wycinek informacji o poziomie *c-Fos* w różnych obszarach mózgu<sup>212</sup>. Warto zaznaczyć, że pomimo tych ograniczeń, badanie poziomu *c-Fos* ma tę przewagę nad fMRI, że odzwierciedla on szczególnie poziom aktywności neuronalnej, który jest związany z plastycznością neuronalną<sup>31,132</sup>. W takim kontekście, wyznaczona modułowość wydaje się odpowiednim odzwierciedleniem stopnia reorganizacji sieci neuronów w mózgu. Niemniej jednak, kłopotliwym pozostaje sama interpretacja zmienionej modułowości, która pozostaje niejasna niezależnie od sposobu jej wyznaczenia. Określana jest jako wskaźnik zachodzących zmiany plastycznych w reorganizującej się sieci nerwowej, ale poznanie skutków jej zaburzeń wciąż wymaga nowych koncepcji i badań.

### **5.3. Zmiany plastyczne w jądrze środkowym ciała migdałowatego po ekspozycji myszy na cukier lub kokainę**

#### **5.3.1. Poziom Arc w neuronach ciała migdałowatego myszy eksponowanych na nagrody**

W wynikach opisanych w rozprawie doktorskiej pokazano, że zastrzyki z kokainy spowodowały zwiększony poziom c-Fos w CeM i CeL, a ekspozycja na cukier tylko w CeM. Postanowiono sprawdzić, czy nagrody te indukują podobny wzorzec produktu ekspresji innego IEGs, *arc*. Arc, podobnie jak c-Fos również jest używany do oceny aktywności neuronalnej i towarzyszy zarówno LTP, jak i LTD<sup>153,213</sup>. Badając poziom Arc w CeA stwierdzono jego obecność w CeM i CeL po zastrzykach z kokainy, ale nie po ekspozycji na cukier. Badania te sugerują, że Arc i c-Fos nie są równocennymi markerami aktywności neuronalnej związanej z plastycznością, co jest zgodne z danymi z literaturowymi, które wskazują, że produkty ekspresji różnych IEGs nie muszą się ze sobą pokrywać, a nawet, że powstają w różnych typach neuronów<sup>128,200</sup>.

Arc jest białkiem często badanym w kontekście uzależnień od substancji psychoaktywnych<sup>214</sup>. Ekspresję *arc* w CeA zauważono m.in. po ekspozycji zwierzęcia na alkohol i pokazano jego rolę w regulacji motywacji myszy do jego spożywania<sup>78,215</sup>. Ponadto, zauważono, że w niektórych strukturach w mózgu *arc* ulega ekspresji po ekspozycji na nagrodę farmakologiczną (heroinę) ale nie nagrodę pokarmową<sup>216</sup>. W badaniach tych zauważono, że o ile np. w korze przedczołowej i ACB *arc* ulegał ekspresji zarówno po ekspozycji na nagrodę farmakologiczną, jak i naturalną, tak w brzuszynym prążkowiu – już tylko po narkotyku. Tym samym, zasugerowano, że ekspresja *arc* może czasem być markerem komórek specyficznie aktywowanych przez substancje psychoaktywne<sup>217</sup>. Również w rozprawie w CeA, wzrost poziomu Arc zaobserwowano specyficznie po ekspozycji na kokainę, co poświadcza za szczególną rolę *arc* w przetwarzaniu nagród farmakologicznych.

#### **5.3.2. Markery zmian plastycznych w jądrze środkowym ciała migdałowatego podczas przetwarzania nagród**

W CeA zaobserwowano zwiększoną liczbę komórek Arc+ i c-Fos+ po zastrzykach z kokainy oraz neuronów c-Fos+ po ekspozycji na cukier. Obecność tych białek może być

pewną miarą zmian plastycznych, by jednak to potwierdzić i zbadać ich jakość, przeprowadzono kolejne badania technikami elektrofizjologicznymi i immunohistochemicznymi. Zidentyfikowano inne markery zmian plastycznych w CeM i CeL po zastrzykach z kokainy oraz tylko w CeM po ekspozycji na cukier, m.in. obecność milczących synaps. Zmiany plastyczne w CeL, specyficznym po zastrzykach z kokainy, wskazują na wystąpienie LTD w jego neuronach. W CeM z kolei, zarówno po ekspozycji na kokainę, jak i na cukier zauważono korelaty LTP. W rozprawie opisano też zmiany w pobudliwości neuronów CeA, które są inną, obok synaptycznej, formą plastyczności neuronalnej. Eksperymenty te wykonano tylko na neuronach skrawków myszy eksponowanych na nagrodę farmakologiczną i zauważono, że neurony w CeL są mniej, a w CeM bardziej pobudliwe po ekspozycjach zwierzęcia na kokainę.

W badaniu roli CeA w mózgu często jest ono traktowane jako całość, ale opisane w rozprawie doktorskiej wyniki wskazują, że warto wyszczególnić jego części, które mogą być odmiennie zaangażowane m.in. w przetwarzanie informacji o nagrodach naturalnych i farmakologicznych<sup>80,88</sup>. Obserwacji takich dokonali również inni badacze, którzy pokazali, że różne bodźce emocjonalne angażują odmiennie części CeA<sup>70</sup>. CeM jest jądrem uznawanym za kluczowe w przetwarzaniu informacji o bodźcach apetytywnych i jego aktywność pokazano w przypadku ekspozycji na kilka nagród naturalnych<sup>70,86</sup>. CeL, z kolei ma dobrze opisaną rolę w przetwarzaniu informacji o różnych bodźcach awersyjnych<sup>64,70,86</sup>. W rozprawie opisano, że słodka woda angażuje specyficznym neurony CeM, ale nie CeL. Jest to zgodne z wynikami Kim i wsp., *Neuron*, (2017) oraz Knapskiej i wsp., *Psychiol. Rev.*, (2007), ale istnieją jednak doniesienia, gdzie pokazano też zaangażowanie CeL w przetwarzanie informacji o nagrodach pokarmowych<sup>64,70,86</sup>. Warto jednak zaznaczyć, że w przypadku niektórych badań opisanych w literaturze, taka nagroda była dostarczana zwierzętom poddawanych wcześniejszym restrykcjom. Restrykcje pokarmowe lub wodne są procedurami bardzo stresującymi dla zwierząt przyzwyczajonych do dostępu do wody i pożywienia *ad libitum*. By zminimalizować awersyjny aspekt całej procedury, podczas opisanych w rozprawie badań, myszy nie były poddane restrykcji wodnej. Jest to jeden ze sposobów zalecanych do rozgraniczenia procedur ekspozycji na bodźce apetytywne i awersyjne na zwierzętach. Dbanie o warunki eksperymentalne i stan zwierzęcia są kluczowe w badaniu roli CeM i CeL, które są zaangażowane w przetwarzanie różnych emocji i warunki eksperymentalne mogą wytłumaczyć tę rozbieżność w doniesieniach na temat zaangażowania podjednostek CeA w przetwarzaniu nagród naturalnych<sup>218</sup>.



Zaangażowanie neuronów CeL pokazano również w przypadku niektórych nagród farmakologicznych, np. alkoholu etylowego angażującego neurony PKC- $\delta$  w CeL <sup>219,220</sup>. Wyniki opisane w rozprawie wskazują, że inna nagroda farmakologiczna, kokaina, aktywuje obie części CeA. Wiadomo, że substancje psychoaktywne mają jednocześnie zarówno pozytywną, jak i awersyjną wartość dla zwierząt emocje u zwierząt <sup>15</sup>. Dlatego też zrozumiałym jest, że nagrody farmakologiczne mogą jednocześnie angażować szlaki neuronalne przetwarzające takie emocje. Wywołane kokainą zmiany plastyczne w CeL skutkowały zmniejszoną aktywnością spontaniczną neuronów CeL. W związku z tym, że CeL projektuje do CeM, jak i do dalszych struktur w mózgu, możliwym jest, że ta zmniejszona aktywność ogranicza hamowanie podrzędnych do CeL struktur <sup>41</sup>. W obrębie CeL, obok neuronów projektujących, znajdują się jednak również interneurony lokalnie hamujące sąsiednie komórki <sup>221</sup>. Dlatego też nie można wykluczyć, że wywołane LTD skutkowało zwiększoną aktywnością neuronów hamujących, projektujących z CeL.

#### **5.4. Manipulowanie aktywnością przyśrodkowej części jądra środkowego ciała migdałowatego zmienia odpowiedź myszy na nagrody**

Po stwierdzeniu, że ekspozycja na cukier, jak i zastrzyki z kokainy wywołują zmiany plastyczne w CeA, postanowiono sprawdzić jak struktura ta przyczynia się do odpowiedzi behawioralnej myszy na te nagrody. W badaniach tych, iniekcje wektorów wirusowych kodujących białka DREADD podano do CeA, gdzie obecność tych receptorów została w znacznej mierze ograniczona do CeM. Specyficzność obecności DREADD do obszaru CeM została prawdopodobnie spowodowana lokalizacją projekcji stymulujących z BLA do CeA, które ograniczyły rozejście się w tkance zawiesiny wirusa. Podobne preferencyjne rozejście się wirusa do obszaru CeM było już wcześniej zaobserwowane u szczurów <sup>69</sup>. Zarówno w cytowanym artykule, jak i w rozprawie, umożliwiło to specyficzne manipulacje aktywnością tylko jednej części CeA.

W rozprawie opisano, że chemogenetyczna stymulacja CeM początkowo ograniczała spożycie słodkiej wody przez myszy, jednak w kolejnych dniach ten efekt zanikał. Całkowite zablokowanie preferencji zwierzęcia do słodkiej wody zaobserwowano przy chemogenetycznym hamowaniu CeM. W eksperymentach innych badaczy również zauważono, że chemogenetyczna stymulacja neuronów CeM tylko częściowo zaburza przyjmowanie nagrody pokarmowej <sup>69</sup>. W przypadku głodzonych szczurów, chemogenetyczna

stymulacja neuronów CeM początkowo (w pierwszej godzinie) zmniejsza pobór pokarmu przez zwierzę ale gdy było ono w klatce dłuższy czas, to ponownie sięgało po pokarm<sup>69</sup>. Jednakże, nieco innych obserwacji dokonali badacze w przypadku komórkowo-specyficznych manipulacji neuronami wrażliwymi na serotoninę, Htr2a-pozytywnymi, które obecne są głównie w CeM<sup>87</sup>. Neurony te są aktywne gdy zwierzę głoduje i zwiększanie ich aktywności stymulowało konsumpcję pokarmu przez mysz, a hamowanie aktywności zmniejszało ją<sup>222</sup>. Zauważono również, że hamowanie neuronów somatostatynowych, ale już nie CRF+, w CeA blokuje motywację zwierzęcia do uzyskania nagrody pokarmowej<sup>223</sup>. Wyniki literaturowe oraz przedstawione w rozprawie dowody świadczą o aktywnym udziale CeM w regulacji spożywania nagród pokarmowych. Hamowanie całego mikroobwodu neuronów tej struktury prowadzi do redukcji spożycia pokarmu. Należy jednak pamiętać, że poszczególne komórki CeM mogą pełnić zróżnicowane funkcje w przetwarzaniu informacji o tych bodźcach.

W niniejszej rozprawie zaobserwowano również przejściowy wpływ manipulacji CeM na odpowiedź lokomotoryczną zwierzęcia po podaniu kokainy. Chemogenetyczne stymulowanie CeM spowodowało, że w pierwszych dniach eksperymentu kokaina nie zwiększyła aktywności lokomotorycznej zwierzęcia. Jednak efekt ten był przejściowy, a w kolejnych dniach podawania kokainy, zwierzę wykazywało podobną aktywność lokomotoryczną do zwierząt bez stymulacji CeM. Hamowanie aktywności komórek CeM pozostało bez wpływu na ten efekt. Inni badacze również zauważyli, że manipulacje CeA mogą wpływać na niektóre aspekty związane z odpowiedzią zwierzęcia na kokainę. Badania te nie różnicowały poszczególnych części CeA, ale zauważono w nich, iż optogenetyczne stymulowanie tej struktury zwiększa motywację szczurów do poboru kokainy, a hamowanie jej zmniejsza samo-podawanie narkotyku<sup>224</sup>. Ponadto, zaburzenie ścieżek sygnałowych procesów plastycznych w CeA zmniejszało negatywne skutki odstawienia kokainy u szczurów<sup>225</sup>. Razem, wyniki te sugerują, że CeM jest zaangażowane w przetwarzanie niektórych aspektów związanych z nagrodami farmakologicznymi. Jednakże, istotne może być wpływanie na neurony CeA na określonych etapach uzależnienia, co może mieć pewne terapeutyczne efekty.

W eksperymentach opisanych w pracy ekspresja genów wirusa była ograniczona w dużej mierze do CeM i dlatego nie badano skutków manipulacji CeL na zachowania związane z nagrodami. Inni badacze pokazali jednak, że CeL, również może być istotne w regulowaniu zachowań zwierząt. W przypadku tych badań, ekspresja genów kodujących DREADD lub światłoczułych opsyn uwarunkowana była translacją białek charakterystycznych tylko dla tego jądra. W zależności od badanej populacji neuronów, efekty manipulacji CeL

mogą być różne i np. optogenetyczne wyciszenie aktywności komórek PKC- $\delta$  w CeL zwiększało pobór pokarmu przez zwierzę, a hamowanie neuronów Pnoc+ zmniejszało spożycie pokarmu <sup>221,222,226</sup>. Zauważono też, że blokowanie neuronów PKC- $\delta$  w CeL hamuje głód narkotykowy podczas odstawienia od metamfetaminy i alkoholu <sup>219,227,228</sup>.

W niniejszej rozprawie opisano także, że CeM pośredniczy również w niektórych fizjologicznych odpowiedziach myszy poddanych kokainie, ponieważ miały one ograniczoną defekację, co jest efektem obserwowanym u myszy eksponowanych na kokainę <sup>185</sup>. Efekt ten był szczególnie widoczny w przypadku stymulacji CeM, gdzie zarówno myszy dostające zastrzyki z soli fizjologicznej, jak i kokainy wydalaly mniej odchodów. W przypadku hamowania CeM, efekt ten był niejasny, ponieważ liczba odchodów w klatce była niższa w grupie Kokaina 1 d (w dniach, w których mysz dostawała tylko sól) niż w grupie kontrolnej. Niespójność ta może być związana z tym, że ciało migdałowe składa się z różnych typów komórek, w tym interneuronów lokalnie regulujących aktywność sąsiednich neuronów. Niespecyficzna manipulacja CeM może prowadzić więc do pobudzenia różnych szlaków w mózgu, ale także do samo-hamowania tego jądra. Dlatego też bardziej odpowiednim wydaje się więc manipulacja wyszczególnionymi populacjami neuronów i to na takich wyspecjalizowanych populacjach (m.in. DRD1+ i DRD2+) skupione są kolejne badania prowadzone w laboratorium.

W badaniach opisanych w rozprawie doktorskiej, do aktywacji DREADD użyto CNO, odnośnie skuteczności którego były w ostatnich latach kontrowersje stawiające w wątpliwość biodostępność CNO u szczurów <sup>229</sup>. W eksperymentach opisanych w rozprawie zauważono jednak, że po jego aplikacji, w przeciągu kilkunastu minut zmodyfikowano zachowanie zwierząt z ekspresją DREADD. Jednocześnie podanie CNO myszy nie posiadającej DREADD nie wpłynęło na spożycie przez nią słodkiej wody ani na jej aktywność lokomotoryczną. Ponadto, pokazano, że aplikacja CNO na neurony z DREADD zmienia ich potencjał błonowy oraz aktywność spontaniczną. Wyniki te oraz nowsze doniesienia literaturowe pozwalają sądzić, że CNO jest odpowiednią cząsteczką do aktywacji DREADD w zastosowanych modelach badawczych <sup>182,221,222</sup>. Jednakże, warto rozważyć w podobnych badaniach zastosowanie innych cząsteczek, jak np. cząsteczki c21 o większej biodostępności w mózgu <sup>230</sup>.

## 5.5. Neurony DRD1- i DRD2-pozytywne w jądrze środkowym ciała migdałowatego w mózgu myszy

### 5.5.1. Rozmieszczenie przestrzenne neuronów DRD1- i DRD2-pozytywnych w jądrze środkowym ciała migdałowatego w mózgu myszy

CeA, podobnie jak pozostałe części ciała migdałowatego, charakteryzuje się dużą różnorodnością komórek, których aktywność jest regulowana przez szereg neuroprzekaźników i neurohormonów<sup>70</sup>. Wrażliwymi na te sygnały są zazwyczaj tylko wyspecjalizowane neurony, które mają na swojej powierzchni odpowiednie receptory. W niniejszej rozprawie doktorskiej opisano wyniki badań nad rozmieszczeniem przestrzennym dwóch takich populacji neuronów wrażliwych na Da w CeA. Określono, że w CeL występują tylko komórki DRD2+, natomiast w CeM obecne są zarówno neurony DRD1+, jak i DRD2+. Te subpopulacje nie pokrywały się ze sobą, a ich charakterystyczne rozmieszczenie w obrębie CeA pozwala na traktowanie ich jako pomocy w rozróżnianiu CeM i CeL.

Obecność komórek wrażliwych na Da pokazano już w poprzednich badaniach, gdzie do określenia przestrzennego tych komórek użyto metod sekwencjonowania RNA w pojedynczych komórkach (ang. *singe-cell RNA-sequencing*). W połączeniu z mikroskopią ekspansyjną, gdzie fizycznie zwiększa się rozmiar badanej tkanki, wyróżniono 22 klasy komórek w ciele migdałowatym w różnych jego obszarach<sup>74</sup>. W badaniu tym wyszczególniono również komórki wrażliwe na Da, w których obecne były zarówno DRD1, jak i DRD2. Określono, że w CeA neurony wrażliwe na Da charakteryzują się obecnością tylko jednego z tych receptorów. Komórki posiadające DRD1 przypisano do CeM oraz ITC, a komórki z DRD2 do CeC i CeM<sup>74</sup>. Komórki wrażliwe na Da w CeA badano również techniką mierzącą poziom mRNA (ang. *translating ribosome affinity purification*) w neuronach<sup>231</sup>. W badaniach tych zauważono, że neurony DRD1+ i DRD2+ tworzą dwie nienakładające się na siebie populacje i neurony DRD1+ przypisano do ITC, CeM i CeL, a DRD2+ do CeC, CeM i CeL<sup>231</sup>. Występowanie neuronów DRD1+ i DRD2+ w CeA opisano u również szczurów, co sugeruje, że ich występowanie w ciele migdałowatym jest konserwatywne ewolucyjnie<sup>219</sup>. Obecność komórek DRD2+ stwierdzono w końcu w CeA myszy DRD2-GFP, gdzie metodami immunohistochemicznymi przyporządkowano je do CeM i CeL<sup>232</sup>.

Opisane w pracy przyporządkowanie neuronów wrażliwych na Da do CeM i CeL różni się od tych zaproponowanych w przytoczonych powyżej pracach. We wspomnianych

artykułach, z uwagi na zastosowane techniki, do rozróżnienia poszczególnych części CeA posłużono się jedynie nałożonymi na zdjęcia skrawków granicami struktur z atlasu mózgu myszy. W rozprawie doktorskiej z kolei, dodatkowo posłużono się też anatomicznymi punktami orientacyjnymi (wiązka projekcji z BLA do CeA, otoczka BLA), co pozwoliło na dokładniejsze określenie granice CeM i CeL. Obserwacje zawarte w pracy były najbliższe tym, gdzie rozmieszczenie komórek DRD2+ badano na skrawkach myszy DRD2-GFP <sup>232</sup>. W cytowanej pracy nie badano jednak rozmieszczenia neuronów DRD1+.

W rozprawie doktorskiej rozmieszczenie komórek DRD1+ i DRD2+ opisano jedynie dzięki białkom fluorescencyjnym w linii DRD1+TdTomato/DRD2-GFP. Warto jednak zaznaczyć, że czasami ekspresja transgenów jest różna od ekspresji genów endogennych, co powoduje, że ich produkty mogą nieidealnie znakować badane komórki <sup>233</sup>. Inną metodą, która również pozwalałaby zweryfikować obecność receptorów DRD1 i DRD2 w CeA mógłby być patch-seq, w którym po eksperymentach patch clamp pobiera się jądro komórkowe nagrywanego neuronu do późniejszego sekwencjonowania <sup>234</sup>. Metoda ta pozwala na późniejsze zbadanie profilu RNA nagranej komórki z dużą dokładnością przestrzenną.

### **5.5.2. Plastyczność neuronów DRD1- i DRD2-pozytywnych w jądrze środkowym ciała migdałowatego**

Poszczególne typy neuronów w obrębie CeA mogą mieć zróżnicowane funkcje w wyrażaniu poszczególnych emocji i ulegać różnym adaptacjom w procesie uczenia się <sup>219</sup>. Dlatego też, po określeniu, że CeM jest zaangażowane w przetwarzanie zarówno informacji o cukrze, jak i o kokainie, zbadano jakim modyfikacjom podlegają neurony DRD2+ i DRD1+ w jego obrębie. Zauważono, że neurony DRD2+ i DRD1+ uległy odmiennym zmianom plastycznym po ekspozycji myszy na badane nagrody naturalne i farmakologiczne. Stwierdzono zwiększoną częstotliwość sEPSCs komórek DRD1+ i zmniejszoną częstotliwość sEPSCs DRD2+ po ekspozycji myszy na kokainę. W przypadku ekspozycji na cukier, to DRD2+ zwiększyły swoją częstotliwość, a DRD1+ zmniejszyły ją. Ponadto, pomimo zmian zaobserwowanych w częstotliwości sEPSCs w komórkach DRD1+ i w DRD2+, nie zaobserwowano zmian w amplitudzie sEPSCs ani w gęstości kolców dendrytycznych tych komórek. Komórki wrażliwe na Da w CeM stanowiły mniej niż połowę wszystkich komórek c-Fos+ obecnych po ekspozycjach na badane nagrody.

Uzyskane wyniki świadczą o tym, że neurony wrażliwe na Da są odmiennie regulowane podczas ekspozycji myszy na różne rodzaje nagród. Sugerują również, że niektóre poprzednie obserwacje poczynione na poziomie całego CeM i opisane w niniejszej rozprawie, mogą być wypadkową różnych adaptacji poszczególnych typów neuronów. Neurony wrażliwe na Da w CeM nie są jednak jedynymi, które ulegają aktywacji po ekspozycji zwierzęcia na nagrody i oprócz nich aktywne są też inne typy neuronów, które pozostały niezidentyfikowane podczas eksperymentów opisanych w rozprawie.

Neurony wrażliwe na Da w CeM są ciągle słabo poznane i jedyne doniesienia na ich temat to te, w których określono, że neurony DRD2+ są zaangażowane w zachowania obronne myszy i są aktywne podczas warunkowania strachu, a ich aktywacja wywołuje efekt przeciwbólowy<sup>231,235</sup>. Rola komórek z DRD1 i DRD2 w przetwarzaniu nagród została za to bardzo dobrze poznana w przypadku ACB, gdzie wszystkie neurony posiadają jeden z dwóch typów receptorów dopaminowych. Pokazano, że w ACB cukier oraz kokaina angażują obie populacje tych neuronów, oraz że wywołują podobne zmiany plastyczne w neuronach DRD1+ i DRD2+<sup>48,183</sup>. Neurony DRD1+ w tej strukturze odpowiadają za motywację do pozyskaniu tych nagród, podczas gdy DRD2+ są zaangażowane podczas odstawienia od nich, lub gdy ich spożycie jest przerywane<sup>47,183,236</sup>. W rozprawie doktorskiej określono, że w CeM, w odróżnieniu do ACB, komórki DRD1+ i DRD2+ nie były jedynymi typami komórek, które brały udział w przetwarzaniu nagród. Jednocześnie, były one odmiennie regulowane na skutek ekspozycji na nagrody naturalne i farmakologiczne, co sugeruje, że mogą różnie przyczyniać się do przetwarzania badanych nagród.

Warto jednak zaznaczyć, że w komórkach DRD1+ i DRD2+, pomimo zmian w częstotliwości sEPSCs oraz zwiększonego poziomu c-Fos po ekspozycji myszy na nagrody, nie zaobserwowano zmian w amplitudzie sEPSCs ani w gęstości kolców dendrytycznych. Jest to zaskakujące, ponieważ zwykle zwiększoną częstotliwość sEPSC tłumaczy się większą liczbą kolców dendrytycznych (i dostępnych na nich synaps), a amplitudę koreluje się z ich wielkością (powiązanych z liczbą receptorów). Zmiany w liczbie kolców dendrytycznych mogą być jednak bardzo dynamiczne, a synaptogenezie może towarzyszyć eliminacja kolców sąsiednich. Odzwierciedla to lokalną regulację siły synaps w obrębie drzewka dendrytycznego i jest prawdopodobnie związane z ograniczoną zdolnością do przesyłania informacji w obrębie jednego dendrytu<sup>130</sup>. Ponadto, za zmienioną częstotliwość sEPSCs na neuronach DRD1+ i DRD2+ mogą stać zmiany jakości kolców, m.in. ich wielkości. Niestety, ze względu na dość niską jakość zdjęć grubych preparatów, podczas badania nie było możliwe zanalizowanie

wielkości ani kształtu kolców dendrytycznych. W końcu, część zobrazowanych kolców mogło tworzyć milczące synapsy i w takim przypadku nie byłyby one widoczne w analizie sEPSCs. Należy zaznaczyć jednak, że w mózgu milczące synapsy i tworzone przez nie kolce dendrytyczne występują przejściowo i reprezentują proces plastyczny, w którym synapsa ulega przebudowaniu, m.in. poprzez wbudowanie lub eliminację różnych receptorów dla glutaminianu <sup>165</sup>. Dlatego do uchwycenia dynamiki rozwoju kolców dendrytycznych w tych neuronach najlepiej należałoby wykonać więcej badań w różnych punktach czasowych, lub przeprowadzić ich obrazowanie *in vivo* <sup>237</sup>.

## 6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Przedłożona rozprawa opisuje efekty wywołane podaniem myszy jednej z dwóch rodzajów nagród – słodkiej wody lub kokainy, co zostało zbadane na poziomie całego mózgu, jego pojedynczej struktury (CeA), oraz wyselekcjonowanych populacji neuronów CeA – neuronów DRD1+ i DRD2+ (Ryc.51A).

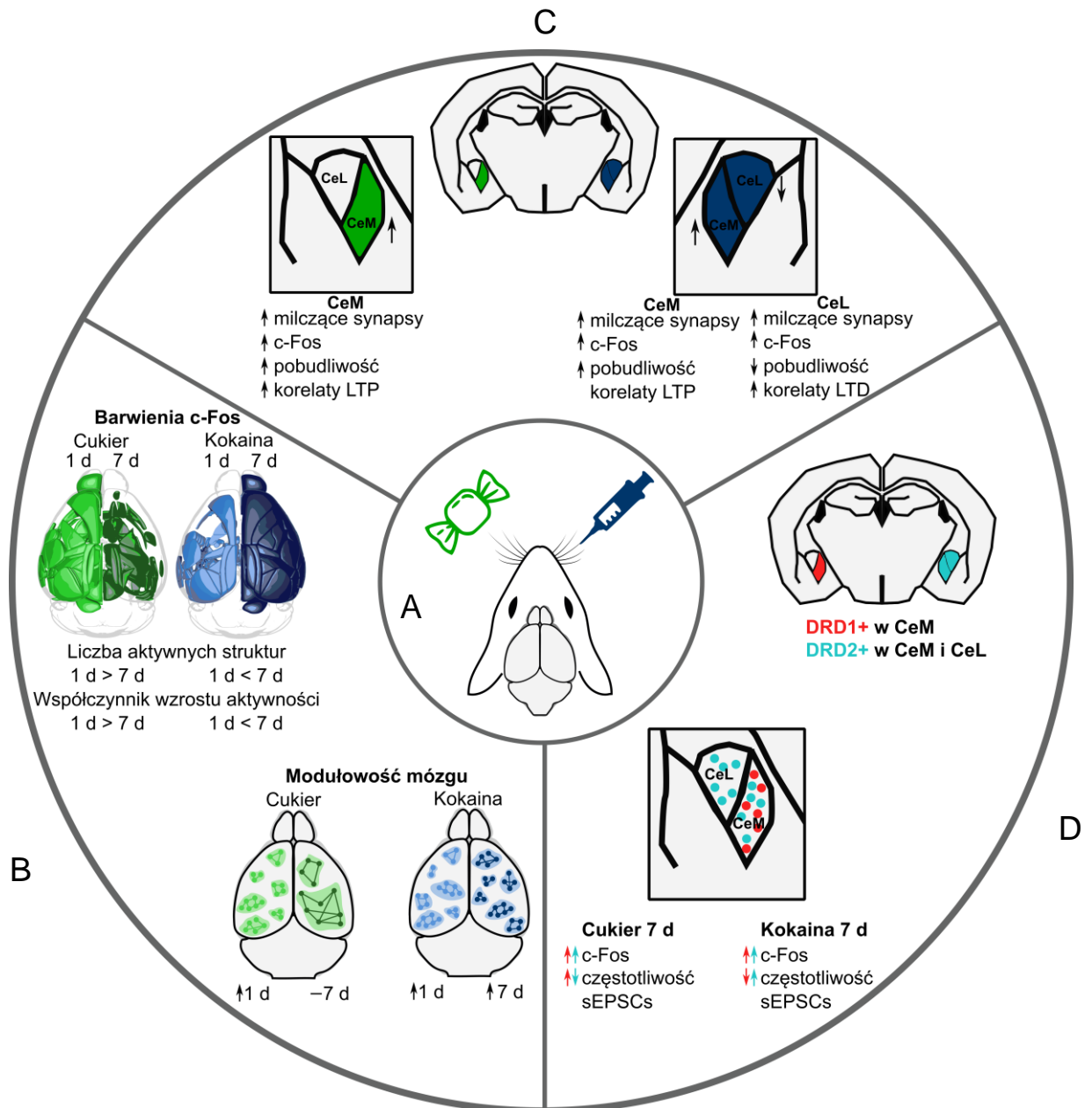
Przedstawione w pracy wyniki wskazują, że ekspozycja zarówno na cukier, jak i na kokainę powoduje rozległy wzrost poziomu c-Fos w różnych częściach mózgu (Ryc. 51B). Wyniki te sugerują, że informacje o cukrze i kokainie są przetwarzane w sposób rozproszony i że dotychczasowy skład układu nagrody w mózgu powinien zostać uzupełniony o wiele nowych struktur. Aktywacja rozległej sieci struktur po ekspozycjach na słodką wodę lub kokainę została odzwierciedlona jako zmieniona modułowość mózgu myszy. Modułowość ta jest przejściowa w przypadku ekspozycji na słodką wodę, ale nie na kokainę, w przypadku której siedmiokrotne jej podanie angażowało więcej struktur niż jednokrotne. Można wnioskować, że farmakologiczne własności kokainy wpływają na to, że jest ona nagrodą „lepszą od oczekiwanej”, która wymaga czasu, by mózg mógł się do niej zaadaptować.

Ponadto, w pracy wykazano, że zarówno kokaina, jak i cukier angażują jądro środkowe ciała migdałowatego, oraz że manipulowanie jego aktywnością zaburza spożycie słodkiej wody oraz opóźnia rozwój sensytyzacji lokomotorycznej po podaniu kokainy (Ryc. 51C). Zbadane nagrody wywołują podobne zmiany plastyczne w przyśrodkowej części środkowego jądra ciała migdałowatego polegające na wzmocnieniu połączeń glutaminianergicznych w neuronach jego obrębu. Kokaina, w przeciwieństwie do cukru, wywołuje wzrost poziomu Arc w neuronach oraz angażuje również część boczną środkowego jądra ciała migdałowatego, gdzie wywołuje osłabienie pobudzających prądów postsynaptycznych. Wyniki te świadczą o tym, że nagrody naturalne i farmakologiczne nie mogą być stosowane zamiennie do określania działania struktur układu nagrody oraz do określania ich wpływu na zachowania zwierzęcia.

W pracy stwierdzono obecność neuronów wrażliwych na Da w jądrze środkowym ciała migdałowatego i określono, że jego boczna część niemal w połowie składa się z neuronów z receptorami DRD2 (Ryc. 51D). W części przyśrodkowej odkryto populacje neuronów, które miały receptory DRD1 lub DRD2. Neuronów te ulegały odmiennym zmianom plastycznym po ekspozycji myszy na cukier oraz po zastrzykach z kokainy, ale nie były to jedyne neuronów ulegające aktywacji po ekspozycji na te nagrody. Wyniki te dalej wskazują na odrębność



badanych nagród oraz na to, że obraz przetwarzania informacji o cukrze i kokainie przez neurony jądra środkowego jest wciąż niepełny i wymaga uwzględnienia roli różnych populacji neuronów.



**Ryc. 51: Podsumowanie najważniejszych wyników opisanych w rozprawie. A)** Mysz była ekspozowana na nagrodę naturalną (cukier; kolor zielony) lub farmakologiczną (kokaina; kolor niebieski). **B)** Podsumowanie wyników badań nad poziomem c-Fos w całym mózgu. Po jednorazowej ekspozycji na cukier stwierdzono większą liczbę aktywnych struktur niż po siedmiokrotnej ekspozycji. Po jednorazowym dostępie do słodkiej wody zaobserwowano również ogólnie większą liczbę komórek c-Fos+ w tych strukturach, niż po wielokrotnych ekspozycjach na tę nagrodę. W przypadku kokainy to zastrzyki siedmiokrotne spowodowały większe efekty niż jeden zastrzyk. Ekspozycja na kokainę, a także jednorazowe podanie słodkiej wody wiązały się ze zwiększoną modułowścią mózgu. **C)** Podsumowanie wyników

badan nad plastycznoscia w CeA. Nagroda naturalna spowodowala zmiany plastyczne w CeM w wyniku dlugotrwalogo wzmacnienia synaptycznego (LTP). Nagroda farmakologiczna rowniez zaindukowala LTP w neuronach CeM, ale jednoczesnie LTD w CeL.

**D)** Podsumowanie wynikow badan nad neuronami wzraliwymi na dopamine w CeA. W CeM myszy obecne sa zarowno neurony DRD1+, jak i DRD2+, a w CeL wystepuja tylko DRD2+. Zarowno ekspozycja na cukier, jak i na kokaine indukują zwikszony poziom c-Fos w neuronach wzraliwych na dopamine, ale nagrody te maja przeciwstawnny wplyw na czestotliwosc sEPSCs neuronow DRD1+ i DRD2+ w CeM.

## 7. BIBLIOGRAFIA

1. Lang PJ. (1995). The emotion probe: Studies of motivation and attention. *Am Psychol.* 50(5):372-385. doi: <https://doi.org/10.1037/0003-066X.50.5.372>
2. Tye KM. (2018). Neural circuit motifs in valence processing. *Neuron.*100(2):436-452. doi:10.1016/j.neuron.2018.10.001
3. Moss MM, Zátka-Haas P, Harris KD, Carandini M, Lak A. (2021). Dopamine axons in dorsal striatum encode contralateral visual stimuli and choices. *J Neurosci.* 41(34):7197-7205. doi:10.1523/JNEUROSCI.0490-21.2021
4. Fonseca E, de Lafuente V, Simon SA, Gutierrez R. (2018). Sucrose intensity coding and decision-making in rat gustatory cortices. *eLife.* 7:e41152. doi:10.7554/eLife.41152
5. Ren X, Ferreira JG, Zhou L, Shammah-Lagnado SJ, Yeckel CW, de Araujo IE. (2010). Nutrient selection in the absence of taste receptor signaling. *J Neurosci.* 30(23):8012-8023. doi:10.1523/JNEUROSCI.5749-09.2010
6. Jin H, Fishman ZH, Ye M, Wang L, Zuker CS. (2021). Top-down control of sweet and bitter taste in the mammalian brain. *Cell.* 184(1):257-271.e16. doi:10.1016/j.cell.2020.12.014
7. Bijoch Ł, Pękała M, Beroun A. (2021). Molekularne podstawy działania wybranych substancji psychoaktywnych. *Postępy Biochem.* 67(2):141-156. doi:10.18388/pb.2021\_376
8. Nestler EJ. (2001). Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nat Rev Neurosci.* 2(2):119-128. doi:10.1038/35053570
9. Tzschentke TM. (2007). Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. *Addict Biol.* 12(3-4):227-462. doi:10.1111/j.1369-1600.2007.00070.x
10. Weeks JR. (1962). Experimental morphine addiction: method for automatic intravenous injections in unrestrained rats. *Sci New Ser.* 138(3537):143-144.
11. IMAGEN Consortium, Mielenz D, Reichel M, Jia T, Quinlan EB, Zilske D, Huber SE. (2018). EFhd2/Swiprosin-1 is a common genetic determinant for sensation-seeking/low anxiety and alcohol addiction. *Mol Psychiatry.* 23(5):1303-1319. doi:10.1038/mp.2017.63
12. Sørensen G, Jensen M, Weikop P, Dencker D, Christiansen SH, Loland CJ, Bengtson CH, Peterson JH, Fink-Jensen J, Wortwein G, Woldbye PD. (2012). Neuropeptide Y Y5 receptor antagonism attenuates cocaine-induced effects in mice. *Psychopharmacology (Berl).* 222(4):565-577. doi:10.1007/s00213-012-2651-y
13. Hu XT, Ford K, White FJ. (2005). Repeated cocaine administration decreases calcineurin (PP2B) but enhances DARPP-32 modulation of sodium currents in rat nucleus accumbens neurons. *Neuropsychopharmacology.* 30(5):916-926. doi:10.1038/sj.npp.1300654
14. Smith LN, Penrod RD, Taniguchi M, Cowan CW. (2016). Assessment of cocaine-induced behavioral sensitization and conditioned place preference in mice. *J Vis Exp.* 108:53107. doi:10.3791/53107
15. Ettenberg A, Raven MA, Danluck DA, Necessary BD. (1999). Evidence for opponent-process actions of intravenous cocaine. *Pharmacol Biochem Behav.* 64(3):507-512. doi:10.1016/S0091-3057(99)00109-4
16. De Luca MT, Badiani A. (2011). Ketamine self-administration in the rat: evidence for a critical role of setting. *Psychopharmacology (Berl).* 214(2):549-556. doi:10.1007/s00213-010-2062-x
17. Bates MLS, Trujillo KA. (2021). Use and abuse of dissociative and psychedelic drugs in adolescence. *Pharmacol Biochem Behav.* 203:173129. doi:10.1016/j.pbb.2021.173129
18. Goldstein RA, DesLauriers C, Burda AM. (2009). Cocaine: history, social implications, and toxicity—a review. *Dis Mon.* 55(1):6-38. doi:10.1016/j.disamonth.2008.10.002

19. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. (2020). European drug report 2020: key issues. doi: 10.2810/759563
20. Blanchard R, Kaawaloa J, Hebert M, Blanchard D. (1999). Cocaine produces panic-like flight responses in mice in the mouse defense test battery. *Pharmacol Biochem Behav.* 64(3):523-528. doi:10.1016/S0091-3057(99)00126-4
21. Harraz MM, Guha P, Kang IG, Semenza ER, Malla AP, Song YJ, Reilly L, Treisman I, Cortes P, Coggiano MA, Veeravalli V, Rais R, Tanda G, Snyder SH. (2021). Cocaine-induced locomotor stimulation involves autophagic degradation of the dopamine transporter. *Mol Psychiatry.* 26(2):370-382. doi:10.1038/s41380-020-00978-y
22. Wise RA, Bozarth MA. (1985). Brain mechanisms of drug reward and euphoria. *Psychiatr Med.* 3(4):445-460.
23. Keiflin R, Pribut HJ, Shah NB, Janak PH. (2019). Ventral tegmental dopamine neurons Participate in reward identity predictions. *Curr Biol.* 29(1):93-103.e3. doi:10.1016/j.cub.2018.11.050
24. Ilango A, Kesner AJ, Keller KL, Stuber GD, Bonci A, Ikemoto S. (2014). Similar roles of substantia nigra and ventral tegmental dopamine neurons in reward and aversion. *J Neurosci.* 34(3):817-822. doi:10.1523/JNEUROSCI.1703-13.2014
25. Ljungberg T, Apicella P, Schultz W. (1992). Responses of monkey dopamine neurons during learning of behavioral reactions. *J Neurophysiol.* 67(1):145-163. doi:10.1152/jn.1992.67.1.145
26. Schultz W, Apicella P, Ljungberg T. (1993). Responses of monkey dopamine neurons to reward and conditioned stimuli during successive steps of learning a delayed response task. *J Neurosci.* 13(3):900-913. doi:10.1523/JNEUROSCI.13-03-00900.1993
27. Schultz W, Dayan P, Montague PR. (1997). A neural substrate of prediction and reward. *Science.* 275(5306):1593-1599. doi: 10.1126/science.275.5306.159
28. Howe MW, Tierney PL, Sandberg SG, Phillips PEM, Graybiel AM. (2013). Prolonged dopamine signalling in striatum signals proximity and value of distant rewards. *Nature.* 500(7464):575-579. doi:10.1038/nature12475
29. Neve KA, Seamans JK, Trantham-Davidson H. (2004). Dopamine receptor signaling. *J Recept Signal Transduct.* 24(3):165-205. doi:10.1081/RRS-200029981
30. Robinson DL, Venton BJ, Heien MLAV, Wightman RM. (2003). Detecting subsecond dopamine release with fast-scan cyclic voltammetry in vivo. *Clin Chem.* 49(10):1763-1773. doi:10.1373/49.10.1763
31. Sun F, Zeng J, Jing M, Zhou J, Feng J, Owen SF, Luo Y, Li F, Wang H, Yamaguchi T, Yong Z, Gao Y, Peng W, Wang L, Zhang S, Du J, Lin D, Xu M, Kreitzer AC, Cui G, Li Y. (2018). A genetically encoded fluorescent sensor enables rapid and specific detection of dopamine in flies, fish, and mice. *Cell.* 174(2):481-496.e19. doi:10.1016/j.cell.2018.06.042
32. Markowitz JE, Gillis WF, Jay M, Wood J, Harris RW, Cieszkowski R, Scott R, Brann D, Koveal D, Kula T, Weinreb C, Osman MAM, Pinto SR, Uchida N, Lindermann SW, Sabatini BL, Datta SR. (2023). Spontaneous behaviour is structured by reinforcement without explicit reward. *Nature.* 614(7946):108-117. doi:10.1038/s41586-022-05611-2
33. Kutlu MG, Zachry JE, Melugin PR, Tat J, Cajigas S, Isiktas AU, Patel DD, Siciliano CA, Schoenbaum G, Sharpe MJ, Calipari ES. (2022). Dopamine signaling in the nucleus accumbens core mediates latent inhibition. *Nat Neurosci.* 25(8):1071-1081. doi:10.1038/s41593-022-01126-1
34. Di Chiara G, Imperato A. (1988). Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci.* 85(14):5274-5278. doi:10.1073/pnas.85.14.5274
35. Wassum KM. (2022). Amygdala-cortical collaboration in reward learning and decision making. *eLife.* 11:e80926. doi:10.7554/eLife.80926
36. Lüscher C. (2016). The emergence of a circuit model for addiction. *Annu Rev Neurosci.* 39(1):257-276. doi:10.1146/annurev-neuro-070815-013920

37. Stuber GD, Wightman RM, Carelli RM. (2005). Extinction of cocaine self-administration Reveals functionally and temporally distinct dopaminergic signals in the nucleus accumbens. *Neuron*. 46(4):661-669. doi:10.1016/j.neuron.2005.04.036
38. Keiflin R, Janak PH. (2015). Dopamine prediction errors in reward learning and addiction: from theory to neural circuitry. *Neuron*. 88(2):247-263. doi:10.1016/j.neuron.2015.08.037
39. Roberts DCS, Corcoran ME, Fibiger HC. (1977). On the role of ascending catecholaminergic systems in intravenous self-administration of cocaine. *Pharmacol Biochem Behav*. 6(6):615-620. doi:10.1016/0091-3057(77)90084-3
40. Giros B, Jaber M, Jones SR, Wightman RM, Caron MG. (1996). Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature*. 379(6566): 606-612. doi:10.1038/379606a0
41. Zhang XF, Hu XT, White FJ. (1998). Whole-cell plasticity in cocaine withdrawal: reduced sodium currents in nucleus accumbens neurons. *J Neurosci*. 18(1):488-498. doi:10.1523/JNEUROSCI.18-01-00488.1998
42. Tsuboi D, Otsuka T, Shimomura T, Faruk MO, Yamahashi Y, Amano M, Funahashi Y, Kuroda K, Nishioka T, Kobayashi K, Sano H, Nagai T, Yamada K, Tzingounis AV, Nambu A, Kubo Y, Kawaguchi Y, Kaibuchi K. (2022). Dopamine drives neuronal excitability via KCNQ channel phosphorylation for reward behavior. *Cell Rep*. 40(10):111309. doi:10.1016/j.celrep.2022.111309
43. Pollack A. (2004). Coactivation of D1 and D2 dopamine receptors: in marriage, a case of his, hers, and theirs. *Sci STKE*. 2004(255). doi:10.1126/stke.2552004pe50
44. Wei X, Ma T, Cheng Y, Huang CCY, Wang X, Lu J, Wang J. (2018). Dopamine D1 or D2 receptor-expressing neurons in the central nervous system: Dopamine D1 and D2 receptors. *Addict Biol*. 23(2):569-584. doi:10.1111/adb.12512
45. Gangarossa G, Castell L, Castro L, Tarot L, Veyrunes F, Vincent P, Bertaso F, Valijent E. (2019). Contrasting patterns of ERK activation in the tail of the striatum in response to aversive and rewarding signals. *J Neurochem*. 151(2):204-226. doi:10.1111/jnc.14804
46. Fuxe K, Jacobsen KX, Höistad M, Tinner B, Jansson A, Staines WA, Agnati LF. (2003). The dopamine D1 receptor-rich main and paracapsular intercalated nerve cell groups of the rat amygdala: relationship to the dopamine innervation. *Neuroscience*. 119(3):733-746. doi:10.1016/S0306-4522(03)00148-9
47. Calipari ES, Bagot RC, Purushothaman I, Davidson TJ, Yorgason JT, Pena CJ, Walker DM, Pirpinias ST, Guise KG, Ramakrishnan C, Deisseroth K, Nestler EJ. (2016). In vivo imaging identifies temporal signature of D1 and D2 medium spiny neurons in cocaine reward. *Proc Natl Acad Sci*. 113(10):2726-2731. doi:10.1073/pnas.1521238113
48. Bijoch Ł, Klos J, Pawłowska M, Wiśniewska J, Legutko D, Szachowicz U, Kaczmarek L, Beroun A. (2023). Whole-brain tracking of cocaine and sugar rewards processing. *Transl Psychiatry*. 13(1):20. doi:10.1038/s41398-023-02318-4
49. Li Y, Kuzhikandathil EV. (2012). Molecular characterization of individual D3 dopamine receptor-expressing cells isolated from multiple brain regions of a novel mouse model. *Brain Struct Funct*. 217(4):809-833. doi:10.1007/s00429-012-0383-8
50. Sokoloff P, Le Foll B. (2017). The dopamine D3 receptor, a quarter century later. Herman J, ed. *Eur J Neurosci*. 45(1):2-19. doi:10.1111/ejn.13390
51. Rondou P, Haegeman G, Van Craenenbroeck K. (2010). The dopamine D4 receptor: biochemical and signalling properties. *Cell Mol Life Sci*. 67(12):1971-1986. doi:10.1007/s00018-010-0293-y
52. Sasamori H, Asakura T, Sugiura C, Bouchekioua Y, Nishitani N, Sato M, Yoshida T, Yamasaki M, Terao A, Watanabe M, Ohmura Y, Yoshioka M. (2022). Behavioral characteristics of dopamine D5 receptor knockout mice. *Sci Rep*. 12(1):6014. doi:10.1038/s41598-022-10013-5
53. Pitkänen A, Jolkkonen E, Kemppainen S. (2000). Anatomic heterogeneity of the rat amygdaloid complex. *Folia Morphol*. 59(1).

54. Knapska E, Radwanska K, Werka T, Kaczmarek L. (2007). Functional internal complexity of amygdala: focus on gene activity mapping after behavioral training and drugs of abuse. *Physiol Rev.* 87(4):1113-1173. doi:10.1152/physrev.00037.2006
55. Medina L, Abellán A, Morales L, Pross A, Metwalli AH, Gonzales-Alonso A, Freixes J, Desfilis E. (2023). Evolution and development of amygdala subdivisions: pallial, subpallial and beyond. *Brain Behav Evol.* 98(1):1-21. doi:10.1159/000527512
56. Roberts GW, Woodhams PL, Plak JM, Crow TJ. (1982). Distribution of neuropeptides in the limbic system of the rat: The amygdaloid complex. *Neuroscience.* 7(1):99-131. doi: [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(82\)90156-7](https://doi.org/10.1016/0306-4522(82)90156-7)
57. Royer S, Martina M, Paré D. (1999). An Inhibitory interface gates impulse traffic between the input and output stations of the amygdala. *J Neurosci.* 19(23):10575-10583. doi:10.1523/JNEUROSCI.19-23-10575.1999
58. Marowsky A, Yanagawa Y, Obata K, Vogt KE. (2005). A specialized subclass of interneurons mediates dopaminergic facilitation of amygdala function. *Neuron.* 48(6):1025-1037. doi:10.1016/j.neuron.2005.10.029
59. McDonald AJ. (1985). Immunohistochemical identification of  $\gamma$ -aminobutyric acid-containing neurons in the rat basolateral amygdala. *Neurosci let.* 53(2): 203-207. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(85\)90186-7](https://doi.org/10.1016/0304-3940(85)90186-7)
60. McDonald AJ. (1998). Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Prog Neurobiol.* 55(3):257-332. doi:10.1016/S0301-0082(98)00003-3
61. Birnie MT, Short AK, de Carvalho GB, Gunn BG, Pham AL, Itoga CA, Xu X, Chen LY, Mahler SV, Chen Y, Baram TZ. (2023). Stress-induced plasticity of a novel CRH GABA projection disrupts reward behaviors. *Nat Com.* 14(1);1088. doi:10.1101/2022.07.01.498504
62. Kim J, Pignatelli M, Xu S, Itohara S, Tonegawa S. (2016). Antagonistic negative and positive neurons of the basolateral amygdala. *Nat Neurosci.* 19(12):1636-1646. doi:10.1038/nn.4414
63. Wang L, Gillis-Smith S, Peng Y, Zhang J, Chen X, Salzman CD, Ryba NJP, Zuker CS. (2018). The coding of valence and identity in the mammalian taste system. *Nature.* 558(7708):127-131. doi:10.1038/s41586-018-0165-4
64. Duvarci S, Pare D. (2014). Amygdala microcircuits controlling learned Fear. *Neuron.* 82(5):966-980. doi:10.1016/j.neuron.2014.04.042
65. Wassum KM, Izquierdo A. (2015). The basolateral amygdala in reward learning and addiction. *Neurosci Biobehav Rev.* 57:271-283. doi:10.1016/j.neubiorev.2015.08.017
66. Gore F, Schwartz EC, Brangers BC, Aladi S, Stujenske JM, Likhik E, Russo MJ, Gordon JA, Salzman CD. (2015). Neural representations of unconditioned stimuli in basolateral amygdala mediate innate and learned responses. *Cell.* 162(1):134-145. doi:10.1016/j.cell.2015.06.027
67. Beyeler A, Namburi P, Glober GF, Simonnet C, Calhoon GG, Conyers GF, Luck R, Wildes CP, Tye KM. (2016). Divergent routing of positive and negative information from the amygdala during memory retrieval. *Neuron.* 90(2):348-361. doi:10.1016/j.neuron.2016.03.004
68. Park A, Jacob AD, Hsiang HL, Frankland PW, Howland JG, Josselyn SA. (2022). Formation and fate of an engram in the lateral amygdala supporting a rewarding memory in mice. *Neuropsychopharmacology.* 48(5):724-733. doi:10.1038/s41386-022-01472-5
69. Zséli G, Vida B, Szilvásy-Szabó A, Tóth M, Lechan RM, Fekete C. (2018). Neuronal connections of the central amygdalar nucleus with refeeding-activated brain areas in rats. *Brain Struct Funct.* 223(1):391-414. doi:10.1007/s00429-017-1501-4
70. Kim J, Zhang X, Muralidhar S, LeBlanc SA, Tonegawa S. (2017). Basolateral to central amygdala neural circuits for appetitive behaviors. *Neuron.* 93(6):1464-1479.e5. doi:10.1016/j.neuron.2017.02.034

71. Bowen AJ, Huang YW, Chen JY, Pauli JL, Campos CA, Palmiter RD. (2023). Topographic representation of current and future threats in the mouse nociceptive amygdala. *Nat Commun.* 14(1):196. doi:10.1038/s41467-023-35826-4
72. Cassell MD, Gray TS, Kiss JZ. (1986). Neuronal architecture in the rat central nucleus of the amygdala: A cytological, hodological, and immunocytochemical study. *J Comp Neurol.* 246(4):478-499. doi:10.1002/cne.902460406
73. Ponsérre M, Peters C, Fermani F, Conzelmann KK, Klein R. (2020). The insula cortex contacts distinct output streams of the central amygdala. *J Neurosci.* 40(46):8870-8882. doi:10.1523/JNEUROSCI.0567-20.2020
74. Wang Y, Krabbe S, Eddison M, Henry FE, Fleishman G, Lemire AL, Wang L, Korff W, Tillberg PW, Luthi A, Sternson SM. (2023). Multimodal mapping of cell types and projections in the central nucleus of the amygdala. *eLife.* 12:e84262. doi:10.7554/eLife.84262
75. Huber D, Veinante P, Stoop R. (2005). Vasopressin and oxytocin excite distinct neuronal populations in the central amygdala. *Science.* 308(5719):245-248. doi:10.1126/science.1105636
76. Gallagher M, Graham P, Holland P. (1990). The amygdala central nucleus and appetitive Pavlovian conditioning: lesions impair one class of conditioned behavior. *J Neurosci.* 10(6):1906-1911. doi:10.1523/JNEUROSCI.10-06-01906.1990
77. Han S, Soleiman MT, Soden ME, Zweifel LS, Palmiter RD. (2015). Elucidating an affective pain circuit that creates a threat memory. *Cell.* 162(2):363-374. doi:10.1016/j.cell.2015.05.057
78. Pagano R, Salamian A, Zielinski J, Beroun A, Nalberczak-Skóra M, Skonieczna E, Cały A, Tay N, Banaschewski T, Desrivieres S, Grigis A, Garavan H, Heinz A, Bruhl R, Martinot JL, Martinot MLP, Artiges E, Nees F, Orfanos DP, Poustka L, Hohmann S, Frohner JH, Smolka MN, Vaidya N, IMAGEN consortium, Kalita K, Bito H, Muller CP, Schumann G, Okuno H, Radwanska K. (2023). Arc controls alcohol cue relapse by a central amygdala mechanism. *Mol Psych.* 28(2):733-745. doi:10.21203/rs.3.rs-1917417/v1
79. Roberto M, Madamba SG, Moore SD, Tallent MK, Siggins GR. (2003). Ethanol increases GABAergic transmission at both pre- and postsynaptic sites in rat central amygdala neurons. *Proc Natl Acad Sci.* 100(4):2053-2058. doi:10.1073/pnas.0437926100
80. Stefaniuk M, Beroun A, Lebitko T, Markina O, Leski S, Meyza K, Grzywacz A, Samochowiec J, Samochowiec A, Radwanska K, Kaczmarek L. (2017). Matrix metalloproteinase-9 and synaptic plasticity in the central amygdala in control of alcohol-seeking behavior. *Biol Psychiatry.* 81(11):907-917. doi:10.1016/j.biopsych.2016.12.026
81. Day HEW, Badiani A, Uslaner JM, Oates MM, Vittoz NM, Robinson TE, Watson S, Akil H. (2001). Environmental novelty differentially affects c- fos mRNA expression induced by amphetamine or cocaine in subregions of the bed nucleus of the stria terminalis and amygdala. *J Neurosci.* 21(2):732-740. doi:10.1523/JNEUROSCI.21-02-00732.2001
82. Howes SR, Dalley JW, Morrison CH, Robbins TW, Everitt BJ. (2000). Leftward shift in the acquisition of cocaine self-administration in isolation-reared rats: relationship to extracellular levels of dopamine, serotonin and glutamate in the nucleus accumbens and amygdala-striatal FOS expression. *Psychopharmacology (Berl).* 151(1):55-63. doi:10.1007/s002130000451
83. Tye KM, Prakash R, Kim SY, Fenno LE, Grosenick L, Zarabi H, Thompson KR, Gradinaru V, Ramakrishnan C, Deisseroth K. (2011). Amygdala circuitry mediating reversible and bidirectional control of anxiety. *Nature.* 471(7338):358-362. doi:10.1038/nature09820
84. Yu K, Ahrens S, Zhang X, Schiff H, Ramakrishnan C, Fenno L, Deisseroth K, Zhao F, Luo MH, Gong L, He M, Zhou P, Paninski L, Li B. (2017). The central amygdala controls learning in the lateral amygdala. *Nat Neurosci.* 20(12):1680-1685. doi:10.1038/s41593-017-0009-9

85. Haubensak W, Kunwar PS, Cai H, Cioocchi S, Wall NR, Ponnusamy R, Biag J, Dong HW, Deisseroth K, Callaway EM, Fanselow MS, Luthi A, Anderson DJ. (2010). Genetic dissection of an amygdala microcircuit that gates conditioned fear. *Nature*. 468(7321):270-276. doi:10.1038/nature09553
86. Knapska E, Walasek G, Nikolaev E, Neuhausser-Wespy F, Lipp HP, Kaczmarek L, Werka T. (2006). Differential involvement of the central amygdala in appetitive versus aversive learning. *Learn Mem*. 13(2):192-200. doi:10.1101/lm.54706
87. Peters C, He S, Fermani F, Lim H, Ding W, Mayer C, Klein R. (2023). Transcriptomics reveals amygdala neuron regulation by fasting and ghrelin thereby promoting feeding. *Sci Adv*. 9(21). doi: 10.1126/sciadv.adf6521
88. Han W, Tellez LA, Rangel MJ, Motta S.C., Zhang X, Perez IO, Canteras NS, Shammah-Lagnado SJ, van der Pol AN, de Araujo IE. (2017). Integrated control of predatory hunting by the central nucleus of the amygdala. *Cell*. 168(1-2):311-324.e18. doi:10.1016/j.cell.2016.12.027
89. Saha S, Batten TFC, Henderson Z. (2000). A GABAergic projection from the central nucleus of the amygdala to the nucleus of the solitary tract: a combined anterograde tracing and electron microscopic immunohistochemical study. *Neuroscience*. 99(4):613-626. doi:10.1016/S0306-4522(00)00240-2
90. Borrego MB, Chan AE, Ozburn AR. (2022). Regulation of alcohol drinking by ventral striatum and extended amygdala circuitry. *Neuropharmacology*. 212:109074. doi:10.1016/j.neuropharm.2022.109074
91. Uhl GR, Hall FS, Sora I. (2002). Cocaine, reward, movement and monoamine transporters. *Mol Psychiatry*. 7(1):21-26. doi:10.1038/sj.mp.4000964
92. Filip M, Alenina N, Bader M, Przegaliński E. (2010). Behavioral evidence for the significance of serotonergic (5-HT) receptors in cocaine addiction: 5-HT receptors in cocaine addiction. *Addict Biol*. 15(3):227-249. doi:10.1111/j.1369-1600.2010.00214.x
93. Weinschenker D, Schroeder JP. (2007). There and back again: a tale of norepinephrine and drug addiction. *Neuropsychopharmacology*. 32(7):1433-1451. doi:10.1038/sj.npp.1301263
94. Sora I, Wichems C, Takahashi N, Li XF, Zeng Z, Revay R, Lesch KP, Murphy DL, Uhl GR. (1998). Cocaine reward models: conditioned place preference can be established in dopamine- and in serotonin-transporter knockout mice. *Proc Natl Acad Sci*. 95(13):7699-7704. doi:10.1073/pnas.95.13.7699
95. Sora I, Hall FS, Andrews AM, Itokawa M, Li XF, Wei HB, Wichems C, Lesch KP, Murphy DL, Uhl GR. (2001). Molecular mechanisms of cocaine reward: combined dopamine and serotonin transporter knockouts eliminate cocaine place preference. *Proc Natl Acad Sci*. 98(9):5300-5305. doi:10.1073/pnas.091039298
96. Zeng H, Jiang Y, Beer-Hammer S, Yu X. (2022). Awake mouse fMRI and pupillary recordings in the ultra-high magnetic field. *Front Neurosci*. 16:886709. doi:10.3389/fnins.2022.886709
97. Perich MG, Rajan K. (2020). Rethinking brain-wide interactions through multi-region 'network of networks' models. *Curr Opin Neurobiol*. 65:146-151. doi:10.1016/j.conb.2020.11.003
98. Michaelson SD, Ozkan ED, Aceti M, Maity S, Llamas N, Weldon M, Mizrachi E, Vaissiere T, Gaffield MA, Christie JM, Holder Jr JL, Miller CA, Rumbaugh G. (2018). SYNGAP1 heterozygosity disrupts sensory processing by reducing touch-related activity within somatosensory cortex circuits. *Nat Neurosci*. 21(12):1-13. doi:10.1038/s41593-018-0268-0
99. Sans-Dublanc A, Chrzanowska A, Reinhard K, Lemmon D, Nuttin B, Lambert T, Montaldo G, Urban A, Farrow K. (2021). Optogenetic fUSI for brain-wide mapping of neural activity mediating collicular-dependent behaviors. *Neuron*. 109(11):1888-1905.e10. doi:10.1016/j.neuron.2021.04.008



100. Stefaniuk M, Pawłowska M, Barański M, Nowicka K, Zieliński Z, Bijoch Ł, Legutko D, Majka P, Bednarek S, Jermakow N, Wójcik D, Kaczmarek L. (2023). Global brain c-Fos profiling reveals major functional brain networks rearrangements after alcohol reexposure. *Neurobiol Dis.* 178:106006. doi:10.1016/j.nbd.2023.106006
101. Pawłowska M, Legutko D, Stefaniuk M. (2017). Zajrzyć w głąb mózgu – nowe techniki oczyszczania optycznego i obrazowania z zastosowaniem mikroskopu arkusza światła. *Postępy Biochem.* 63(1):8-15
102. Pawłowska M, Stefaniuk M, Legutko D, Kaczmarek L. (2019). Light-Sheet Microscopy for Whole-Brain Imaging. In: Kao FJ, Keiser G, Gogoi A, eds. *Advanced Optical Methods for Brain Imaging. Vol 5. Progress in Optical Science and Photonics.* Springer Singapore; 69-81. doi:10.1007/978-981-10-9020-2\_3
103. Matryba P, Kaczmarek L, Gołąb J. (2019). Advances in Ex Situ Tissue Optical Clearing. *Laser Photonics Rev.* 13(8):1800292. doi:10.1002/lpor.201800292
104. Stefaniuk M, Gualda EJ, Pawłowska M, Legutko D, Matryba P, Koza P, Konopka W, Owczarek D, Wawrzyniak M, Loza-Alvarez P, Kaczmarek L. (2016). Light-sheet microscopy imaging of a whole cleared rat brain with Thy1-GFP transgene. *Sci Rep.* 6(1):28209. doi:10.1038/srep28209
105. Renier N, Wu Z, Simon DJ, 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. doi:10.1016/j.cell.2014.10.010
106. Renier N, Adams EL, Kirst C, Wu Z, Azevedo R, Kohl J, Autry AE, Kadiri L, Venkataraju KU, Zhou Y, Wang VX, Tang XY, 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. doi:10.1016/j.cell.2016.05.007
107. Wei M, Shi L, Shen Y, Zhao Z, Guzman A, Kaufman LJ, Wei L, Min W. (2019). Volumetric chemical imaging by clearing-enhanced stimulated Raman scattering microscopy. *Proc Natl Acad Sci.* 116(14):6608-6617. doi:10.1073/pnas.1813044116
108. Keyes PC, Adams EL, Chen Z, Bi L, Nachtrab G, Wang VJ, Tessier-Lavigne M, Zhu Y, Chen X. (2020). Orchestrating opiate-associated memories in thalamic circuits. *Neuron.* 107(6):1113-1123.e4. doi:10.1016/j.neuron.2020.06.028
109. Kimbrough A, Kallupi M, Smith LC, 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):ENEURO.0208-19.2021. doi:10.1523/ENEURO.0208-19.2021
110. Kimbrough A, Lurie DJ, Collazo A, Kreifeldt M, Sidhu H, Macedo GC, D'Esposito M, Contet C, George O. (2020). Brain-wide functional architecture remodeling by alcohol dependence and abstinence. *Proc Natl Acad Sci.* 117(4):2149-2159. doi:10.1073/pnas.1909915117
111. Roy DS, Park YG, Kim ME, Zhang Y, Ogawa SK, DiNapoli N, Gu X, Cho JH, Choi H, Kamentsky 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. *Nat Commun.* 13(1):1799. doi:10.1038/s41467-022-29384-4
112. Pessoa L. (2022). The entangled brain. *Journ Cogn Neurosci.* 35(3):349-360. doi:https://doi.org/10.1162/jocn\_a\_01908
113. Citri A, Malenka RC. (2008). Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology.* 33(1):18-41. doi:10.1038/sj.npp.1301559
114. Hebb DO. (1949). *The organization of behavior. A neuropsychological theory.* New York: John Wiley & Sons
115. Konorski J. (1948). *Conditioned reflexes and neuron organization.* Cambridge University Press.
116. Bijoch L, Borczyk M, Czajkowski R. (2020). Bases of Jerzy Konorski's theory of synaptic plasticity. *Eur J Neurosci.* 51(9):1857-1866. doi:10.1111/ejn.14532

117. Bliss TVP, Lomo T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol.* 232(2):331-356. doi:10.1113/jphysiol.1973.sp010273
118. Lynch GS, Dunwiddie T, Gribkoff V. (1977). Heterosynaptic depression: a postsynaptic correlate of long-term potentiation. *Nature.* 266(5604):737-739. doi:10.1038/266737a0
119. Barrionuevo G, Schottler F, Lynch G. (1980). The effects of repetitive low frequency stimulation on control and “potentiated” synaptic responses in the hippocampus. *Life Sci.* 27(24):2385-2391. doi:10.1016/0024-3205(80)90509-3
120. Collingridge GL, Peineau S, Howland JG, Wang YT. (2010). Long-term depression in the CNS. *Nat Rev Neurosci.* 11(7):459-473. doi:10.1038/nrn2867
121. Kim J, Lee S, Park K, Hong I, Song B, Son G, Park H, Kim WR, Park E, Choe HK, Kim H, Lee C, Sun W, Kim K, Shin KS, Choi S. (2007). Amygdala depotentiation and fear extinction. *Proc Natl Acad Sci.* 104(52):20955-20960. doi:https://doi.org/10.1073/pnas.071054810
122. Pastalkova E, Serrano P, Pinkhasova D, Wallace E, Fenton AA, Sacktor TC. (2006). Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP. *Science.* 313(5790):1141-1144. doi:10.1126/science.1128657
123. Brigman JL, Wright T, Talani G, Prasad-Mulcare S, Jinde S, Seabold GK, Mathur P, Davis MI, Bock R, Gustin RM, Colbran RJ, Alvarez VA, Nakazawa K, Delpire E, Lovinger DM, Holmes A. (2010). Loss of GluN2B-containing NMDA receptors in CA1 hippocampus and cortex impairs long-term depression, reduces dendritic spine density, and disrupts learning. *J Neurosci.* 30(13):4590-4600. doi:10.1523/JNEUROSCI.0640-10.2010
124. Smith GB, Heynen AJ, Bear MF. (2009). Bidirectional synaptic mechanisms of ocular dominance plasticity in visual cortex. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 364(1515):357-367. doi:10.1098/rstb.2008.0198
125. Tien NW, Kerschensteiner D. (2018). Homeostatic plasticity in neural development. *Neural Develop.* 13(1):9. doi:10.1186/s13064-018-0105-x
126. Jasinska M, Woznicka O, Jasek-Gajda E, Lis GJ, Pyza E, Litwin JA. (2020). Circadian changes of dendritic spine geometry in mouse barrel cortex. *Front Neurosci.* 14:578881. doi:10.3389/fnins.2020.578881
127. Otmakhov N, Khibnik L, Otmakhova N, Carpenter S, Riahi S, Asrican B, Lisman J. (2004). Forskolin-induced LTP in the CA1 hippocampal region is NMDA receptor dependent. *J Neurophysiol.* 91(5):1955-1962. doi:10.1152/jn.00941.2003
128. Sun Y, Smirnov M, Kamasawa N, Yasuda R. (2021). Rapid ultrastructural changes in the PSD and surrounding membrane after induction of structural LTP in single dendritic spines. *J Neurosci.* 41(33):7003-7014. doi:10.1523/JNEUROSCI.1964-20.2021
129. Fitzjohn SM, Kingston AE, Lodge D, Collingridge GL. (1999). DHPG-induced LTD in area CA1 of juvenile rat hippocampus; characterisation and sensitivity to novel mGlu receptor antagonists. *Neuropharmacology.* 38(10):1577-1583. doi:10.1016/S0028-3908(99)00123-9
130. Mel BW, Schiller J, Poirazi P. (2017). Synaptic plasticity in dendrites: complications and coping strategies. *Curr Opin Neurobiol.* 43:177-186. doi:10.1016/j.conb.2017.03.012
131. Alberini CM. 2009. Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity. *Physiol Rev.* 89(1):121-145. doi:10.1152/physrev.00017.2008
132. Jaworski J, Kalita K, Knapska E. (2018). c-Fos and neuronal plasticity: the aftermath of Kaczmarek’s theory. *Acta Neurobiol Exp.* 78(4):287-296. doi:10.21307/ane-2018-027
133. Yasuda R, Hayashi Y, Hell JW. (2022). CaMKII: a central molecular organizer of synaptic plasticity, learning and memory. *Nat Rev Neurosci.* 23(11):666-682. doi:10.1038/s41583-022-00624-2
134. Yagishita S, Hayashi-Takagi A, Ellis-Davies GCR, Urakubo H, Ishii S, Kasai H. (2014). A critical time window for dopamine actions on the structural plasticity of dendritic spines. *Science.* 345(6204):1616-1620. doi:10.1126/science.1255514

135. Zhang YQ, Lin WP, Huang LP, Zhao B, Zhang CC, Yin DM. (2021). Dopamine D2 receptor regulates cortical synaptic pruning in rodents. *Nat Commun.* 12(1):6444. doi:10.1038/s41467-021-26769-9
136. Ungless MA, Whistler JL, Malenka RC, Bonci A. (2001). Single cocaine exposure in vivo induces long-term potentiation in dopamine neurons. *Nature.* 411(6837):583-587. doi:10.1038/35079077
137. Stein V, House DRC, Brecht DS, Nicoll RA. (2003). Postsynaptic density-95 mimics and occludes hippocampal long-term potentiation and enhances long-term depression. *J Neurosci.* 23(13):5503-5506. doi:10.1523/JNEUROSCI.23-13-05503.2003
138. Ehrlich I. (2004). Postsynaptic Density 95 controls AMPA Receptor incorporation during long-term potentiation and experience-driven synaptic plasticity. *J Neurosci.* 24(4):916-927. doi:10.1523/JNEUROSCI.4733-03.2004
139. Airey DC, Kroodsma DE, DeVogd TJ. (2000). Differences in the complexity of song tutoring cause differences in the amount learned and in dendritic spine density in a songbird telencephalic song control nucleus. *Neurobiol Learn Mem.* 73(3):274-281. doi:10.1006/nlme.1999.3937
140. Matsuzaki M, Ellis-Davies GCR, Nemoto T, Miyashita Y, Iino M, Kasai H. (2001). Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nat Neurosci.* 4(11):1086-1092. doi:10.1038/nn736
141. Matsuzaki M, Honkura N, Ellis-Davies GCR, Kasai H. (2004). Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature.* 429(6993):761-766. doi:10.1038/nature02617
142. Zhou Q, Homma KJ, Poo M ming. (2004). Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses. *Neuron.* 44(5):749-757. doi:10.1016/j.neuron.2004.11.011
143. Hering H, Sheng M. (2001). Dendritic spines: structure, dynamics and regulation. *Nat Rev Neurosci.* 2(12):880-888. doi:10.1038/35104061
144. Fitzjohn SM, Pickard L, Duckworth JK, Molnar E, Henley JM, Collingridge GL, Noel J. (2001). An electrophysiological characterisation of long-term potentiation in cultured dissociated hippocampal neurones. *Neuropharmacology.* 41(6):693-699. doi:10.1016/S0028-3908(01)00128-9
145. Zinsmaier AK, Dong Y, Huang YH. (2022). Cocaine-induced projection-specific and cell type-specific adaptations in the nucleus accumbens. *Mol Psychiatry.* 27(1):669-686. doi:10.1038/s41380-021-01112-2
146. Isaac JTR, Nicoll RA, Malenka RC. (1995). Evidence for silent synapses: implications for the expression of LTP. *Neuron.* 15(2):427-434. doi:10.1016/0896-6273(95)90046-2
147. Liao D, Hessler NA, Malinow R. (1995). Activation of postsynaptically silent synapses during pairing-induced LTP in CA1 region of hippocampal slice. *Nature.* 375(6530):400-404. doi: 10.1038/375400a0
148. Wright WJ, Dong Y. (2021). Silent Synapses in cocaine-associated memory and beyond. *J Neurosci.* 41(45):9275-9285. doi:10.1523/JNEUROSCI.1559-21.2021
149. Graziane NM, Sun S, Wright WJ, Jang D, Liu Z, Huang YH, Nestler EJ, Wang YT, Schluter OM, Dong Y. (2016). Opposing mechanisms mediate morphine- and cocaine-induced generation of silent synapses. *Nat Neurosci.* 19(7):915-925. doi:10.1038/nn.4313
150. Alonso-Caraballo Y, Fetterly TL, Jorgensen ET, Nieto AM, Brown TE, Ferrario CR. (2021). Sex specific effects of “junk-food” diet on calcium permeable AMPA receptors and silent synapses in the nucleus accumbens core. *Neuropsychopharmacology.* 46(3):569-578. doi:10.1038/s41386-020-0781-1
151. Malenka RC, Nicoll RA. (1997). Silent synapses speak up. *Neuron.* 19(3):473-476. doi:10.1016/S0896-6273(00)80362-1
152. Vardalaki D, Chung K, Harnett MT. (2022). Filopodia are a structural substrate for silent synapses in adult neocortex. *Nature.* 612(7939):323-327. doi:10.1038/s41586-022-05483-6

153. Waung MW, Pfeiffer BE, Nosyreva ED, Ronesi JA, Huber KM. (2008). Rapid Translation of Arc/Arg3.1 selectively mediates mGluR-dependent LTD through persistent increases in AMPAR endocytosis rate. *Neuron*. 59(1):84-97. doi:10.1016/j.neuron.2008.05.014
154. Plath N, Ohana O, Dammermann B, Errington ML, Schmitz D, Gross C, Mao X, Engelsberg A, Mahlke C, Welzl H, Kobalz U, Stawrakakis A, Fernandez E, Waltereit R, Bick-Sander A, Therstappen E, Cooke SF, Blanquet V, Wurst W, Salmen B, Kuhl D. (2006). Arc/Arg3.1 is essential for the consolidation of synaptic plasticity and memories. *Neuron*. 52(3):437-444. doi:10.1016/j.neuron.2006.08.024
155. McCurry CL, Shepherd JD, Tropea D, Wang KH, Bear MF, Sur M. (2010). Loss of Arc renders the visual cortex impervious to the effects of sensory experience or deprivation. *Nat Neurosci*. 13(4):450-457. doi:10.1038/nn.2508
156. Wang KH, Majewska A, Schummers J, Farley B, Hu C, Sur M, Tonegawa S. (2006). In vivo two-photon imaging reveals a role of arc in enhancing orientation specificity in visual cortex. *Cell*. 126(2):389-402. doi:10.1016/j.cell.2006.06.038
157. Pastuzyn ED, Day CE, Kearns RB, Kyrke-Smith m, Taibi AV, McCormick J, Yoder N, Belnap DM, Erlendsson S, Morado DR, Briggs JAG, Feschotte C, Shepherd JD. (2018). The neuronal gene arc encodes a repurposed retrotransposon gag protein that mediates intercellular RNA transfer. *Cell*. 172(1-2):275-288.e18. doi:10.1016/j.cell.2017.12.024
158. Yap EL, Greenberg ME. (2018). Activity-regulated transcription: bridging the gap between neural activity and behavior. *Neuron*. 100(2):330-348. doi:10.1016/j.neuron.2018.10.013
159. Jaworski J, Biedermann IW, Lapinska J, Szklarczyk A, Figiel I, Konopka D, Nowicka D, Filipkowski RK, 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. *J Biol Chem*. 274(40):28106–28112. doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.274.40.28106>.
160. Pettit NL, Yap EL, Greenberg ME, Harvey CD. (2022). Fos ensembles encode and shape stable spatial maps in the hippocampus. *Nature*. 609(7926):327-334. doi:10.1038/s41586-022-05113-1
161. Lukasiuk K, Savonenko A, Nikolaev E, Rydz M, Kaczmarek L. (1999). Defensive conditioning-related increase in AP-1 transcription factor in the rat cortex. *Mol Brain Res*. 67(1):64-73. doi:10.1016/S0169-328X(99)00045-5
162. Yang J, Serrano P, Yin X, Sun X, Lin Y, Chen SX. (2022). Functionally distinct NPAS4-expressing somatostatin interneuron ensembles critical for motor skill learning. *Neuron*. 110(20):3339-3355.e8. doi:10.1016/j.neuron.2022.08.018
163. Pascoli V, Turiault M, Lüscher C. (2012). Reversal of cocaine-evoked synaptic potentiation resets drug-induced adaptive behaviour. *Nature*. 481(7379):71-75. doi:10.1038/nature10709
164. Wu M, Minkowicz S, Dumrongprechachan V, Hamilton P, Kozorovitskiy Y. (2021). Ketamine rapidly enhances glutamate-evoked dendritic spinogenesis in medial prefrontal cortex through dopaminergic mechanisms. *Biol Psychiatry*. 89(11):1096-1105. doi:10.1016/j.biopsych.2020.12.022
165. Wright WJ, Graziane NM, Neumann PA, Hamilton PJ, Cates HM, Fuerst L, Spencley A, MacKinnon-Booth N, Lyer K, Hunag YH, Shaham Y, Schluter OM, Nestler EJ, Dong J. (2020). Silent synapses dictate cocaine memory destabilization and reconsolidation. *Nat Neurosci*. 23(1):32-46. doi:10.1038/s41593-019-0537-6
166. van Son D, Wiers RW, Catena A, Perez-Garcia M, Verdejo-García A. (2016). White matter disruptions in male cocaine polysubstance users: associations with severity of drug use and duration of abstinence. *Drug Alcohol Depend*. 168:247-254. doi:10.1016/j.drugalcdep.2016.09.023
167. Romero MJ, Asensio S, Palau C, Sanchez A, Romero FJ. (2010). Cocaine addiction: diffusion tensor imaging study of the inferior frontal and anterior cingulate white matter. *Psychiatry Res Neuroimaging*. 181(1):57-63. doi:10.1016/j.psychres.2009.07.004

168. Guha P, Harraz MM, Snyder SH. (2016). Cocaine elicits autophagic cytotoxicity via a nitric oxide-GAPDH signaling cascade. *Proc Natl Acad Sci.*113(5):1417-1422. doi:10.1073/pnas.1524860113
169. Wise RA, Koob GF. (2014). The development and maintenance of drug addiction. *Neuropsychopharmacology.* 39(2):254-262. doi:10.1038/npp.2013.261
170. Korpi ER, Den Hollander B, Farooq U, Vashchinkina E, Rajkumar R, Nutt DJ, Hyytia P, Dawe GS. (2015). Mechanisms of action and persistent neuroplasticity by drugs of abuse. Koulu M, ed. *Pharmacol Rev.* 67(4):872-1004. doi:10.1124/pr.115.010967
171. Sallery M, Dos Santos M, Saint-Jour E, Moumne L, Pages C, Kappes V, Parnaudeau S, Caboche J, Vanhoutte P. (2017). Activity-regulated cytoskeleton-associated protein accumulates in the nucleus in response to cocaine and acts as a brake on chromatin remodeling and long-term behavioral alterations. *Biol Psychiatry.* 81(7):573-584. doi:10.1016/j.biopsych.2016.05.025
172. Fumagalli F, Bedogni F, Frasca A, Di Pasquale L, Racagni G, Riva MA. (2006). Corticostriatal up-regulation of activity-regulated cytoskeletal-associated protein expression after repeated exposure to cocaine. *Mol Pharmacol.* 70(5):1726-1734. doi:10.1124/mol.106.026302
173. Lee BR, Ma YY, Huang YH, Wang X, Otaka M, Ishikawa M, Neumann PA, Graziane NM, Brown TE, Suska A, Guo C, Lobo MK, Sesack SR, Wolf ME, Nestler EJ, Shaham Y, Schluter OM, Dong Y. (2013). Maturation of silent synapses in amygdala-accumbens projection contributes to incubation of cocaine craving. *Nat Neurosci.* 16(11):1644-1651. doi:10.1038/nn.3533
174. Huang YH, Lin Y, Mu P, Lee BR, Brown TE, Wayman G, Marie H, Liu W, Yan Z, Sorg BA, Schluter OM, Zukin S, Dong Y. (2009). In vivo cocaine experience generates silent synapses. *Neuron.* 63(1):40-47. doi:10.1016/j.neuron.2009.06.007
175. Besser S, Sicker M, Marx G, Winkler U, Eulenburg V, Hulsmann S, Hirrlinger J. (2015). A transgenic mouse line expressing the red fluorescent protein tdTomato in GABAergic neurons. *Mothet JP, ed. PLOS ONE.* 10(6):e0129934. doi:10.1371/journal.pone.0129934
176. Shuen JA, Chen M, Gloss B, Calakos N. (2008). *Drd1a*-tdTomato BAC transgenic mice for simultaneous visualization of medium spiny neurons in the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *J Neurosci.*28(11):2681-2685. doi:10.1523/JNEUROSCI.5492-07.2008
177. Armbruster BN, Li X, Pausch MH, Herlitze S, Roth BL. (2007). Evolving the lock to fit the key to create a family of G protein-coupled receptors potently activated by an inert ligand. *Proc Natl Acad Sci.* 104(12):5163-5168. doi:10.1073/pnas.0700293104
178. Polepalli JS, Sullivan RKP, Yanagawa Y, Sah P. (2010). A specific class of interneuron mediates inhibitory plasticity in the lateral amygdala. *J Neurosci.* 30(44):14619-14629. doi:10.1523/JNEUROSCI.3252-10.2010
179. Bria A, Iannello G. (2012). TeraStitcher - a tool for fast automatic 3D-stitching of teravoxel-sized microscopy images. *BMC Bioinformatics.* 13(1):316. doi:10.1186/1471-2105-13-316
180. Kim Y, Venkataraju KU, Pradhan K, Mende C, Taranda J, Turaga SC, Arganda-Carreras I, NG L, Hawrylycz MJ, Rockland KS, Seung HS, Osten P. (2015). Mapping social behavior-induced brain activation at cellular resolution in the mouse. *Cell Rep.* 10(2):292-305. doi:10.1016/j.celrep.2014.12.014
181. Sunkin SM, Ng L, Lau C, Dolbeare T, Gilbert TL, Thompson CL, Hawrylycz M, Dang C. (2012). Allen Brain Atlas: an integrated spatio-temporal portal for exploring the central nervous system. *Nucleic Acids Res.* 41(D1):D996-D1008. doi:10.1093/nar/gks1042
182. Jendryka M, Palchadhuri M, Ursu D, van der Veen B, Liss B, Katzel D, Nissen W, Pekcec A. (2019). Pharmacokinetic and pharmacodynamic actions of clozapine-N-oxide, clozapine, and compound 21 in DREADD-based chemogenetics in mice. *Sci Rep.* 9(1):4522. doi:10.1038/s41598-019-41088-2

183. Bobadilla AC, Dereschewitz E, Vaccaro L, Heinsbroek JA, Scofield MD, Kalivas PW (2020). Cocaine and sucrose rewards recruit different seeking ensembles in the nucleus accumbens core. *Mol Psychiatry*. 25(12):3150-3163. doi:10.1038/s41380-020-00888-z
184. Hu Z, Oh EH, Chung YB, Hong JT, Oh KW (2015). Predominant D1 receptors involvement in the over-expression of CART peptides after repeated cocaine administration. *Korean J Physiol Pharmacol*. 19(2):89-97. doi:10.4196/kjpp.2015.19.2.89
185. Zubrycki EM, Giordano M, Sanberg PR (1990). The effects of cocaine on multivariate locomotor behavior and defecation. *Behav Brain Res*.36(1-2):155-159. doi: 10.1016/0166-4328(90)90169-f
186. Chen BT, Bowers MS, Martin M, Hopf FW, Guillory AM, Carelli RM, Chou JK, Bonci A. (2008). Cocaine but not natural reward self-administration nor passive cocaine infusion produces persistent LTP in the VTA. *Neuron* 59(2):288-297. doi: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.05.024>
187. Mahringer D, Petersen AV, Fiser A, Okuno H, Bito H, Perrier JF, Keller GB. (2019). Expression of c-Fos and arc in hippocampal region CA1 marks neurons that exhibit learning-related activity changes. *Neuroscience*. doi:10.1101/644526
188. Gandolfi D, Cerri S, Mapelli J, Polimeni M, Tritto S, Fuzzati-Armentero MT, Bigiani A, Blandini F, Mapelli L, D'Angelo E. (2017). Activation of the CREB/c-Fos pathway during long-term synaptic plasticity in the cerebellum granular layer. *Front Cell Neurosci*. 11:184. doi:10.3389/fncel.2017.00184
189. VanElzakker M, Fevurly RD, Breindel T, Spencer RL. (2008). Environmental novelty is associated with a selective increase in Fos expression in the output elements of the hippocampal formation and the perirhinal cortex. *Learn Mem*. 15(12):899-908. doi:10.1101/lm.1196508
190. Silva BA, Burns AM, Gräff J. (2019) A cFos activation map of remote fear memory attenuation. *Psychopharmacology (Berl)*. 236(1):369-381. doi:10.1007/s00213-018-5000-y
191. Bonapersona V, Schuler H, Damsteegt R, Adolfs Y, Pasterkamp RJ, van den Heubel MP, Joels M, Sarabdjitsingh A. (2022). The mouse brain after foot shock in four dimensions: temporal dynamics at a single-cell resolution. *Proc Natl Acad Sci*. 119(8):e2114002119. doi:10.1073/pnas.2114002119
192. Bijoch Ł, Włodkowska U, Kasztelanica R, Pawłowska M, Pysz D, Kaczmarek L, Lapkiewicz R, Buczyński R, Czajkowski R. (2023). Novel design and application of high-NA fiber imaging bundles for in vivo brain imaging with two-photon scanning fluorescence microscopy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 15(10):12831–1284a. doi: 10.1021/acsami.2c22985
193. Santos-Baldaia RD, Wuo-Silva R, Sanabria V, Baldaia MA, Yokoyama TS, Coppi AA, Longo BM. (2023). Distinctive Neuroanatomic Regions Involved in Cocaine-Induced Behavioral Sensitization in Mice. *Biomedicines*, 11(2):383. doi:10.3390/biomedicines11020383
194. van Zessen R, Li Y, Marion-Poll L, Hulo N, Flakowski J, Lüscher C. (2021). Dynamic dichotomy of accumbal population activity underlies cocaine sensitization. *Elife*. 10: e66048. doi:10.7554/eLife.66048.
195. Hoy JL, Niell CM. (2015). Layer-specific refinement of visual cortex function after eye opening in the awake mouse. *J Neurosci*. 35(8):3370-3383. doi:10.1523/JNEUROSCI.3174-14.2015
196. Simmler LD, Li Y, Hadjas LC, Hiver A, Van Zessen R, Lüscher C. (2022). Dual action of ketamine confines addiction liability. *Nature*. 608(7922):368-373. doi:10.1038/s41586-022-04993-7
197. Brodie MS, Dunwiddie TV. (1990). Cocaine effects in the ventral tegmental area: evidence for an indirect dopaminergic mechanism of action. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 342(6):660-665. doi:10.1007/BF00175709

198. Hansen HH, Perens J, Roostalu U, Skytte JL, Salinas CG, Barkholt P, Thorbek DD, Rigbolt KTG, Vrang N, Jelsing J, Hecksher-Sorensen J. (2021). Whole-brain activation signatures of weight-lowering drugs. *Mol Metab.* 47:101171. doi:10.1016/j.molmet.2021.101171
199. Davoudian PA, Shao LX, Kwan AC. (2023). Shared and distinct brain regions targeted for immediate early gene expression by ketamine and psilocybin. *ACS Chem Neurosci.* 14(3):468-480. doi:10.1021/acscchemneuro.2c00637
200. Ye L, Allen WE, Thompson KR, Tian Q, Hsueh B, Ramakrishnan C, Wang AC, Jennings JH, Adhikari A, Halpern CH, Witten IB, Barth AL, Luo L, McNab JA, Deisseroth K. (2016). Wiring and molecular features of prefrontal ensembles representing distinct experiences. *Cell.* 165(7):1776-1788. doi:10.1016/j.cell.2016.05.010
201. Li K, Zhou T, Liao L, Wong C, Henn F, Malinow R, Yates JR, Hu H. (2013).  $\beta$ CaMKII in lateral habenula mediates core symptoms of depression. *Science.* 341(6149):1016-1020. doi:10.1126/science.1240729
202. Allen WE, Chen MZ, Pichamoorthy N, Tien RH, Pachitariu M, Luo L, Deisseroth K. (2019). Thirst regulates motivated behavior through modulation of brainwide neural population dynamics. *Science.* 364(6437):eaav3932. doi:10.1126/science.aav3932
203. Steinmetz NA, Zatka-Haas P, Carandini M, Harris KD. (2019). Distributed coding of choice, action and engagement across the mouse brain. *Nature.* 576(7786):266-273. doi:10.1038/s41586-019-1787-x
204. Ahrens MB, Li JM, Orger MB, Robson DN, Schier AF, Engert F, Portugues R. (2012). Brain-wide neuronal dynamics during motor adaptation in zebrafish. *Nature.* 485(7399):471-477. doi:10.1038/nature11057
205. Gonzalez-Castillo J, Saad ZS, Handwerker DA, Inati SJ, Brenowitz N, Bandettini PA. (2012). Whole-brain, time-locked activation with simple tasks revealed using massive averaging and model-free analysis. *Proc Natl Acad Sci.* 109(14):5487-5492. doi:10.1073/pnas.1121049109
206. Kaplan HS, Zimmer M. (2020). Brain-wide representations of ongoing behavior: a universal principle? *Curr Opin Neurobiol.* 64:60-69. doi:10.1016/j.conb.2020.02.008
207. Gallen CL, D'Esposito M. (2019). Brain Modularity: A Biomarker of intervention-related plasticity. *Trends Cogn Sci.* 23(4):293-304. doi:10.1016/j.tics.2019.01.014
208. Liang X, He Y, Salmeron BJ, Gu H, Stein EA, Yang Y. (2015). Interactions between the salience and default-mode networks are disrupted in cocaine addiction. *J Neurosci.* 35(21):8081-8090. doi:10.1523/JNEUROSCI.3188-14.2015
209. Konova AB, Moeller SJ, Tomasi D, Goldstein RZ. (2015). Effects of chronic and acute stimulants on brain functional connectivity hubs. *Brain Res.* 1628:147-156. doi:10.1016/j.brainres.2015.02.002
210. Yu Q, Plis SM, Erhardt EB, Allen EA, Sui J, Kiehl KA, Pearlson G, Calhoun VD. (2012). Modular organization of functional network connectivity in healthy controls and patients with schizophrenia during the resting state. *Front Syst Neurosci.* 5. doi:10.3389/fnsys.2011.00103
211. Tomasi D, Volkow ND, Wang R, Carrillo JH, Maloney T, Alia-Klein N, Woicik PA, Goldstein RZ. (2010). Disrupted functional connectivity with dopaminergic midbrain in cocaine abusers. *PloS one.* 5(5):e10815. doi: 10.1371/journal.pone.0010815
212. Jinnah HA, Egami K, Rao L, Shin M, Kasim S, Hess EJ. (2003). Expression of c-fos in the brain after activation of L-Type calcium channels. *Dev Neurosci.* 25(6):403-411. doi:10.1159/000075666
213. Jakkamsetti V, Tsai NP, Gross C, Molinaro G, Collins KA, Nicoletti F, Wang KH, Osten P, Bassel GJ, Gibson JR, Huber KM. (2013). Experience-induced Arc/Arg3.1 primes CA1 pyramidal neurons for metabotropic glutamate receptor-dependent long-term synaptic depression. *Neuron.* 80(1):72-79. doi:10.1016/j.neuron.2013.07.020

214. Bramham CR, Alme MN, Bittins M, Kuipers SD, Nair RR, Pai B, Panja D, Schubert M, Soule J, Tiron A, Wibrand K. (2010). The Arc of synaptic memory. *Exp Brain Res.* 200(2):125-140. doi:10.1007/s00221-009-1959-2
215. Pandey SC, Zhang H, Ugale R, Prakash A, Xu T, Misra K. (2008). Effector immediate-early gene arc in the amygdala plays a critical role in alcoholism. *J Neurosci.* 28(10):2589-2600. doi:10.1523/JNEUROSCI.4752-07.2008
216. Li M, Liu W jie, Lu B, Wang Y hua, Liu J gen. (2013). Differential expression of Arc in the mesocorticolimbic system is involved in drug and natural rewarding behavior in rats. *Acta Pharmacol Sin.* 34(8):1013-1024. doi:10.1038/aps.2013.28
217. Yakout DW, Shree N, Mabb AM. (2021). Effect of pharmacological manipulations on Arc function. *Curr Res Pharmacol Drug Discov.* 2:100013. doi:10.1016/j.crphar.2020.100013
218. Sampedro-Piquero P, Moreno-Fernández RD, Mañas-Padilla MC, Gil-Rodríguez S, Gavito AL, Pavon FJ, Pedraza C, Garcia-Fernandez M, de Guevara-Miranda DL, Santin LJ, Castilla-Ortega E. (2018). Training memory without aversion: appetitive hole-board spatial learning increases adult hippocampal neurogenesis. *Neurobiol Learn Mem.* 151:35-42. doi:10.1016/j.nlm.2018.03.023
219. Dilly GA, Kittleman CW, Kerr TM, Messing RO, Mayfield RD. (2022). Cell-type specific changes in PKC-delta neurons of the central amygdala during alcohol withdrawal. *Transl Psychiatry.* 12(1):289. doi:10.1038/s41398-022-02063-0
220. Domi E, Xu L, Toivainen S, Wiskerke J, Coppola A, Holm L, Augier E, Petrella M, Heilig M. (2023). Activation of GABAB receptors in central amygdala attenuates activity of PKC $\delta$  + neurons and suppresses punishment-resistant alcohol self-administration in rats. *Neuropsychopharmacology.* 1-10. doi: <https://doi.org/10.1038/s41386-023-01543-1>
221. Cai H, Haubensak W, Anthony TE, Anderson DJ. (2014). Central amygdala PKC- $\delta$ + neurons mediate the influence of multiple anorexigenic signals. *Nat Neurosci.* 17(9):1240-1248. doi:10.1038/nn.3767
222. Douglass AM, Kucukdereli H, Ponserre M, Markovic M, Grundermann J, Strobel C, Morales PLA, Conzelmann KK, Luthi A, Klein R. (2017). Central amygdala circuits modulate food consumption through a positive-valence mechanism. *Nat Neurosci.* 20(10):1384-1394. doi:10.1038/nn.4623
223. Dorofeikowva M, Stelly CE, Duong A, Basavanhalli S, Bean E, Weissmuller K, Sifnugel N, Resendez A, Corey DM, Tasker JG, Fadok JP. (2023). The role of genetically distinct central amygdala neurons 1 in appetitive and aversive 2 responding assayed with a novel dual valence operant conditioning paradigm. *eNeuron.* 10(9). doi: <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0319-22.2023>
224. Warlow SM, Robinson MJF, Berridge KC. (2017). Optogenetic central amygdala stimulation intensifies and narrows motivation for cocaine. *J Neurosci.* 37(35):8330-8348. doi:10.1523/JNEUROSCI.3141-16.2017
225. Lu L, Hope BT, Dempsey J, Liu SY, Bossert JM, Shaham Y. (2005). Central amygdala ERK signaling pathway is critical to incubation of cocaine craving. *Nat Neurosci.* 8(2):212-219. doi:10.1038/nn1383
226. Hardaway JA, Halladay LR, Mazzone CM, Pati D, Bloodgood DW, Kim M, Jensen J, DiBerto JG, Boyt KM, Shiddapur A, Erfani A, Hon OJ, Neira S, Stanhope CM, Sugam JA, Saddoris MP, Tipton G, McElligot Z, Zhou TC, Stuber GD, Kash TL. (2019). Central amygdala prepronociceptin-expressing neurons mediate palatable food consumption and reward. *Neuron.* 102(5):1037-1052.e7. doi:10.1016/j.neuron.2019.03.037
227. Venniro M, Russell TI, Ramsey LA, Richie CT, Lesscher HMB, Giovanetti SM, Messing RO, Shaham Y. (2020). Abstinence-dependent dissociable central amygdala microcircuits control drug craving. *Proc Natl Acad Sci.* 117(14):8126-8134. doi:10.1073/pnas.2001615117



228. Venniro M, Zhang M, Caprioli D, Hoots JK, Golden SA, Heins C, Morales M, Epstein DH, Shaham Y. (2018). Volitional social interaction prevents drug addiction in rat models. *Nat Neurosci.* 21(11):1520-1529. doi:10.1038/s41593-018-0246-6
229. Gomez JL, Bonaventura J, Lesniak W, Mathews WB, Sysa-Shah P, Rodriguez LA, Ellis RJ, Richie CT, Harvey BK, Dannals RF, Pomper MG, Bonci A, Michaelides M. (2017). Chemogenetics revealed: DREADD occupancy and activation via converted clozapine. *Science.* 357(6350):503-507. doi:10.1126/science.aan2475
230. Thompson K, Khajehali E, Bradley SJ, Navarrete JS, Huang XP, Pati D, Molloy C, Bundgaard C, Sexton PM, Kash TL, Krashes MJ, Roth BL, Tobin AB (2018). DREADD Agonist 21 Is an effective agonist for muscarinic-based DREADDs in Vitro and in Vivo. *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* 1(1):61–72. doi: <https://doi.org/10.1021/acspsci.8b00012>
231. McCullough KM, Daskalakis NP, Gafford G, Morrison FG, Ressler KJ. (2018). Cell-type-specific interrogation of CeA *Drd2* neurons to identify targets for pharmacological modulation of fear extinction. *Transl Psychiatry.* 8(1):164. doi:10.1038/s41398-018-0190-y
232. Casey E, Avale ME, Kravitz A, Rubinstein M. (2022). Partial Ablation of Postsynaptic Dopamine D2 Receptors in the central nucleus of the amygdala increases risk avoidance in exploratory tasks. *eneuro.* 9(2):ENEURO.0528-21.2022. doi:10.1523/ENEURO.0528-21.2022
233. Chen Y, Molet J, Gunn BG, Ressler K, Baram TZ. (2015). Diversity of reporter expression patterns in transgenic mouse lines targeting corticotropin-releasing hormone-expressing neurons. *Endocrinology.* 156(12):4769-4780. doi: 10.1210/en.2015-1673
234. Marx V. (2022). Patch-seq takes neuroscience to a multimodal place. *Nat Methods.* 19(11): 1340-1344. doi:10.1038/s41592-022-01662-5
235. Huang M, Wang G, Lin Y, Guo Y, Ren X, Shao J, Cao J, Zang W, Li Z. (2022). Dopamine receptor D2, but not D1, mediates the reward circuit from the ventral tegmental area to the central amygdala, which is involved in pain relief. *Mol Pain.* 18:174480692211450. doi:10.1177/17448069221145096
236. Sandoval-Rodríguez R, Parra-Reyes JA, Han W, Rueda-Orozco PE, Perez IO, de Araujo IE, Tellez LA. (2023). D1 and D2 neurons in the nucleus accumbens enable positive and negative control over sugar intake in mice. *Cell Rep.* 42(3):112190. doi: 10.1016/j.celrep.2023.112190
237. d'Aquin S, Szonyi A, Mahn M, Krabbe S, Gründemann J, Lüthi A. (2022). Compartmentalized dendritic plasticity during associative learning. *Science.* 376(6590):eabf7052. doi:10.1126/science.abf7052

## 8. DOROBEK NAUKOWY DOKTORANTA

Publikacje z wynikami wchodzącymi w skład rozprawy doktorskiej:

- **Bijoch Ł**, Klos J, Pękała M, Fiołna K, Kaczmarek L, Beroun A. (2023) Diverse processing of pharmacological and natural rewards by the central amygdala. *Cell Rep.* 42
- **Bijoch Ł**, Klos J, Pawłowska M, Wiśniewska J, Legutko D, Szachowicz U, Kaczmarek L, Beroun A. Whole-brain tracking of cocaine and sugar rewards processing. *Transl. Psychiatr.* (2023) 13, 20

Lista pozostałych publikacji:

- **Bijoch Ł**, Włodkowska U, Kasztelaniec R, Pawłowska M, Pysz D, Kaczmarek L, Lapkiewicz R, Buczyński R, Czajkowski R. (2023). Novel Design and Application of High-NA Fiber Imaging Bundles for In Vivo Brain Imaging with Two-Photon Scanning Fluorescence Microscopy. *ACS Appl Mater Interfaces.* 15, 12831-12841
- Stefaniuk M, Pawłowska M, Barański M, Nowicka K, Zieliński Z, **Bijoch Ł**, Legutko D, Majka P, Bednarek S, Jermakow N, Wójcik D, Kaczmarek L. (2023). Global brain c-Fos profiling reveals major functional brain networks rearrangements after alcohol reexposure. *Neurobiol Dis.* 178, 106006
- Świerczek-Lasek B, Tolak L, **Bijoch Ł**, Stefaniuk M, Szpak P, Kalaszczynska I, Streminska W, Ciemerych MA, Archacka K. (2022). Comparison of Muscle Regeneration after BMSC-Conditioned Medium, Syngeneic, or Allogeneic BMSC Injection. *Cells.* 11, 2843
- Ziarniak K, Dudek M, Matuszewska J, **Bijoch Ł**, Skrzypski M, Celichowski J, Sliwowska JH. (2021). Two weeks of moderate intensity locomotor training increased corticosterone concentrations but did not alter the number of adropin-immunoreactive cells in the hippocampus of diabetic type 2 and control rats. *Acta Histochemica.* 123, 151751
- **Bijoch Ł**, Pękała M, Beroun A. (2021). Molekularne podstawy działania wybranych substancji psychoaktywnych. *Postępy Biochemii.* 67, 141-156
- Llamasos N, Arora V, Vij R, **Bijoch Ł**, Rojas C, Reich A, Sridharan B, Willems E, Piper DR, Scampvia L, Spicer TP, Miller CA, Holder JL, Rumbaugh G. (2020). Human SYNGAP1 Regulates the Development of Neuronal Activity by Controlling Dendritic and Synaptic Maturation. *J Neurosci.* 40, 7980-7994
- **Bijoch Ł**, Borczyk M, Czajkowski R. (2019). Bases of Jerzy Konorski's theory of synaptic plasticity. *Eur J Neurosci.* 51, 1857-1866
- Koza P, Beroun A, Konopka A, Gorkiewicz T, **Bijoch Ł**, Torres JC, Bulska E, Knapska E, Kaczmarek L, Konopka W. (2019). Neuronal TDP-43 depletion affects activity-dependent plasticity. *Neurobiol Dis.* 104499
- Bielak-Zmijewska A, Grabowska W, Ciolko A, Bojko A, Mosieniak G, **Bijoch Ł**, Sikora E. (2019) The Role of Curcumin in the Modulation of Ageing. *Int J Mol Sci.* 20, 1239
- **Bijoch Ł**. (2015). Molecular basis of learning in the hippocampus and the amygdala. *Ann West Univ Timis.* 18