Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
Wydział Biologii i Biotechnologii

ROZPRAWA DOKTORSKA

mgr Daniel Kalinowski

Zaburzenia lękowe a estrogeny – badania u myszy z deficytem receptora estrogenowego beta

Wykonana w Katedrze Anatomii i Fizjologii Zwierząt
pod kierunkiem **dr hab. Macieja Równiaka †**
dr hab. n. med. Anny Kozłowskiej, prof. UWM

Promotor pomocniczy: **dr Krystyna Bogus-Nowakowska**

Olsztyn 2023

Spis treści

Streszczenie 4

Summary 6

Wykaz skrótów w języku polskim i angielskim 9

1. Wstęp 12

Cel badań 22

Hipotezy badawcze 22

Zadania badawcze 22

2. Materiały i metody 23

2.1. Zwierzęta 23

2.2. Przygotowanie tkanek 25

2.3. Barwienia immunohistochemiczne 27

2.4. Kontrola specyficzności przeciwciał pierwszo- i drugorzędowych 28

2.5. Ocena zmian ilościowych badanych markerów 28

2.5.1. Zautomatyzowana analiza skanów liniowych 29

2.5.2. Manualne i automatyczne liczenie komórek nerwowych 31

2.6. Sieć interakcji białko-białko (PPI) 31

2.7. Analiza statystyczna 32

3. Wyniki 33

3.1. Publikacja 1 33

3.1.1. Redukcja liczby komórek nerwowych w ciele migdałowatym myszy ERβ$^{-/-}$ 33

3.1.2. Białka wiążące wapń w ciele migdałowatym myszy ERβ$^{-/-}$ i ERβ$^{+/+}$ 33

3.1.3. Somatostatyna w ciele migdałowatym myszy ERβ$^{-/-}$ i ERβ$^{+/+}$ 34

3.1.4. Receptor GABA typu A podjednostki α1 w ciele migdałowatym myszy ERβ$^{-/-}$ i ERβ$^{+/+}$ 34

3.1.5. Pęcherzykowy transporter GABA w ciele migdałowatym myszy ERβ$^{-/-}$ i ERβ$^{+/+}$ 35

3.1.6. Zwiększona immunoreaktywność kwaśnego białka włókienkowego w ciele migdałowatym myszy ERβ$^{-/-}$ i ERβ$^{+/+}$ 35

3.2. Publikacja 2 39

3.2.1. *Markery dopaminergiczne w ciele migdałowatym myszy ERβ$^{-/-}$ i ERβ$^{+/+}$* 39
3.2.2. *Markery cholinergiczne w ciele migdałowatym myszy ERβ$^{-/-}$ i ERβ$^{+/+}$* 42
3.2.3. *Analiza sieci interakcji białko-białko* 43
4. Podsumowanie 47
5. Wnioski 48
6. Piśmiennictwo 50
7. Spis rycin 66
8. Załączniki 67
8.1. Publikacja 1 wraz z oświadczeniami współautorów 67
8.2. Publikacja 2 wraz z oświadczeniami współautorów 67

Streszczenie

ZABURZENIA LĘKOWE A ESTROGENY – BADANIA U MYSZY Z DEFICYTEM RECEPTORA ESTROGENOWEGO BATA

mgr Daniel Kalinowski

Praca doktorska została wykonana w Katedrze Anatomii i Fizjologii Zwierząt Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie pod kierunkiem dr. hab. Anny Kozłowskiej, prof. UWM (promotor) i dr. Krystyny Bogus-Nowakowskiej (promotor pomocniczy).

Samice myszy z deficytem receptora estrogenowego β (ERβ) charakteryzują się zwiększonym niepokojem i nasilonymi reakcjami lękowymi. Lęk powstaje przede wszystkim w ciele migdałowatym, które generuje i reguluje wszelkie zachowania emocjonalne u zwierząt. Aktywność neuronów projekcyjnych (glutaminergicznych) tego regionu mózgowia, wyzwalających emocje jest stale hamowana przez interneurony GABAergiczne, co prowadzi do równowagi pomiędzy procesami pobudzenia i hamowania. Wiadomo jednak, że w ciele migdałowatym samic myszy z deficytem ERβ przekaźnictwo GABAergiczne jest obniżone. Ponadto, ciało migdałowate jest silnie modulowane przez układy: dopaminergiczny i cholinergiczny, które aktywują zarówno neurony glutaminergiczne, jak i GABAergiczne, a tym samym mają znaczący wpływ na pobudzająco-hamującą równowagę w tej strukturze. Biorąc pod uwagę przedstawione dane, celem niniejszej rozprawy było określenie zmian ilościowych w populacji neuronów tworzących poszczególne jądra ciała migdałowatego oraz określenie zmian ilościowych markerów układu GABAergiczego, dopaminergicznego i cholinergicznego w tych strukturach u samic myszy z deficytem ERβ. Powyższe oznaczenia zostały wykonane z wykorzystaniem metod immunohistochemicznych i zautomatyzowanej analizy skanów liniowych. Uzyskane wyniki wykazały znaczącą redukcję liczby komórek nerwowych we wszystkich głównych jądrach ciała migdałowatego u samic myszy z deficytem ERβ, którym towarzyszył istotnie wyższy poziom ekspresji astrocytów w szczególności w jądrze przyśrodkowym, podstawno-przyśrodkowym i korowym. Ponadto, w ciele migdałowatym myszy z deficytem ERβ liczba komórek nerwowych wykazujących ekspresję kalbindyny (CB) była obniżona w porównaniu do tej obserwowanej u myszy typu dzikiego, podczas gdy ekspresja pozostałych markerów GABAergicznych, tj. parwalbuminy (PV), kalretyniny

(CR), somatostatyny (SOM), receptora kwasu γ-aminomasłowego typu A z podjednostką α1 ($GABA_{A\alpha1}$) oraz pęcherzykowego transportera GABA (VGAT) utrzymywała się na niezmienionym poziomie. W odniesieniu do markerów dopaminergicznych wykazano istotny wzrost poziomu ekspresji hydroksylazy tyrozynowej (TH), transportera dopaminy (DAT) i receptora dopaminergicznego D2-podobnego (DA_2) we wszystkich analizowanych jądrach ciała migdałowatego samic myszy z deficytem ERβ. Z kolei, poziom ekspresji struktur wykazujących immunoreaktywność wobec receptora dopaminergicznego D1-podobnego (DA_1) był porównywalny w obu badanych grupach. Podobne obserwacje odnotowano również w odniesieniu do niektórych markerów cholinergicznych tj. acetylocholinoesterazy (AChE) i pęcherzykowego transportera acetylocholiny (VAChT). Dalsze analizy markerów cholinergicznych wykazały istotny wzrost liczby komórek nerwowych, w jądrach ciała migdałowatego samic myszy z deficytem ERβ, zawierających receptory cholinergiczne tj. receptor muskarynowy acetylocholiny typu 1 ($AChR_{M1}$) i receptor nikotynowy acetylocholiny alfa-7 ($AChR_{\alpha7}$) w porównaniu z myszami typu dzikiego. Przeprowadzone badania wykazały nieprawidłowości w charakterze i wzorze dystrybucji głównych markerów układu GABAergicznego, dopaminergicznego i cholinergicznego. Przyjmuje się, że obserwowane zmiany prowadzą, bądź są efektem zaburzonej sygnalizacji, która z kolei może zmieniać plastyczność synaptyczną ciała migdałowatego u badanych samic myszy. W dalszej konsekwencji, zmiany w obrębie tych populacji neuronalnych mogą prowadzić do powstawania zaburzeń lękowych. Jednak dokładne określenie roli ERβ w zachowaniach związanych z lękiem w tym procesie wymaga dalszych badań.

Summary

ANXIETY DISORDERS AND OESTROGENS – THE STUDY IN OESTROGEN RECEPTOR BETA KNOCK–OUT MICE

Daniel Kalinowski, MSc

Doctoral thesis was carried out at the Department of Animal Anatomy and Physiology, Faculty of Biology and Biotechnology, University of Warmia and Mazury in Olsztyn under the guidance of associate professor Anna Kozłowska, PhD (supervisor) and Krystyna Bogus-Nowakowska, PhD (ancillary supervisor).

The oestrogen receptor (ERβ) knock-out female mice are characterized by increased anxiety and fear responses. The amygdala regulates all emotional behaviour in animals, which generates anxiety. In this region of the brain, the activity of projection neurons (glutamatergic) is constantly inhibited by GABAergic interneurons, which leads to a balance between excitation and inhibition processes. However, it is known that in ERβ knock-out female mice, GABAergic transmission is reduced in the amygdala. Furthermore, the amygdala is strongly modulated by dopaminergic and cholinergic systems, which activate both glutamatergic and GABAergic neurons, and thus significantly affect the excitatory-inhibitory balance in this structure. This dissertation aimed to determine quantitative changes in the neuronal population and quantitative changes in GABAergic, dopaminergic, and cholinergic markers in the amygdala of ERβ knock-out female mice. These quantitative changes were estimated using immunohistochemical methods and automated line scan analysis. The results demonstrate severe neuronal deficits in all main amygdala regions of ERβ knock-out mice, accompanied by astroglia overexpression in particular in the medial, basomedial and cortical nucleus and a decrease in calbindin-expressing (CB) neurons in the amygdala of ERβ knock-out mice compared with controls. While other markers of the GABAergic system include parvalbumin (PV), calretinin (CR), somatostatin (SOM), γ-aminobutyric acid type A receptor with α1 subunit ($GABA_{A\alpha1}$) and vesicular GABA transporter (VGAT) remain unchanged. Furthermore, among dopaminergic markers, the expression of tyrosine hydroxylase (TH), dopamine transporter (DAT) and dopamine D2-like receptor (DA_2) was significantly elevated in the amygdala of mice with ERβ deprivation when compared to matched controls, whereas the content of dopamine D1-like receptor (DA_1) was not altered in the ERβ knock-out mice. Similar

observations were also noted for some cholinergic markers, i.e., acetylcholinesterase (AChE) and vesicular acetylcholine transporter (VAChT). Further analysis of cholinergic markers showed a significant increase in the number of neurons, in the nuclei of the amygdala of ERβ-deficient female mice, containing cholinergic receptors i.e., muscarinic acetylcholine type 1 receptor ($AChR_{M1}$) and alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor ($AChR_{\alpha 7}$) compared to wild-type mice. Present studies have shown that the characteristic and distribution pattern of the main markers of the GABAergic, dopaminergic, and cholinergic systems in ERβ knock-out female mice were abnormal. It is assumed that the observed changes lead to, or are the result of, impaired signalling, which in turn may alter the synaptic plasticity of the amygdala in the female mice studied. As a further consequence, changes within these neuronal populations may lead to anxiety disorders. However, determining the exact role of ERβ in anxiety-related behaviour in this process requires further research.

Wykaz publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej

Publikacja 1:

Kalinowski D, Bogus-Nowakowska K, Kozłowska A, Równiak M. *Expression of calbindin, a marker of gamma-aminobutyric acid neurons, is reduced in the amygdala of oestrogen receptor β-deficient female mice.* J Clin Med. 2022 Mar 22; 11(7): 1760. DOI: 10.3390/jcm11071760. PMID: 35407369; PMCID: PMC8999607.

IF = 4,964 punkty MEiN = 140

Publikacja 2:

Kalinowski D, Bogus-Nowakowska K, Kozłowska A, Równiak M. *Dopaminergic and cholinergic modulation of the amygdala is altered in female mice with oestrogen receptor β deprivation.* Scientific Reports. 2023 Jan 17; 13, 897. DOI: 10.1038/s41598-023-28069-2. PMID: 36650256; PMCID: PMC9845293.

IF = 4,996 punkty MEiN = 140

Wykaz skrótów w języku polskim i angielskim

ACh – acetylocholina, ang. *acetylcholine*

AChE – acetylocholinoesteraza, ang. *acetylcholinesterase*

$AChR_{M1}$ – receptor muskarynowy acetylocholiny typu 1, ang. *muscarinic acetylcholine type 1 receptor*

$AChR_{\alpha 7}$ – receptor nikotynowy acetylocholiny alfa-7, ang. *alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor*

BL – jądro podstawno-boczne ciała migdałowatego, ang. *basolateral nucleus of the amygdala*

BM – jądro podstawno-przyśrodkowe ciała migdałowatego, ang. *basomedial nucleus of the amygdala*

CaBP – białka wiążące wapń, ang. *calcium-binding proteins*

CB – kalbindyna, ang. *calbindin*

CE – jądro środkowe ciała migdałowatego, ang. *central nucleus of the amygdala*

ChAT – acetylotransferaza choliny, ang. *choline acetyltransferase*

CO – jądro korowe ciała migdałowatego, ang. *cortical nucleus of the amygdala*

CR – kalretynina, ang. *calretinin*

CY3 – cyjanina-3, ang. *cyanine 3*

DA – dopamina, ang. *dopamine*

DA_1 – receptor dopaminy typu 1, ang. *dopamine D1-like receptor*

DA_2 – receptor dopaminy typu 2, ang. *dopamine D2-like receptor*

DAB – 3,3′– diaminobenzydyna, ang. *3,3′– diaminobenzidine*

DAT – transporter dopaminy, ang. *dopamine transporter*

DPX – medium zamykające do skrawków histologicznych, ang. *mounting medium for histology slides*

Dv – gęstość numeryczna, ang. *volumetric density*

E_1 – estron, ang. *oestrone*

E_2 – 17β-estradiol, ang. *17β-oestradiol*

E_3 – estriol, ang. *oestriol*

E_4 – estetrol, ang. *oesterol*

ERα – receptor estrogenowy α, ang. *oestrogen receptor* α

ERβ – receptor estrogenowy β, ang. *oestrogen receptor* β

$ER\beta^{-/-}$ – myszy z deficytem receptora estrogenowego β, ang. *oestrogen receptor β knock-out mice*

$ER\beta^{+/+}$ – myszy kontrolne typu dzikiego, ang. *oestrogen receptor β wild-type mice*

GABA – kwas γ-aminomasłowy, ang. *γ-aminobutyric acid*

$GABA_A$ – receptor GABA typu A, ang. *γ-aminobutyric acid type A receptor*

$GABA_{A\alpha1}$ – receptor GABA typu A podjednostki α1, ang. *γ-aminobutyric acid type A receptor with α1 subunit*

GAD – dekarboksylaza glutaminianowa, ang. *glutamate dehydrogenase*

GFAP – marker kwaśnego białka włókienkowego, ang. *glial fibrillary acidic protein*

GO – wzbogacona analiza, ang. *gene ontology resource*

LA – jądro boczne ciała migdałowatego, ang. *lateral nucleus of the amygdala*

mAChR – receptor muskarynowy acetylocholiny, ang. *muscarinic acetylcholine receptor*

ME – jądro przyśrodkowe ciała migdałowatego, ang. *medial nucleus of the amygdala*

nAChR – receptor nikotynowy acetylocholiny, ang. *nicotinic acetylcholine receptor*

NeuN – swoiste jądrowe białko dojrzałych neuronów, ang. *neuronal nuclear protein*

PBS – bufor fosforanowym, ang. *phosphate-buffered*

PFA – paraformaldehyd, ang *paraformaldehyde*

PTSD - zespół stresu pourazowego, ang. *post-traumatic stress disorder*

PPI – analiza sieci interakcji, ang. *protein-protein interaction*

PV – parwalbumina, ang. *parvalbumin*

SOM – somatostatyna, ang. *somatostatin*

STRING – biologiczna baza danych interakcji białko-białko, ang. *search tool for the retrieval of interacting protein*

TH – hydroksylaza tyrozynowa, ang. *tyrosine hydroxylase*

VAChT – pęcherzykowy transporter acetylocholiny, ang. *vesicular acetylcholine transporter*

VGAT – pęcherzykowy transporter GABA, ang. *vesicular γ-aminobutyric acid transporter*

1. Wstęp

Zaburzenia lękowe stanowią obszerną grupę zaburzeń psychicznych, do których zaliczyć można przede wszystkim uogólnione zaburzenia lękowe, lęk napadowy, fobie specyficzne, agorafobie, lęk społeczny i separacyjny. W oparciu o klasyfikację zaburzeń psychicznych Amerykańskiego Towarzystwa Psychiatrycznego (ang. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*), uogólnione zaburzenia lękowe obejmują uporczywy i nadmierny niepokój, który zakłóca codzienne funkcjonowanie, podczas gdy lęk napadowy charakteryzuje się nawracającymi atakami paniki, będącymi kombinacją negatywnych odczuć fizycznych i psychicznych. Z kolei, fobie specyficzne to nadmierny i uporczywy lęk przed określonym przedmiotem, sytuacją lub czynnością, która na ogół nie wywołuje jego odczuwania. Odmiennym typem zaburzenia lękowego jest agorafobia objawiająca się nieuzasadnionym, chorobliwym lękiem przed otwartą przestrzenią, opuszczaniem pomieszczenia, czy też tłumem. Natomiast lęk społeczny charakteryzuje się zwiększonym niepokojem i dyskomfortem związanym z byciem zawstydzonym, upokorzonym bądź odrzuconym przez społeczeństwo, a lęk separacyjny w uogólnieniu to lęk przed rozłąką (Kupfer 2015). Należy podkreślić, że w skali globalnej, zaburzenia lękowe dotykają od 3% do 8% osób rocznie podczas gdy, od 5% do 30% osób badanych doświadcza ich przez całe życie (Altwaijri i in. 2020). Zaburzenia te stanowią poważny problem zdrowotny i społeczny, ponieważ często towarzyszy im depresja, uzależnienie od narkotyków czy też alkoholu (Craske i Stein 2016). Ponadto, wykazano, że dotykają one dwa razy częściej kobiety niż mężczyzn (Steel i in. 2014; Craske i Stein 2016).

Kluczową strukturą mózgowia ssaków odpowiedzialną za lęk jest ciało migdałowate (łac. *amygdala*). Jest to niewielka parzysta struktura, leżąca wewnątrz przedniej części płata skroniowego prawej i lewej półkuli mózgowia. Ciało migdałowate zaangażowane jest w funkcje emocjonalne, m.in. odczuwanie strachu, lęku, a także agresję. Dowiedziono, że jego aktywność ma znaczenie podczas procesu uczenia się i tworzenia pamięci emocjonalnej (LeDoux 2003; Sah i in. 2003; Rajmohan i Mohandas 2007). Istotny udział ciała migdałowatego wykazano również w modulowaniu zachowań społecznych i seksualnych zwierzęta (Nomura i in. 2002; Bhatnagar i in. 2004; Baum 2009; Pape i Pare 2010).

Ciało migdałowate charakteryzuje się niejednorodną strukturą złożoną z około trzynastu różnych jąder, które razem tworzą odrębne kompleksy (Swanson i Petrovich 1998; Pabba 2013; Janak i Tye 2015) o różnym pochodzeniu embrionalnym (Swanson i Petrovich 1998; Martínez-García i in. 2002; Pabba 2013) oraz morfologii komórek (Sah i in. 2003; Równiak i in. 2003). W obrębie tej struktury wyróżnia się:

- kompleks podstawno-boczny (ewolucyjnie młodszy), w skład którego wchodzi jądro boczne (LA), podstawno-boczne (BL), podstawno-przyśrodkowe (BM) i korowe (CO) (Swanson i Petrovich 1998; Pabba 2013);
- kompleks przyśrodkowy (ewolucyjnie starszy), składający się z jądra przyśrodkowego (ME) i środkowego (CE) (Swanson i Petrovich 1998; Puelles i in. 2000; Martínez-García i in. 2002).

Należy zaznaczyć, że oba kompleksy jądrowe ciała migdałowatego tworzą dwie główne klasy komórek tj. neurony piramidalne i niepiramidalne (Sah i in. 2003; Równiak i in. 2003). Neurony piramidalne to neurony projekcyjne (80% całej populacji komórek), wykorzystujące głównie jako neuroprzekaźnik glutaminian (pobudzenie) (McDonald 1996; McDonald i Mascagni 2001; Mascagni i in. 2009). Natomiast neurony niepiramidalne to w większości interneurony (Muller i in. 2005), stanowiące pozostałe 20% neuronów ciała migdałowatego (Kemppainen i Pitkänen 2000), wykorzystujące głównie jako substancję przekaźnikową kwas γ-aminomasłowy (GABA, hamowanie) (McDonald i Pearson 1989; Kemppainen i Pitkänen 2000). W warunkach fizjologicznych, aktywność neuronów projekcyjnych (zwanych głównymi) odpowiedzialnych za odczuwanie emocji, które są efektem ich pobudzenia, jest stale hamowana przez interneurony (Prager i in. 2016). Taka interakcja pomiędzy tymi komórkami nerwowymi umożliwia utrzymanie równowagi pomiędzy procesami pobudzenia i hamowania zachodzącymi w tym regionie mózgowia. Należy zaznaczyć, że wszelkiego rodzaju zakłócenia tej równowagi mogą prowadzić do rozwoju poważnych chorób psychicznych, w tym zaburzeń lękowych (Seidlitz i Diener 1998; Canli i in. 2002).

Za utrzymanie równowagi pomiędzy pobudzeniem a hamowaniem w ciele migdałowatym ssaków, oprócz glutaminianu czy GABA, odpowiadają również hormony steroidowe

m.in. estrogeny (Nomura i in. 2002; Baker i in. 2004; Walf i Frye 2007; Sugiyama i in. 2010; Irwin i in. 2012; Oyola i in. 2012; Vargas i in. 2016). Powszechnie wiadomo, że estrogeny, do których zaliczamy: estron (E_1), biologicznie czynny 17β-estradiol (E_2), estriol (E_3) i estetrol (E_4) odgrywają ważną rolę w regulacji licznych procesów biologicznych (Chen i in. 2019). Uważane są za jedne z istotniejszych regulatorów funkcji rozrodczych samic, u których ich głównym miejscem syntezy są jajniki, ale także mogą powstawać one w komórkach mezenchymalnej tkanki tłuszczowej, osteoblastach, chondrocytach, miocytach aorty, śródbłonku naczyń, korze nadnerczy oraz w licznych regionach mózgowia (Simpson 2003). W odniesieniu do funkcji rozrodczych samic wiadomo, że estrogeny wpływają na rozwój pierwszo- i drugorzędowych cech płciowych, a także zwiększenie gęstość kości, obniżenie poziom cholesterolu oraz utrzymanie równowagi wodno-elektrolitowej (Guyton i Hall 2011; Nilsson i Gustafsson 2011). Ponadto hormony te są zaangażowane w prawidłowe funkcjonowanie mózgowia ssaków poprzez modulowanie jego neurotransmisji i utrzymywanie właściwej równowagi pomiędzy procesami pobudzania i hamowania (Barth i in. 2015), co zostało wykazane m.in. w korze przedczołowej, hipokampie, podwzgórzu, jądrze półleżącym oraz ciele migdałowatym (Del Río i in. 2018). Dotychczasowo zgromadzone dane sugerują, że wahania poziomu estrogenów wywierają modulujący wpływ na funkcjonalną aktywację m.in. płata przedczołowego i ciała migdałowatego podczas wygaszania strachu. Przykładowo, podwyższony poziom E_2 był powiązany z redukcją strachu zarówno u samic szczurów jak i kobiet (Milad i in. 2009, 2010). Z drugiej strony, niski poziom estrogenu u kobiet cierpiących na zespół stresu pourazowego (PTSD) wiązał się ze zwiększonym ryzykiem występowania u nich zaburzeń lękowych (Glover i in. 2013). Co więcej, u szczurów stwierdzono wyraźne różnice płciowe w reakcji na stres, której siła warunkowana była poziomem E_2 (Dalla i Shors 2009). Istniejące badania sugerują również, że hormon ten może poprawiać zdolności przechowywania wygaszonych wspomnień strachu, poprzez modulację aktywności neuronalnej i plastyczności synaptycznej ciała migdałowatego (Zeidan i in. 2011). Ustalenia innych badaczy dowodzą, że estrogenowa terapia zastępcza prowadzi do obniżenia poziomu stresu, który jest szczególnie odczuwany m.in. przez kobiety w okresie postmenopauzalnym (Morrison i in. 2006; Herrera i in. 2017).

Powyższe dane wyraźnie sugerują, że estrogeny odgrywają kluczową rolę w regulacji wielu procesów zachodzących w organizmie samic. Biologiczne działanie tych hormonów steroidowych zależy od ich związania się z receptorami estrogenowymi (ERα, ERβ), których występowanie potwierdzono w ciele migdałowatym (Merchenthaler i in. 2004; Murakami 2016; Równiak 2017). O ile wiadomo, że ERα uczestniczy w regulacji funkcji rozrodczych, zachowań seksualnych samic i agresywnych zachowań samców, to ERβ ma istotny wpływ na tłumienie zachowań agresywnych u samców (Ogawa i in. 1997, 1999; Handa i in. 2012). W odniesieniu do zachowań lękowych, wydaje się, że ERα i ERβ pełnią funkcje przeciwstawne. Wysunięto hipotezę, że agoniści ERα mają właściwości nasilające poczucie lęku i niepokoju tzw. anksjogenne (Lund i in. 2005), podczas gdy agoniści ERβ tłumią te stany (Weiser i in. 2010). Dodatkowo zaobserwowano, że nieprawidłowy poziom estrogenu może przyczyniać się do generowania lęku u samic myszy, a ERβ jest niezbędnym elementem modulującym ten wpływ. Z kolei, w badaniach z udziałem samic myszy z deficytem ERβ obserwowano istotnie nasilone reakcje lękowe (Krężel i in. 2001; Lund i in. 2005; Oyola i in. 2012) co znalazło wyraźne odzwierciedlenie w testach behawioralnych. Wykazano bowiem, że ich lokomocja ogółem była istotnie obniżona, co było w dużej mierze związane ze wzrostem tigmotaksji oraz spędzaniu przez te zwierzęta mniejszej ilości czasu w otwartym ramieniu podwyższonego labiryntu krzyżowego (ang. *elevated plus maze*). Dalsze badania nad tymi myszami wykazały również znaczące różnice genotypowe pomiędzy samicami a samcami oraz myszami kontrolnymi typu dzikiego (Krężel i in. 2001; Imwalle i in. 2005). Przykładowo, samce z deficytem ERβ, jak i myszy typu dzikiego, nie wykazywały znacznego wzrostu tigmotaksji. Ponadto, nie obserwowano u nich zaburzeń związanych z lokomocją oraz zmniejszeniem ilości czasu poświęconego na eksplorowanie obszarów testowych (Ogawa i in. 1997, 1999; Krężel i in. 2001). Interesujący jest również fakt, że u samców z deficytem tego receptora, jak i myszy typu dzikiego, nie odnotowano zwiększonego niepokoju, który był charakterystyczny dla samic myszy z deficytem ERβ (Krężel i in. 2001). Biorąc pod uwagę powyższe badania, samice myszy pozbawione ERβ wykazują spójne nieprawidłowości behawioralne (Krężel i in. 2001; Lund i in. 2005; Oyola i in. 2012), które czynią je właściwym zwierzęcym modelem do badania zaburzeń lękowych. Należy jednak podkreślić, że mechanizmy, które zwiększają lęk u tych myszy są jak dotąd nieznane.

Dotychczasowe badania prowadzone na tych myszach wykazały poważny ubytek komórek nerwowych, który nasilał się wraz z wiekiem m.in. w jądrze przyśrodkowym ciała migdałowatego (Wang i in. 2001). Co więcej, podawanie bikukuliny (antagonisty receptora GABA typu A, $GABA_A$) myszom typu dzikiego, wywoływało efekty podobne do tych, które były obserwowane w ciele migdałowatym myszy z deficytem ERβ (Krężel i in. 2001). Obserwacje te sugerują istotny udział GABA w tym procesie. Tymczasem dalsze badania przeprowadzone u tych zwierząt, wskazywały na niezmienioną ekspresję receptora $GABA_A$ i dekarboksylazy glutaminianowej (GAD) (Krężel i in. 2001). Należy jednak pamiętać, że procesy hamowania zachodzące w ciele migdałowatym mogą być zaburzone, podobnie jak w hipokampie, poprzez upośledzenie funkcji neuronów GABAergicznych lub pośrednio poprzez wpływ na połączenia synaptyczne między neuronami pobudzającymi a hamującymi w wyniku akumulacji białka tau (Li i in. 2017). Zatem, można wywnioskować, że zmieniona sygnalizacja GABA u samic myszy z deficytem ERβ może wpływać na plastyczność synaptyczną w ciele migdałowatym, co w efekcie może doprowadzić do wzrostu lęku.

Jak wspomniano wcześniej, 20% całej populacji neuronów ciała migdałowatego stanowią interneurony (Pitkanen i Amaral 1994; McDonald i Mascagni 2001; Mascagni i in. 2009). Znacząca ich część wykazuje ekspresję białek wiążących wapń (CaBP) tj. kalbindyny (CB), parwalbuminy (PV) i kalretyniny (CR) (Kemppainen i Pitkänen 2000; McDonald i Mascagni 2001; Prager i in. 2016), których funkcje związane są głównie z mechanizmami hamowania w tej strukturze mózgowia (Kemppainen i Pitkänen 2000; McDonald i Mascagni 2001). Ponadto, w kompleksie podstawno-bocznym wchodzącym w skład ciała migdałowatego samic kawii domowej, zaobserwowano wzrost liczby komórek nerwowych wykazujących ekspresję CB oraz PV, który był odpowiednio wyższy niż u samców tego gatunku o około 11% i 19% (Równiak i in. 2015). Na uwagę zasługuje również fakt, że w ciele migdałowatym szczura i małp większość CaBP-pozytywnych komórek nerwowych (≥90%) wykazuje kolokalizacje z GABA (McDonald i Mascagni 2001; Mascagni i in. 2009). Co więcej, aksony komórek nerwowych wykazujących ekspresję PV unerwiają perykariony komórek piramidalnych (Sorvari i in. 1995, 1996; Woodruff i Sah 2007), podczas gdy aksony komórek nerwowych CB-pozytywnych unerwiają dendryty tych komórek i w ten sposób hamują ich aktywność (Muller i in. 2007). Natomiast komórki nerwowe,

które zawierają CR często zmniejszają aktywność interneuronów (Gulyás i in. 1996; Melchitzky i Lewis 2008), a ich pobudzanie prowadzi do zniesienia hamowania komórek piramidalnych, co pozwala na zachowanie równowagi pomiędzy procesem pobudzenia i hamowania w ciele migdałowatym (Meskenaite 1997; Gonchar i Burkhalter 1999). Interneurony ciała migdałowatego wykazują również ekspresję neuropeptydu SOM (McDonald i Mascagni 2002; Równiak i in. 2008). Neurony te unerwiają dystalne dendryty komórek piramidalnych, tym samym modulują ich aktywność pobudzającą (Song i in. 2021). Zdecydowana większość neuronów zawierających SOM ciała migdałowatego samców szczura wykazuje immunoreaktywność wobec GABA (>80%). Co więcej, 90% spośród tych interneuronów kolokalizuje z CB, ale nie z PV lub CR (McDonald i Mascagni 2002). Warto w tym miejscu podkreślić, że nieliczne komórki nerwowe CB-pozytywne i liczne zawierające PV wykazują obecność ERβ, podczas gdy komórki nerwowe CR-pozytywne zwykle zawierają ERα (Kritzer 2006; Równiak 2017).

Dotychczas przeprowadzone badania wykazały istnienie silnego związku pomiędzy sygnalizacją estrogenową a aktywnością głównych neurotransmiterów ośrodkowego układu nerwowego, tj. glutaminianem, GABA, dopaminą (DA), serotoniną lub acetylocholiną (ACh) (Wu i in. 1999; Barth i in. 2015). Ponadto wykazano, że substancje te wchodzą w interakcje z estrogenami (Genazzani i in. 1999; McEwen i Alves 1999; Mitsushima 2010; Barth i in. 2015), co jest niezbędnym warunkiem umożliwiającym kontrolowanie podstawowych zachowań emocjonalnych. Istotny jest również fakt, że neurotransmitery te mogą wpływać oraz pośredniczyć w przekazywaniu informacji między licznymi regionami mózgowia (Briand i in. 2007; Krichmar 2008), np. korą przedczołową, prążkowiem, hipokampem, a także ciałem migdałowatym (Scatton i in. 1980; Baxter i Chiba 1999; Hornung 2003; Hyman i in. 2006; Zaldivar i Krichmar 2013).

Ciało migdałowate jest strukturą o bogatym systemie połączeń aferentnych i eferentnych, zarówno podkorowych, jak i korowych (Wright 2020). Wykazano, że otrzymuje ono liczne projekcje z pola brzusznego nakrywki oraz istoty czarnej, regionów mózgowia bogatych w komórki nerwowe syntezujące i uwalniające DA (Asan 1997, 1998; Pinard i in. 2008). Komórki te, tzw. neurony dopaminergiczne, unerwiając zarówno neurony projekcyjne oraz interneurony (Pinard i in. 2008; Muller i in. 2009), generują bodźce awersyjne

(Lalumiere i in. 2004; Pezze i Feldon 2004; Chu i in. 2012) i apetytywne (Nakano i in. 1987; See 2005). Co więcej, wykazano, że poziom uwalnianej DA z ciała migdałowatego, ulega znacznemu zwiększeniu w warunkach stresowych, a towarzyszący mu wzrost aktywności receptorów tej katecholaminy jest konieczny do wytworzenia pamięci emocjonalnej związanej właśnie ze strachem (Oei i King 1980; Guarraci i in. 1999, 2000; Fadok i in. 2009; Salinas-Hernández i Duvarci 2021). Dalsze badania w tym obszarze, wskazały na istotny związek strachu m.in. w stanach lękowych z poziomem DA (Blackburn i in. 1992; Pezze i Feldon 2004; Engin i Treit 2008). Jednakże ostateczny wpływ tej katecholaminy na obwody ciała migdałowatego jest stosunkowo niejasny.

Powszechnie wiadomo, że oddziaływanie DA na mózgowie jest uwarunkowane prawidłowym funkcjonowaniem receptorów dopaminowych, których u ssaków zidentyfikowano pięć typów (D_1-D_5). Receptory te można podzielić na dwie grupy tj. D_1-podobne (DA_1: D_1 i D_5) i D_2-podobne (DA_2: D_2, D_3 i D_4) (Kebabian i Calne 1979), które wykazują odmienne właściwości. Mianowicie, pobudzenie DA_1 wzmacnia aktywność komórek nerwowych, podczas gdy aktywacja DA_2 ją hamuje (Kröner i in. 2005; Beaulieu i Gainetdinov 2011). Z kolei, wzajemna integracja DA_1 i DA_2 jest niezbędna do generowania większości zachowań emocjonalnych (Braun i Chase 1986; Walters i in. 1987; Zarrindast i in. 2006) w tym modulowania lęku (de la Mora i in. 2010, 2012; Bananej i in. 2012; Matsuda i in. 2012). W warunkach fizjologicznych impulsacja dopaminergiczna może być również regulowana bezpośrednio przez estrogeny m.in. poprzez degradację, wychwyt zwrotny i regenerację DA, a także pośrednio poprzez regulację jej uwalniania (Jacobs i D'Esposito 2011; Barth i in. 2015) lub zmniejszenie jej powinowactwa do swoistego transportera (Disshon i in. 1998). Mechanizmy te są uwarunkowane nie tylko obecnością i odziaływaniem estrogenów, ale także prawidłową sygnalizacją ERβ (Maharjan i in. 2005; Imwalle i in. 2005; Imamov i in. 2005; Vargas i in. 2016; Vandegrift i in. 2017).

Biorąc pod uwagę powyższe dane, wydaje się, że impulsacja dopaminergiczna w ciele migdałowatym u myszy z deficytem ERβ może być poważnie zaburzona. Jednak dotychczas brak jest danych na ten temat. U tych samic, wykazano jedynie obniżenie poziomu DA w jądrze ogoniastym (Imwalle i in. 2005). Podobną obserwację odnotowano w jądrze

grzbietowym szwu i polu brzusznym nakrywki u samic szczurów, które wcześniej poddano zabiegowi owariektomii (Liu i in. 2022). Tymczasem, aktywacja ERβ zmieniała poziomy metabolitu DA tj. kwasu homowanilinowego w korze przedczołowej i hipokampie nie powodując jednocześnie zmiany w jego poziomie w prążkowiu i przegrodzie (Jacome i in. 2010). Z kolei, podwyższony poziom E_2 istotnie zmniejszał aktywność hydroksylazy tyrozynowej (TH) w podwzgórzu samic szczurów (Beyer i in. 1991). Powyższe dane wyraźnie sugerują istotny i modulujący wpływ estrogenów na impulsację dopaminergiczną, który jest zróżnicowany w zależności od analizowanego obszaru mózgowia.

Obok sygnałów otrzymywanych z neuronów dopaminergicznych ciało migdałowate otrzymuje również liczne projekcje z brzusznej gałki bladej i istoty bezimiennej, które są obszarami mózgowia bogatymi w komórki nerwowe syntetyzujące i uwalniające ACh, tzw. neurony cholinergiczne (Carlsen i in. 1985; Kordower i in. 1989). Komórki te poprzez receptory muskarynowe i nikotynowe (Washburn i Moises 1992; Power i in. 2003; Pape i in. 2005; Zhu i in. 2005; Klein i Yakel 2006; Muller i in. 2013) aktywują neurony projekcyjne i interneurony (Muller i in. 2011). Receptory muskarynowe (mAChR: M_1-M_5) zarówno pobudzają, jak i hamują włókna postsynaptyczne (Swenson i Gulledge 2017), podczas gdy receptory nikotynowe (nAChR: α2-10, β2-4) umożliwiają tylko ich pobudzenie (Albuquerque i in. 2009; Gotti i in. 2009). Uwalnianie ACh w ciele migdałowatym jest związane z różnymi bodźcami awersyjnymi i apetytywnymi, do których możemy zaliczyć m.in. generowanie, warunkowanie i wygaszanie strachu (Vazdarjanova i McGaugh 1999; Boccia i in. 2009; Jiang i in. 2016), wzbudzanie emocji poprzez konsolidację pamięci (McGaugh 2004), a także zachowanie związane z poszukiwaniem substancji psychoaktywnych (See 2005). Badania dostarczają również interesujących danych na temat udziału komponenty przywspółczulnej autonomicznego układu nerwowego w modulacji odczuwania strachu i lęku. Przykładowo, hamowanie wtórnego wychwytu zwrotnego choliny ze szczeliny synaptycznej, który jest związany z syntezą ACh, pełni funkcję ankjolityczną, gdyż jest on ściśle zaangażowany w powstawanie zaburzeń lękowych (Sienkiewicz-Jarosz i in. 2000; Degroot i in. 2001). Co więcej, wykazano u gryzoni, że wzrost poziomu lęku był ściśle skorelowany ze zwiększoną aktywnością nAChR (Picciotto i in. 2015). Z kolei, zastosowanie antagonisty $nAChR_{\alpha 7}$ lub deficyt tego receptora

wywierało efekt anksjolityczny (Mineur i in. 2016). W przypadku ciała migdałowatego wzrost ekspresji $AChR_{\alpha 7}$ pełnił bardzo ważną rolę w modulowaniu funkcji tego regionu mózgowia (Neves i Grace 2019). Dalej, wykazano, że bezpośrednia infuzja oksotremeryny, będąca agonistą $AChR_{M1}$, do tej struktury mózgowia u samców szczura wzmacniała wygaszanie strachu (Boccia i in. 2009). Warto także zauważyć, że estrogeny, często poprzez ERβ, modulują aktywność neuronów cholinergicznych skupionych w wybranych strukturach mózgowia, a także regulują poziom enzymów uczestniczących w procesie syntezy i rozkładu ACh, czyli acetylotransferazy choliny (ChAT) oraz acetylocholinoesterazy (McMillan i in. 1996; Martins i in. 2012; Bansal i Chopra 2021). Ponadto badania pokazują, że estrogeny zwiększają zwrotny wychwyt choliny i ChAT w hipokampie oraz płacie czołowym samic szczura (Simpkins i in. 1997). Interesujący jest także fakt, że całkowita owariektomia u samic szczurów zmniejszała wychwyt zwrotny choliny oraz aktywność ChAT (Luine 1985; O'Malley i in. 1987; Wu i in. 1999), podczas gdy zastosowanie terapii estrogenowej odwracało ten efekt (Gibbs 1996; Wu i in. 1999). Co więcej, podawanie estrogenów samicom szczurów z usuniętymi jajnikami, prowadziło do wzrostu liczby mAChR w podwzgórzu, podczas gdy ich liczba ulegała obniżeniu w polu przedwzrokowym (Dohanich i in. 1982). Podobną zależność zaobserwowano w hipokampie szczurów po owarektomii (El-Bakri i in. 2002; Cardoso i in. 2004), tylko z tą różnicą, że terapia estrogenowa zastosowana u tych zwierząt obniżała ekspresję mAChR w tej strukturze mózgowia (El-Bakri i in. 2002). Tymczasem, u 22-24 miesięcznych samic myszy poddanych zabiegowi owariektomii, w hipokampie ekspresja białka podtypów mAChR nie zmieniła się w porównaniu ze zwierzętami, którym podano E_2 (Vaucher i in. 2002). Dane te wskazują na zróżnicowany poziom ekspresji markerów cholinergicznych, który może wynikać z różnic gatunkowych, a także tych które związane są z płcią, analizowanymi regionami mózgowia oraz statusem hormonalnym. Należy zatem podkreślić, że zmiany w impulsacji cholinergicznej należy rozpatrywać z uwzględnieniem powyższych czynników.

Mechanizmy opisane w niniejszym rozdziale zależą w głównej mierze od złożonej sieci funkcjonalnych powiązań między różnymi neurotransmiterami i neuromodulatorami. Wśród tych ścisłych zależności szczególne znaczenie mają interakcje pomiędzy białkami ze względu na ich wszechstronność, specyficzność i zdolność adaptacji

(Szklarczyk i in. 2021). Biologiczne bazy danych tj. STRING (ang. *search tool for the retrieval of interacting proteins*) (Szklarczyk i in. 2019), jako najnowsze osiągnięcia bioinformatyczne, mające na celu zintegrowanie wszystkich znanych i przewidywanych powiązań między białkami, w tym zarówno interakcji fizycznych, jak i powiązań funkcjonalnych. STRING to baza gromadząca i oceniająca dowody z wielu źródeł m.in. literatury naukowej, szlaków metabolicznych, matematycznego prawdopodobieństwa interakcji, danych dotyczących koekspresji i informacji genomowych oraz analizy tych danych w odniesieniu do różnych organizmów zwierzęcych (Szklarczyk i in. 2015, 2019, 2021). Wydaje się, że technologia ta jest właściwym narzędziem, które może ułatwić identyfikacje procesów biologicznych związanych z zachowaniami emocjonalnymi i funkcjami poznawczymi u myszy domowej warunkowanych aktywnością estrogenów przy udziale ERβ, oraz neuronów dopaminergicznych i cholinergicznych.

Cel badań

Biorąc pod uwagę przedstawione fakty, celem podjętych badań było określenie zmian ilościowych w całkowitej populacji neuronów tworzących jądra ciała migdałowatego, a także zmian ilościowych markerów układu GABAergiczego, dopaminergicznego i cholinergicznego w ciele migdałowatym dorosłych samic myszy z deficytem ERβ, które charakteryzują się zwiększonym niepokojem i nasilonymi reakcjami lękowymi (JAX#004745).

Hipotezy badawcze

Zmieniona sygnalizacja estrogenowa w wyniku deficytu ERβ powoduje istotne zaburzenia w neurotransmisji ciała migdałowatego, co ostatecznie prowadzi do zachowań lękowych. Zaburzenia te obejmują przede wszystkim:

1. zmiany ilościowe w całkowitej populacji neuronów i w poszczególnych subpopulacjach GABAergiczych ciała migdałowatego (**Publikacja 1**);
2. zmiany ilościowe w zaopatrzeniu dopaminergicznym i cholinergicznym ciała migdałowatego (**Publikacja 2**).

Zadania badawcze

a) Ocena zmian ilościowych w całkowitej populacji neuronów i w poszczególnych populacjach hamujących ciała migdałowatego oraz ekspresji receptora kwasu γ-aminomasłowego (GABA) klasy A z podjednostką α1 (i transportera GABA), które stanowić mogą podłoże neuroanatomiczne zaburzeń lękowych u myszy z deficytem ERβ **(Publikacja 1).**

b) Ocena nieprawidłowości w neurotransmisji dopaminergicznej i cholinergicznej w obrębie ciała migdałowatego, które stanowić mogą istotny czynnik zaburzeń lękowych u myszy z deficytem ERβ **(Publikacja 2).**

2. Materiały i metody

Szczegóły dotyczące wszystkich wykorzystanych w prezentowanej pracy odczynników chemicznych, a także użytego sprzętu laboratoryjnego, znajdują się w Tabeli 1 i 2.

2.1. Zwierzęta

Dojrzałe płciowo samice myszy (w wieku 6–8 tygodni), tj. ERβ$^{-/-}$ (homozygota B6.129P2-Esr2^{tm1Unc}/J) oraz ERβ$^{+/+}$ (C57BL/6J) zostały pozyskane z Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) i przetransportowane do zwierzętarni na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Okres aklimatyzacji myszy przed rozpoczęciem badania trwał siedem dni i w tym czasie zwierzęta przebywały w warunkach kontrolowanej temperatury (21 ± 1 °C), przepływu powietrza (do 12–20 wymian powietrza na godzinę) oraz oświetlenia (oświetlenie przez 12 godzin w cyklu dzień/noc – od 6:00 do 18:00). Zwierzęta były trzymane w odkażonych klatkach polipropylenowych, w grupach po 2-3 osobniki, w celu uniknięcia stresu związanego z izolacją. Miały one zapewniony swobodny dostęp do wody i standardowej mieszanki zbożowej pozbawionej fitoestrogenów (LabDiet® JL Rat and Mouse/auto 6F 5K52). Wszelkie procedury związane z opieką i obchodzeniem się ze zwierzętami były zgodne z dyrektywą 2010/63/UE Unii Europejskiej w sprawie doświadczeń na zwierzętach **(Publikacja 1 i 2)**.

Tabela 1. Szczegółowe informacje dotyczące użytych odczynników chemicznych i sprzętu laboratoryjnego

Table 1. *Detailed information on materials and laboratory equipment used*

Materiały i sprzęt	**Kody**	**Producent**	**Lokalizacja**
3,3'-Diaminobenzydyna	D7679	Sigma Aldrich	Taufkirchen, Niemcy
Bufor fosforanowy	P7994	Sigma Aldrich	Taufkirchen, Niemcy
Chlorek sodu	07982	Sigma Aldrich	Taufkirchen, Niemcy
DPX medium histologiczne	44581	Sigma Aldrich	Taufkirchen, Niemcy
Etanol	396480427	POCH	Gliwice, Polska
Glicerol	G9012	Sigma Aldrich	Taufkirchen, Niemcy
Kriostat	HM525	Zeiss	Oberkochen, Niemcy
Metanol	1424109	Sigma Aldrich	Taufkirchen, Niemcy
Medium mrożeniowe	14020108926	Leica Microsystems	Wetzlar, Niemcy
Nadtlenek wodoru	1.08597	Sigma Aldrich	Taufkirchen, Niemcy
Paraformaldehyd pH 7.4	1040051000	Sigma Aldrich	Taufkirchen, Niemcy
Sacharoza	363-117720907	ALCHEM	Toruń, Polska
Surowica ośla	17-000-121	Jackson ImmunoResearch	Cambridge, UK
Surowicza albumina bydlęca	A7030	Sigma Aldrich	Taufkirchen, Niemcy
Timerosal	T5125	Sigma Aldrich	Taufkirchen, Niemcy
Triton X-100	9036-19-5	Sigma Aldrich	Taufkirchen, Niemcy
Tween-20	11332465001	Sigma Aldrich	Taufkirchen, Niemcy
Wilgotna komora	R64001-E	PyramidInnovation Ltd.	Chaucer Business Park, UK

2.2. Przygotowanie tkanek

Po zakończeniu okresu aklimatyzacji, wszystkie myszy ERβ$^{-/-}$ i ERβ$^{+/+}$ poddano tym samym procedurom laboratoryjnym. Najpierw monitorowano cykl rujowy, poprzez wykonanie bezpośredniego wymazu z pochwy. Zabieg ten był konieczny, gdyż zarówno ERβ$^{-/-}$, jak i ERβ$^{+/+}$ wykazują normatywne wzorce poziomów hormonów steroidowych (Walf i in. 2009), a te zmieniają się podczas cyklu rujowego, co może wpływać na zachowania lękowe (Dombret i in. 2020). Dlatego, aby uniknąć efektu anksjolitycznego indukowanego estrogenem, wszystkie myszy poddano procedurom doświadczalnym w metestrusie, ponieważ faza ta charakteryzuje się niskim poziomem tego hormonu (Nilsson i in. 2015). Myszy znieczulano dootrzewnowym wstrzyknięciem pentobarbitalu (Morbital, Biowet, Polska; 2 ml/kg) zgodnie z wytycznymi *Humane Society Veterinary Medical Association*, a po ustaniu oddechu natychmiast przeprowadzono perfuzję dosercową 0,9% solą fizjologiczną, a następnie 4% paraformaldehyd (PFA) rozpuszczonym w 0,1 M buforze fosforanowym (PBS) o pH 7,4. Po perfuzji, mózgowia wypreparowano, dotrwalono immersyjnie w płynie perfuzyjnym przez okres ok. 30 min, a następnie płukano w 0,1M PBS o pH 7,4. Tak przygotowany materiał został poddany „kąpieli" w 10%, 20% i 30% roztworach sacharozy zbuforowanej 0,1M PBS przez okres od 48 do 72 godzin. Po przepojeniu tkanek sacharozą i ich opadnięciu na dno probówki, mózgowia zamrożono przy pomocy medium zamrażającym tkankę. Następnie zostały one skrojone przy pomocy kriostatu mrożeniowego w płaszczyźnie czołowej na seryjne skrawki o grubości 10μm w temperaturze -25 °C. Skrawki zostały umieszczone po dwa na wcześniej wychromowanych szkiełkach podstawowych, które były przechowywane w pudełku introligatorskim w temperaturze -80 °C do czasu wykonania dalszych procedur **(Publikacja 1 i 2).**

Tabela 2. Wykaz przeciwciał wykorzystanych w badaniach prezentowanych w Publikacji 1 i 2

Table 2. *List of antibodies used in the studies presented in Publications 1 and 2*

Przeciwciała	Kody	Klonalność	Gospodarz	Rozcieńczenie	Producent	Lokalizacja
Pierwszorzędowe-						
CB	CB-38	poliklonalne	Królik	1: 4000	SWANT	Bellinzona/Switzerland
PV	PV27	poliklonalne	Królik	1: 1000	SWANT	Bellinzona/Switzerland
CR	7697	poliklonalne	Królik	1: 1000	SWANT	Bellinzona/Switzerland
SOM	MAB354	monoklonalne	Szczur	1: 1000	Millipore	Temecula, CA/USA
$GABA_A$ α1	AB33299	poliklonalne	Królik	1: 2000	Abcam	Cambridge/ UK
VGAT	AB5062P	poliklonalne	Królik	1: 3000	Millipore	Temecula, CA/USA
GFAP	G9269	poliklonalne	Królik	1: 200	Millipore	Temecula, CA/USA
TH	Ab112	poliklonalne	Królik	1: 2000	Abcam	Cambridge/ UK
DAT	Ab184451	monoklonale	Królik	1: 1000	Abcam	Cambridge/ UK
DA_1	ADR-001	poliklonalne	Królik	1: 500	Alomonelabs	Jerusalem/ Izrael
DA_2	AB5084P	poliklonalne	Królik	1: 200	Millipore	Temecula, CA/USA
ACHE	Ab183591	poliklonalne	Królik	1: 500	Abcam	Cambridge/ UK
VAChT	PA5-85782	poliklonalne	Królik	1: 2000	Thermo Fisher	Rockford, IL/USA
$AChR_{M1}$	AB5164	poliklonalne	Królik	1: 500	Millipore	Temecula, CA/USA
$AChR_{\alpha7}$	Ab216485	poliklonalne	Królik	1: 500	Abcam	Cambridge/ UK
NeuN	ABN78	poliklonalne	Królik	1: 1000	Millipore	Temecula, CA/USA
Drugorzędowe-						
ALEXA Fluor 555-nm	A-31572	poliklonalne	Osioł anty-królik	1: 800	Thermo Fisher	Rockford, IL/USA
CY3	712-165-153	poliklonalne	Osioł anty-szczur	1: 1000	JacksonImmunoResearch Laboratories	West Grove, PA/USA
ImmPRESS HRP Universal Antibody (Ig, Peroxidase)			Osioł anty-królik	1:1	Vector Laboratories	Burlingame, CA/USA

2.3. Barwienia immunohistochemiczne

Wybrane skrawki mózgowia myszy ERβ$^{-/-}$ i ERβ$^{+/+}$, na których znajdowały się przekroje ciała migdałowatego barwiono przy użyciu dwóch metod immunohistochemicznych tj. immunoenzymatycznej i immunofluorescencyjnej. Wszystkie etapy barwienia przeprowadzono w temperaturze pokojowej w wilgotnych komorach.

Metoda immunoenzymatyczna. Aby zobrazować położenie i granice poszczególnych jąder ciała migdałowatego oraz oszacować całkowitą liczbę neuronów wchodzących w skład tych struktur, wykorzystano marker białka jądrowego swoistego dla dojrzałych neuronów (NeuN), zaś w celu oceny ilościowej głównych markerów subpopulacji GABAergicznych ciała migdałowatego wybrane skrawki mózgowia inkubowano z przeciwciałami pierwszorzędowymi skierowanymi przeciwko CB, PV i CR. (**Publikacja 1**). Wybrane skrawki płukano trzykrotnie po 15 min 0,1M PBS, a następnie inkubowano przez 30 min w 0,3% H_2O_2 rozcieńczonym w 99,85% metanolu i blokowano przez 60 min w 10% roztworze oślej surowicy (rozcieńczonej w 0,1M PBS). Skrawki inkubowano przez noc w roztworze przeciwciał pierwszorzędowych, które rozcieńczono w 0,1M PBS z 1% oślą surowicą i 0,5% Tritonem X-100. Następnego dnia skrawki inkubowano przez 1 godzinę w roztworze drugorzędowych przeciwciał sprzężonych z peroksydazą chrzanową (Imm-PRESS Reagent). W celu wizualizacji antygenu skrawki inkubowano przez 60 sekund z 3% roztworem 3,3'-diaminobenzydyny (DAB). W końcowym etapie wybarwione skrawki, aby uczynić je preparatem trwałym, odwodniono stosując szereg alkoholowy (kolejno 50%, 70%, 85%, 95% i 99,8%), dwukrotnie prześwietlono w ksylenie i zamykano w DPX (medium zamykające do skrawków histologicznych).

Metoda immmunofluorescenyjna. W celu określenia zmian ilościowych markerów układu GABAergiczego, dopaminergicznego i cholinergicznego oraz markera kwaśnego białka włókienkowego (GFAP), wybrane przekroje ciała migdałowatego myszy ERβ$^{-/-}$ i ERβ$^{+/+}$ poddano rutynowej procedurze barwień immunofluorescencyjnych (**Publikacja 1 i 2**). Skrawki płukano w 0,1M PBS, a następnie inkubowano w wilgotnej komorze przez jedną godzinę w buforze blokującym (0,1M PBS, 10% surowicy oślej, 0,1% surowicy albuminy bydlęcej, 0,05% timerosalu i 1% Tween-20). Następnie skrawki były ponownie inkubowane

przez noc w temperaturze pokojowej w roztworze przeciwciał pierwszorzędowych rozcieńczonych w buforze blokującym. W końcowym etapie barwień, skrawki trzykrotnie płukano w 0,1M PBS, inkubowano przez godzinę w temperaturze pokojowej w roztworze przeciwciał drugorzędowych i ponownie płukano w 0,1M PBS. Po osuszeniu, preparaty zamykano używając zbuforowanego glicerolu o pH 8,6 (0,05M Na_2CO_3, 0,05M $NaHCO_3$ i glicerol).

2.4. Kontrola specyficzności przeciwciał pierwszo- i drugorzędowych

Przeciwciała pierwszorzędowe i drugorzędowe użyte w prezentowanych badaniach zostały starannie dobrane oraz potwierdzoną ich swoistość przedstawiono w **Publikacji 1 i 2.**

2.5. Ocena zmian ilościowych badanych markerów

Określenie zmian ilościowych w całkowitej populacji neuronów, a także zmian ilościowych markerów układu GABAergiczego, dopaminergicznego i cholinergicznego w ciele migdałowatym dorosłych samic myszy z deficytem ERβ w porównaniu z myszami typu dzikiego dokonano w oparciu o obrazowanie przy użyciu mikroskopu Olympus BX51 (Olympus GmbH, Niemcy) z kamerą cyfrowym (CC-12, SoftImaging System, Niemcy) i oprogramowaniem Cell-F (Olympus, Niemcy). Ocenie poddano sześć głównych jąder ciała migdałowatego tj. jądro boczne (LA), podstawno-boczne (BL), podstawno-przyśrodkowe (BM), korowe (CO), przyśrodkowe (ME) i środkowe (CE), których granice wyznaczano na podstawie atlasu mózgowia myszy według Paxinosa i Franklina (2019). Należy podkreślić, że w prezentowanych badaniach użyto nazewnictwa poszczególnych struktur wchodzących w skład ciała migdałowatego zgodnie z nomenklaturą stosowaną w wyżej wymienionym atlasie. Do analizy wyselekcjonowano piętnaście równomiernie rozmieszczonych przekrojów ciała migdałowatego ułożonych od bieguna przedniego (bregma = -1.06) do bieguna tylnego mózgowia (bregma = -2,30) (Paxinos i Franklin 2019). Wszystkie analizy (zautomatyzowana analiza skanów liniowych, manualne oraz zautomatyzowane liczenia komórek nerwowych) były zawsze wykonywane przy użyciu obiektywu 40x i ramki testowej o obszarze 347,6 μm × 260,7 μm. Dane uzyskane z ramek

testowych uśredniano i przeliczano na wartość odpowiadającą powierzchni 0,04 mm^2 lub 0,04 mm^3 **(Publikacja 1 i 2)**.

2.5.1. Zautomatyzowana analiza skanów liniowych

W celu oceny gęstości numerycznej (*Dv;* ang. *volumetric density*) immunoreaktywnych struktur (ciał komórek nerwowych, włókien oraz neuropilu) markerów GABAergicznych (receptora GABA typu A podjednostki α1 – $GABA_{A\alpha1}$ i pęcherzykowego transportera GABA – VGAT) **(Publikacja 1)**, dopaminergicznych (hydroksylazy tyrozynowej – TH; transportera dopaminy – DAT; receptora dopaminy typu 1 – DA_1 i receptora dopaminy typu 2 – DA_2) oraz cholinergicznych (acetylocholinoesterazy – AChE; pęcherzykowego transportera acetylocholiny – VAChT; receptora muskarynowego acetylocholiny typu 1 – $AChR_{M1}$ i receptora nikotynowego acetylocholiny alfa-7 – $AChR_{\alpha7}$) **(Publikacja 2)** w jądrach ciała migdałowatego myszy $ER\beta^{+/+}$ i $ER\beta^{-/-}$, wybarwione skrawki przeanalizowano przeprowadzając zautomatyzowaną analizą skanów liniowych, opisaną i zatwierdzoną przez zespół badawczy Sathyanesan'a i in. (2012). Do katalogowania cyfrowych obrazów mikroskopowych zastosowano te same parametry, m.in. czas naświetlania i wzmocnienie kamery, które zapewniły dobry zakres dynamiki w skali szarości dla wszystkich obrazów zebranych z różnych sekcji i od różnych osobników. Wszystkie analizowane obrazy mikroskopowe zostały zapisane w 8-bitowym formacie TIF.

Należy podkreślić, że immunoreaktywne struktury mogą być potraktowane jako matematyczne elementy krzywoliniowe z lokalnymi minimalnymi lub maksymalnymi zmianami natężenia światła (Sathyanesan i in. 2012), które można wykryć za pomocą macierzy Hessian'a (Sato i in. 1998). W ten sposób odpowiednie filtrowanie obrazu w oparciu o tę macierz, wydobywa z niego informacje dotyczącego liniowego układu równań. W związku z tym, w prezentowanych badaniach wszystkie obrazy uzyskane techniką barwień immunofluorescencyjnych zostały wstępnie przeanalizowane z wykorzystaniem macierzy Hessian'a obecnej we wtyczce FeatureJ (Meijering 2003) oprogramowania NIH ImageJ (wersja 1.53e). Biorąc pod uwagę, że wtyczka ta oferuje kilka parametrów do wyboru, zgodnie z walidacją opisaną w pracy Sathyanesan'a i in. (2012) wybrano następujące: „największą wartość własną tensora Hessian'a"; „bezwzględnego porównania wartości własnej" oraz współczynnik „wygładzania skali" o wartości równej 0,5.

Obrazy te poddano następnie zautomatyzowanej analizie skanów liniowych przy użyciu pięciu linii poziomych (skanowanie równoległe) i pięciu linii pionowych (skanowania prostopadłe). Linie te zostały narysowane za pomocą „narzędzia linii" dostępnego w oprogramowaniu ImageJ w obszarze zainteresowania. W zależności od cech morfologicznych jąder ciała migdałowatego rysowano linie proste lub zakrzywione. W następnym kroku skany liniowe zostały skorygowane o linię bazową i przetworzone za pomocą algorytmu wykrywania pików. Należy podkreślić, że oszacowanie linii bazowej zależy ściśle od tego, jak piki (sygnały) są odróżniane od tła. Aby ocenić wartość tła dla skanów linii bazowych, skany te były zawsze pobierane z kilku immunonegatywnych miejsc przekroju. Następnie na podstawie tych pomiarów obliczano średnią, która stanowiła wartość progową tła dla pojedynczego przekroju (parametr niezbędny do wykrywania pików przez algorytm). Ostatecznie *Dv* struktur immunoreaktywnych obliczano korzystając ze wzoru przedstawionego wcześniej przez Sathyanesan'a i in. (2012), który jest następujący:

$$Dv = \frac{\mathrm{Nx} \times \mathrm{Ny}}{\mathrm{z} \times (\cos 45°) \times \varepsilon} \times 10^6 / (100\mu\mathrm{m})^3$$

Dv – gęstość numeryczna określająca ilość struktur immunoreaktywnych

Nx i *Ny* – średnia liczba pików na µm wzdłuż równoległych (x) lub prostopadłych (y) wektorów skanowania linii

Z – grubość przekroju

ε – bezwymiarowy współczynnik empiryczny

W tym miejscu warto także dodać, że powyższy wzór pozwala obliczyć wartości w przestrzeni trójwymiarowej, ponieważ do oceny *Dv* wykorzystuje się zarówno znajomość powierzchni, jak i grubość przekroju skrawka.

2.5.2. Manualne i automatyczne liczenie komórek nerwowych

Dodatkowo w celu oceny liczby komórek nerwowych populacji GABAergicznych (CB, PV, CR i SOM) **(Publikacja 1)**, dopaminergicznych (DA_1, DA_2) i cholinergicznych ($AChR_{M1}$ i $AChR_{\alpha7}$) **(Publikacja 2)** przeprowadzono analizę manualnego i automatycznego (NIH ImageJ, wersja 1.53e) liczenia tych struktur. Podobnie jak w przypadku zautomatyzowanej analizy skanów liniowych, wszystkie obrazy zostały zapisane w 8-bitowym formacie TIF. Co więcej, w prezentowanych badaniach wszystkie zastosowane parametry dla każdego pomiaru były stałe m.in. zastosowano opcję „ciemnego tła" oddzielającego komórki nerwowe od ich tła. Wszystkie obrazy mikroskopowe były konwertowane do obrazu binarnego w celu wyodrębnienia obiektów kolistych na podstawie ich kształtu. Biorąc pod uwagę fakt, że komórki nerwowe nie zawsze reprezentowały obiekty o idealnym kształcie koła, zastosowano parametr selekcji tychże obiektów od idealnie kolistego (wartość równa 1) do wielokształtnego (wartość ≥0,2). Zatem, obiekty o powierzchni w przedziale 1800-2500 pikseli były klasyfikowane jako komórka nerwowa.

2.6. Sieć interakcji białko-białko (PPI)

Do analizy sieci interakcji PPI (ang. *protein-protein interaction*) pomiędzy badanymi markerami wykorzystano biologiczną bazę danych zawierającą znane i przewidywane interakcje białko-białko (ang. *search tool for the retrieval of interacting proteins*, STRING). Na podstawie uzyskanych wyników skonstruowano sieć PPI myszy domowej, tak aby zobrazować zachodzące interakcje między estrogenami a badanymi markerami tj. TH, DAT, DA_1, DA_2, AChE, VAChT, $AChR_{\alpha7}$ oraz $AChR_{M1}$. W analizie tej zastosowano kryterium odcięcia ≤0,05 oraz grupowanie węzłów według metody Markowa (MCL) skorygowanej o poprawkę Benjaminiego-Hochberga. Przedział ufności ustawiono na poziomie ≤0,4. Zastosowano także trzy grupy klastrów, odrębnie dla markerów dopaminergicznych (TH, DAT, DA_1 oraz DA_2), cholinergicznych (AChE, VAChT, $AChR_{M1}$ oraz $AChR_{\alpha7}$) i estrogenowych (ESR2/ERβ). Ostatecznie na postawie uzyskanych wyników przeprowadzono wzbogaconą analizę (ang. *Gene Ontology Resource*, GO), tak aby zwizualizować i wskazać potencjalne funkcje biologiczne badanych markerów **(Publikacja 2)**.

2.7. Analiza statystyczna

W celu wykazania różnic istotnych statystycznych pomiędzy myszami z deficytem ERβ (ERβ$^{-/-}$) i typu dzikiego (ERβ$^{+/+}$) w niniejszych badaniach zastosowano testy parametryczne (**Publikacja 1 i 2)** wykorzystując oprogramowanie Statistica 13.3 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA). Różnice między dwiema niezależnymi grupami (myszy ERβ$^{-/-}$ vs. ERβ$^{+/+}$) w testach statystycznych obliczono zakładając, że istotność statystyczna była równa $\alpha = 0,05$, moc statystyczna 1-β wynosiła 0,95, a współczynnik alokacji wynosił 1:1. Analiza wstępna posłużyła do zbadania normalności rozkładu (test Shapiro-Wilka) i czy założenia konieczne do przeprowadzenia analizy wariancji są spełnione (test Levenea, w przypadku $p \leq 0,05$ zastosowano poprawkę testu Cochrana-Coxa). Następnie, aby określić różnice istotne statystycznie między grupami, zastosowano test t-Studenta dla prób niezależnych. Poziom istotności ustalono na poziomie $p \leq 0.05$. Wszystkie wykresy statystyczne prezentowane w rozdziale wyniki wykonano w programie GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Dane przedstawiono za pomocą wykresów ramka-wąsy, przy czym „ramka" oznacza medianę oraz 25. i 75. kwartyl, a „wąsy" przedstawiają 5. i 95. percentyl.

3. Wyniki

3.1. Publikacja 1

Wyniki niniejszych badań wykazywały istotną redukcję liczby komórek nerwowych we wszystkich głównych jądrach ciała migdałowatego u samic myszy ERβ$^{-/-}$, którym towarzyszyła znacznie wyższa ekspresja GFAP w szczególności w BM, ME i CO. Ponadto w ciele migdałowatym myszy z deficytem ERβ liczba komórek nerwowych wykazujących ekspresję CB była obniżona w porównaniu do myszy kontrolnych, podczas gdy ekspresja pozostałych markerów GABAergicznych, tj. PV, CR, SOM, $GABA_{A\alpha1}$ i VGAT utrzymywała się na niezmienionym poziomie. Szczegółowy opis wyników wraz z rycinami został zaprezentowany w **Publikacji 1.**

3.1.1. Redukcja liczby komórek nerwowych w ciele migdałowatym myszy ERβ$^{-/-}$

We wszystkich jądrach ciała migdałowatego samic myszy ERβ$^{-/-}$ wykazano znaczny deficyt komórek nerwowych w stosunku do ERβ$^{+/+}$. W LA, BL i BM deficyt ten mieścił się w przedziale 16–19%, natomiast w ME był on najbardziej zaznaczony i wynosił ok. 22%. Tymczasem najmniejszy spadek liczby komórek nerwowych (14%) odnotowano w CO i CE (Rycina 1 i Tabela 3).

3.1.2. Białka wiążące wapń w ciele migdałowatym myszy ERβ$^{-/-}$ i ERβ$^{+/+}$

Zarówno charakter i wzór dystrybucji CB, PV i CR były porównywalne u samic myszy z deficytem ERβ, jaki i myszy kontrolnych i ściśle korespondował z wynikami wcześniejszych badań przeprowadzonych na samcach szczurów (Kemppainen i Pitkänen 2000). Wyjątek w odniesieniu do tych danych stanowiła CR w CE, która podobnie jak w ciele migdałowatym samic i samców kawii domowej (Równiak i in. 2015), była obecna w neuropilu oraz w pojedynczych komórkach nerwowych. U samic myszy, podobnie jak u innych zwierząt, immunoreaktywność wobec CB, PV i CR była obserwowana głównie w komórkach i włóknach nerwowych, ale ich występowanie potwierdzono również w zakończeniach synaptycznych. Pomimo ogólnego podobieństwa we wzorze dystrybucji omawianych substancji w obu grupach (ERβ$^{-/-}$ i ERβ$^{+/+}$), liczba komórek nerwowych

wykazujących immunoreaktywność wobec CB była znacznie mniejsza w analizowanych jądrach ciała migdałowatego myszy ERβ$^{-/-}$ niż ERβ$^{+/+}$. Przykładowo, w LA, BL, BM i ME spadek liczby komórek nerwowych zawierających CB mieścił się w zakresie 19–22%, natomiast w CO i CE spadek ten był mniej wyraźny i wynosił ok. 15–18%. Z drugiej strony, deficyt ERβ nie wpłynął na liczbę komórek nerwowych wykazujących immunoreaktywność wobec PV i CR we wszystkich analizowanych jądrach ciała migdałowatego (Rycina 1 i Tabela 3).

3.1.3. Somatostatyna w ciele migdałowatym myszy ERβ$^{-/-}$ i ERβ$^{+/+}$

Zarówno charakter i wzór dystrybucji SOM w komórkach nerwowych samic myszy ERβ$^{-/-}$ i ERβ$^{+/+}$ był podobny oraz nie różnił się od tego stwierdzonego we wcześniejszych badaniach, które zostały przeprowadzone na szczurach i myszach (McDonald i Mascagni 2002; Krabbe i in. 2018). Obecność SOM wykazano we wszystkich analizowanych jądrach ciała migdałowatego, w komórkach i włóknach nerwowych wraz z zakończeniami synaptycznymi. Liczba neuronów wykazujących immunoreaktywność wobec SOM utrzymywała się na niezmienionym poziomie w analizowanych obszarach ciała migdałowatego zarówno u samic myszy ERβ$^{-/-}$, jak i ERβ$^{+/+}$ (Rycina 1 i Tabela 3).

3.1.4. Receptor GABA typu A podjednostki α1 w ciele migdałowatym myszy ERβ$^{-/-}$ i ERβ$^{+/+}$

Podobnie jak w przypadku innych markerów GABAergicznych, charakter i wzór dystrybucji $GABA_{A\alpha1}$ był na zbliżonym poziomie zarówno u samic myszy ERβ$^{-/-}$, jak i ERβ$^{+/+}$, a także był zgodny z wynikami wcześniejszych badań wykonanych w ciele migdałowatym gryzoni (Kaufmann i in. 2003; McDonald i Mascagni 2004; Hörtnagl i in. 2013; Równiak 2017). Immunoreaktywność wobec $GABA_{A\alpha1}$ obserwowano przede wszystkim we włóknach nerwowych i w zakończeniach synaptycznych. Najwyższą gęstość numeryczną komórek nerwowych zawierających ten receptor zaobserwowano w BL, natomiast najniższą stwierdzono w CE. W pozostałych jądrach ciała migdałowatego tj. LA, BM, CO i ME gęstość ta kształtowała się na porównywalnym poziomie (Rycina 2). W związku ze specyficznym charakterem dystrybucji $GABA_{A\alpha1}$ (włókna nerwowe

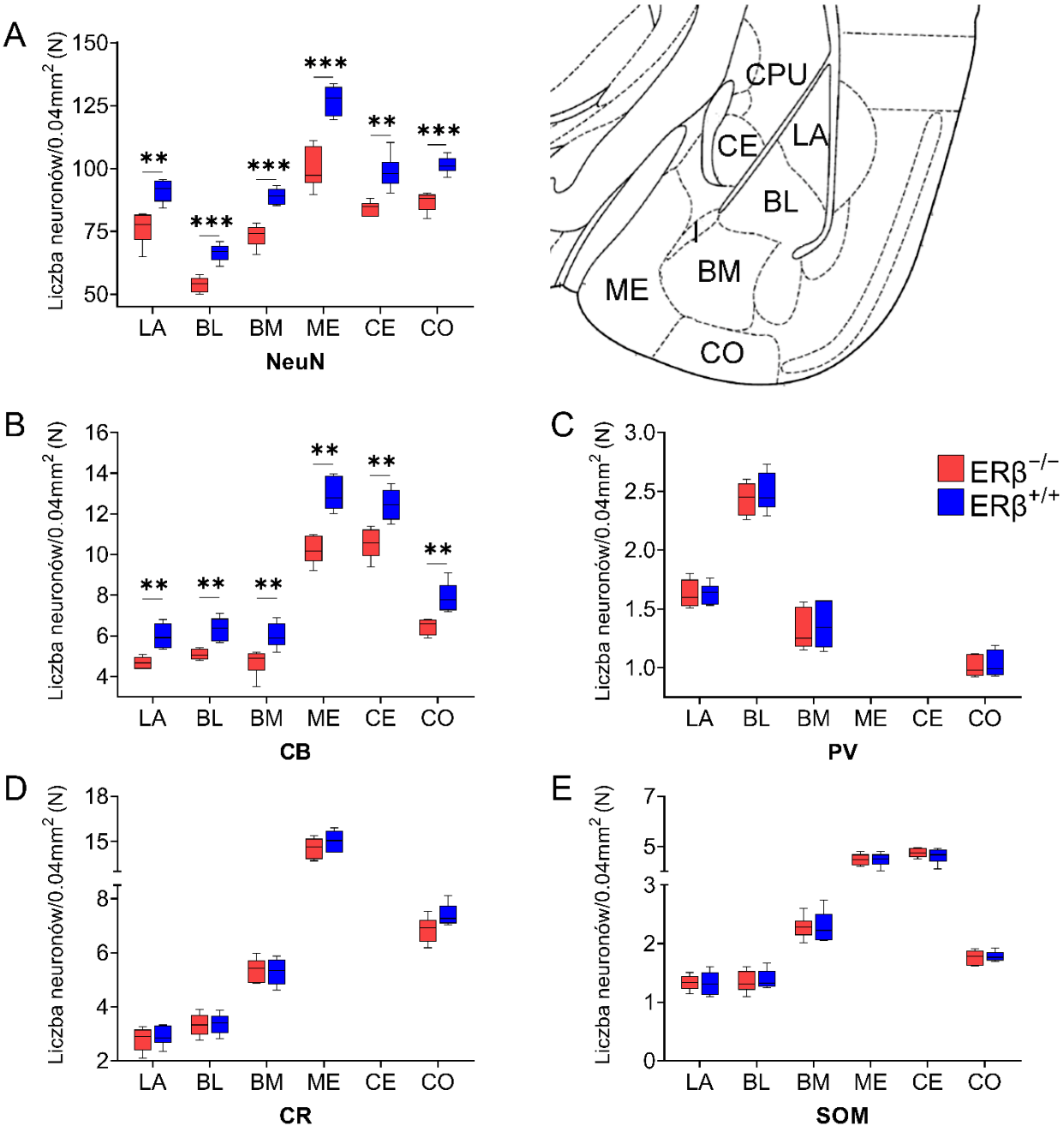
i zakończenia synaptyczne) oba parametry tj. gęstość numeryczną struktur zawierających ten receptor oraz intensywność jego sygnału zbadano przy użyciu zautomatyzowanej analizy skanów liniowych. Analiza ta ujawniła brak różnic istotnych statystycznie pomiędzy badanymi grupami zwierząt w odniesieniu do obu analizowanych parametrów (Rycina 2 i Tabela 3).

3.1.5. Pęcherzykowy transporter GABA w ciele migdałowatym myszy ERβ$^{-/-}$ i ERβ$^{+/+}$

Dystrybucja VGAT w ciele migdałowatym u myszy w obu grupach była podobna. Najwyższą gęstość numeryczną komórek nerwowych zawierających ten transporter stwierdzono w BL, zaś najwyższą intensywność jego sygnału wykazano w ME. W pozostałych jądrach gęstość numeryczna struktur wykazujących obecność VGAT, jak i intensywność jego sygnału była na porównywalnym poziomie (Rycina 2). Zautomatyzowana analiza skanów liniowych nie wykazała różnic istotnych statystycznie pomiędzy samicami myszami ERβ$^{-/-}$ a ERβ$^{+/+}$, zarówno w odniesieniu do gęstości numerycznej struktur zawierających ten transporter, jak i intensywności jego sygnału (Rycina 2 i Tabela 3).

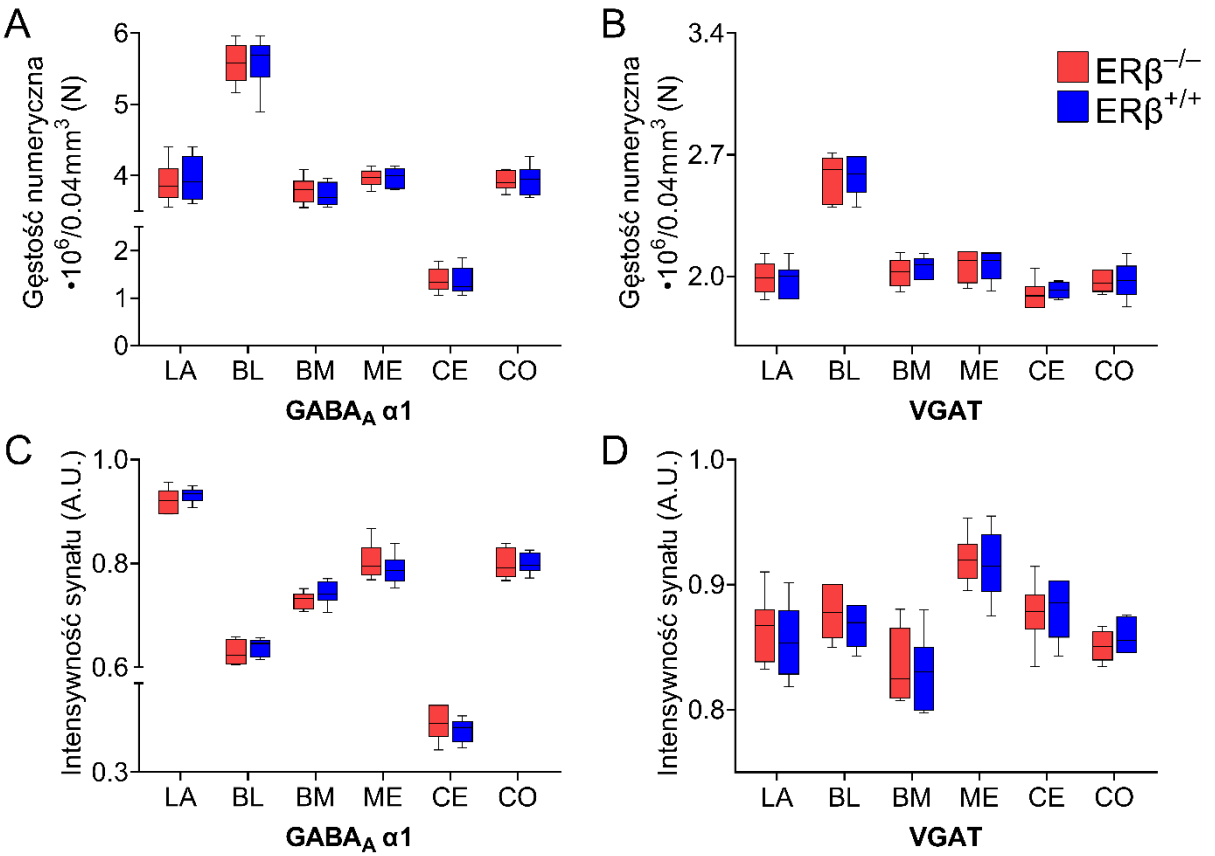
3.1.6. Zwiększona immunoreaktywność kwaśnego białka włókienkowego w ciele migdałowatym myszy ERβ$^{-/-}$ i ERβ$^{+/+}$

Ocena arbitralna skrawków mózgowia pochodzących od myszy ERβ$^{-/-}$, wykazała znacznie wyższą immunoreaktywność wobec GFAP w ME, BM i CO w porównaniu do myszy ERβ$^{+/+}$. Natomiast w LA, BL i CE nie stwierdzono zmian między badanymi grupami (**Publikacja 1**).



RYCINA 1. *(Zmodyfikowano)* Całkowita liczba neuronów (NeuN; A) oraz neurony wykazujące immunoreaktywność wobec kalbindyny (CB; B), parwalbuminy (PV; C), kalretyniny (CR; D) i somatostatyny (SOM, E) w ciele migdałowatym myszy z deficytem ERβ (ERβ$^{-/-}$) i myszy typu dzikiego (ERβ$^{+/+}$). ** ($p \leq 0, 01$) i *** ($p \leq 0, 001$) wskazują na statystycznie istotne różnice między myszami ERβ$^{+/+}$ a ERβ$^{-/-}$. LA — jądro boczne, BL — jądro podstawno-boczne, BM — jądro podstawno-przyśrodkowe, ME — jądro przyśrodkowe, CE — jądro środkowe, CO — jądro korowe, I — jądro wtrącone, CPU — prążkowie.

FIGURE 1. *(Modified) The total number of neurons (NeuN; A)-, calbindin (CB; B)-, parvalbumin (PV; C)-, calretinin (CR; D)- and somatostatin (SOM; E)- expressing neurons in the amygdala of ERβ knock-out (ERβ$^{-/-}$) and wild-type (ERβ$^{+/+}$) mice. ** ($p \leq 0.01$) and *** ($p \leq 0.001$) indicate statistically significant differences between ERβ$^{-/-}$ and ERβ$^{+/+}$ mice. LA — lateral nucleus, BL — basolateral nucleus, BM — basomedial nucleus, ME — medial nucleus, CE — central nucleus, CO — cortical nucleus, I — intercalated nucleus, CPU — caudate-putamen complex.*



RYCINA 2. *(Zmodyfikowano)* Gęstość numeryczna struktur wykazujących obecność receptora GABA typu A podjednostki α1 ($GABA_{A\alpha1}$; A) oraz intensywność tego sygnału (C), a także gęstość numeryczna struktur wykazujących obecność pęcherzykowego transportera GABA (VGAT; B) i intensywność tego sygnału (D) w ciele migdałowatym myszy z deficytem ERβ ($ER\beta^{-/-}$) i myszy typu dzikiego ($ER\beta^{+/+}$). LA — jądro boczne, BL — jądro podstawno-boczne, BM — jądro podstawno-przyśrodkowe, ME — jądro przyśrodkowe, CE — jądro środkowe, CO — jądro korowe.

FIGURE 2. *(Modified) The volumetric density of the elements and signal intensity of GABA type A receptor with α1 subunit ($GABA_{A\alpha1}$; A and C) and vesicular GABA transporter (VGAT; B and D) in the amygdala of ERβ knock-out ($ER\beta^{-/-}$) and wild-type ($ER\beta^{+/+}$) mice. LA — lateral nucleus, BL — basolateral nucleus, BM — basomedial nucleus, ME — medial nucleus, CE — central nucleus, CO — cortical nucleus.*

Tabela 3. Analiza statystyczna badanych markerów w ciele migdałowatym myszy ERβ$^{+/+}$ i ERβ$^{-/-}$

Table 3. *Statistical analysis of studied markers between ERβ$^{+/+}$ and ERβ$^{-/-}$ mice in the amygdala*

	LA		**BL**		**BM**		**ME**		**CE**		**CO**	
		p		*p*		*p*		*p*		*p*		*p*
NeuN	$t_{8.88}$=4.77	0.001057	$t_{9.70}$=6.88	0.000051	$t_{9.02}$=7.25	0.000048	$t_{8.98}$=6.74	0.000085	$t_{9.78}$=7.05	0.000039	$t_{6.66}$=4.86	0.002112
CB	$t_{7.27}$=4.74	0.001913	$t_{7.27}$=4.74	0.002045	$t_{9.55}$=4.16	0.004259	$t_{9.58}$=6.33	0.001030	$t_{9.99}$=4.46	0.001229	$t_{7.80}$=4.40	0.002435
PV	t_{10}=0.054	0.9581	t_{10}=0.62	0.5482	t_{10}=0.48	0.6642	−	−	−	−	t_{10}=0.46	0.6581
CR	t_{10}=0.53	0.6113	t_{10}=0.16	0.8787	t_{10}=−0.24	0.8119	t_{10}=1.24	0.2426	−	−	t_{10}=2.13	0.0594
SOM	t_{10}=−0.22	0.8274	t_{10}=0.08	0.9344	t_{10}=−0.26	0.8036	t_{10}=0.17	0.8662	t_{10}=0.63	0.5441	t_{10}=0.16	0.8732
$GABA_A$α1	t_{10}=0.35	0.7337	t_{10}=0.11	0.9178	t_{10}=−0.62	0.5478	t_{10}=0.08	0.9357	t_{10}=−0.19	0.8513	t_{10}=0.11	0.9106
Intensywność $GABA_A$α1	t_{10}=0.94	0.3674	t_{10}=0.97	0.3536	t_{10}=1.24	0.2445	t_{10}=−0.82	0.4334	t_{10}=−0.85	0.4133	t_{10}=−0.08	0.9379
VGAT	t_{10}=−0.22	0.8274	t_{10}=0.08	0.9344	t_{10}=−0.26	0.8036	t_{10}=0.17	0.8662	t_{10}=0.63	p=0.5441	t_{10}=0.16	0.8732
Intensywność $GABA_A$α1	t_{10}=−0.57	0.5829	t_{10}=−1.0	0.3432	t_{10}=−0.29	0.7796	t_{10}=−0.31	0.7607	t_{10}=0.19	p=0.8495	t_{10}=1.07	0.3091

− brak immunoreaktywnych struktur

3.2. Publikacja 2

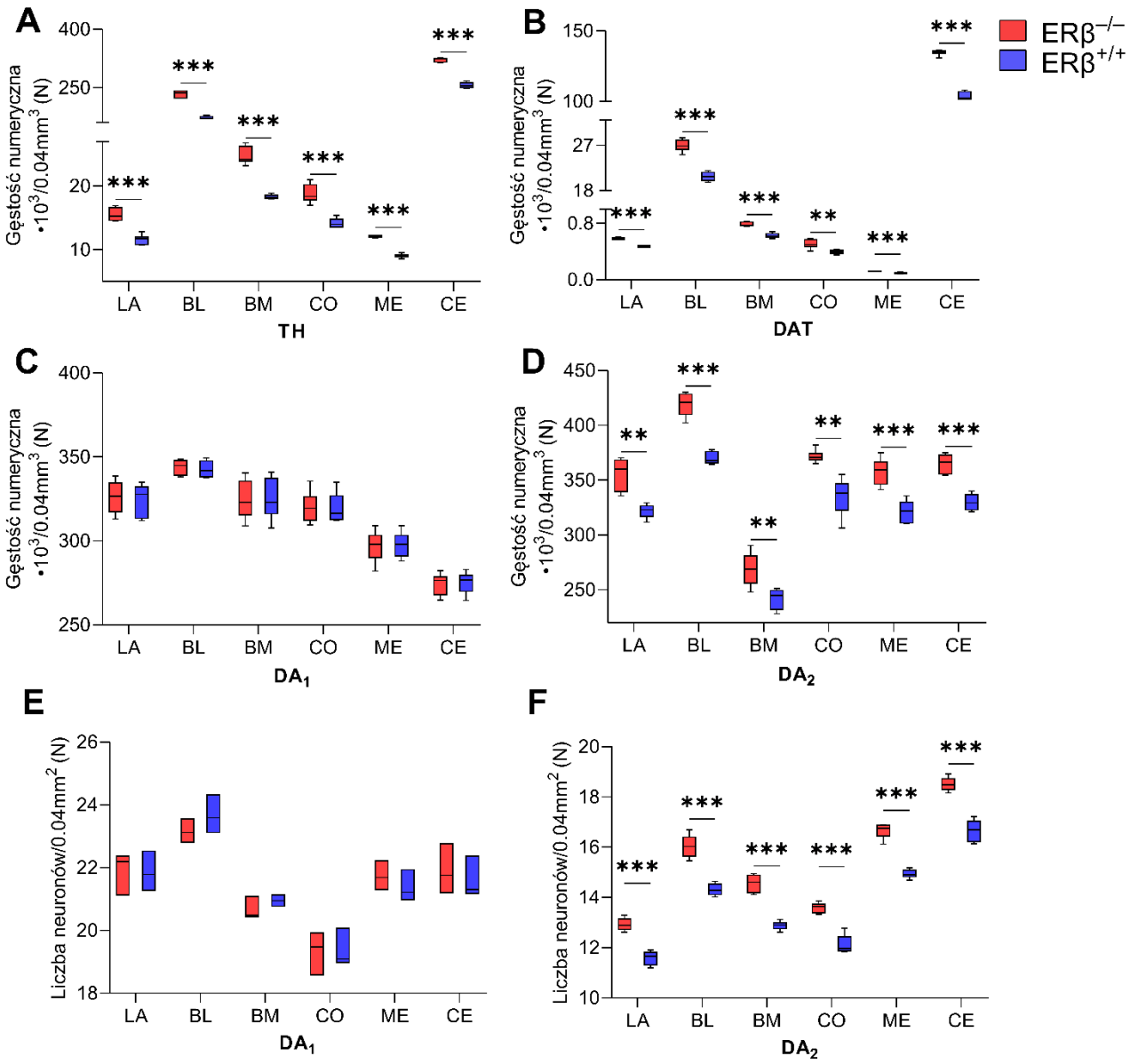
Wyniki przedstawione w niniejszej publikacji dowodzą, że poziom ekspresji struktur wykazujących immunoreaktywność wobec głównych markerów dopaminergicznych (TH, DAT i DA_2) był znacząco podwyższony we wszystkich analizowanych jądrach ciała migdałowatego samic myszy $ER\beta^{-/-}$. Tymczasem poziom ekspresji struktur wykazujących immunoreaktywność wobec DA_1 nie uległ zmianie. Brak zmian w poziomie ekspresji odnotowano również w odniesieniu do niektórych markerów cholinergicznych tj. AChE i VAChT. Z kolei, dalsze analizy wykazały istotny wzrost liczby komórek nerwowych zawierających receptory cholinergiczne tj. $AChR_{M1}$ i $AChR_{\alpha7}$ w jądrach ciała migdałowatego samic myszy $ER\beta^{-/-}$ w porównaniu z samicami myszy $ER\beta^{+/+}$. Szczegółowy opis wyników wraz z rycinami zostały zaprezentowane w **Publikacji 2.**

3.2.1. Markery dopaminergiczne w ciele migdałowatym myszy $ER\beta^{-/-}$ i $ER\beta^{+/+}$

Charakter i wzór dystrybucji TH i DAT był porównywalny u samic myszy obu szczepów $ER\beta^{-/-}$ i $ER\beta^{+/+}$, a także wykazywał spójność z wynikami wcześniejszych badań przeprowadzonych w ciele migdałowatym gryzoni (Revay i in. 1996; Pinard i in. 2008; de la Mora i in. 2010; Olucha-Bordonau i in. 2015). Obecność TH i DAT zaobserwowano przede wszystkim we włóknach nerwowych i zakończeniach synaptycznych. Zarówno u samic myszy $ER\beta^{-/-}$, jak i $ER\beta^{+/+}$ najwyższą gęstość numeryczną struktur wykazujących immunoreaktywność wobec TH stwierdzono w CE, wysoką w BL, a najniższą w ME (Rycina 3). W odniesieniu do DAT duże zagęszczenie struktur wykazujących obecność tego transportera odnotowano w CE, a umiarkowaną w BL. W pozostałych jądrach ciała migdałowatego tj. LA, BM, CO i ME stwierdzono niski poziom immunoreaktywności wobec DAT w analizowanych strukturach (Rycina 3). Szczegółowa i zautomatyzowana analiza skanów linowych udowodniła, że gęstość numeryczna struktur wykazujących immunoreaktywność wobec TH i DAT była istotnie wyższa we wszystkich jądrach ciała migdałowatego samic myszy $ER\beta^{-/-}$ w porównaniu z $ER\beta^{+/+}$. Wzrost tej gęstości w odniesieniu do TH mieścił się w przedziale 32-35%, z wyjątkiem CE, w którym wynosił

on ok. 25%. Natomiast, wzrost gęstości numerycznej w odniesieniu do DAT wahał się od 28% do 30%, z wyjątkiem LA, w którym wynosił ok. 25% (Rycina 3 i Tabela 4).

Podobnie jak we wcześniejszych badaniach przeprowadzonych w ciele migdałowatym gryzoni (de la Mora i in. 2012; Równiak i in. 2017; Wei i in. 2018; Chen i in. 2019) zarówno u samic myszy $ER\beta^{-/-}$, jak i $ER\beta^{+/+}$ obecność DA_1 i DA_2 obserwowano głównie w komórkach nerwowych i zakończeniach synaptycznych oraz w pojedynczych włóknach nerwowych. Gęstość numeryczna struktur wykazujących immunoreaktywność wobec DA_1 była niejednorodna, a mianowicie była ona najwyższa w BL i najniższa w CE (Rycina 3). Z kolei, największe zagęszczenie struktur wykazujących immunoreaktywność wobec DA_2 zaobserwowano w BL, natomiast najniższe stwierdzono w BM (Rycina 3). Przeprowadzona analiza statystyczna nie wykazała różnic istotnych statystycznie w gęstości numerycznej struktur zawierających DA_1 pomiędzy badanymi grupami myszy ($ER\beta^{-/-}$ i $ER\beta^{+/+}$), podczas gdy immunoreaktywność drugiego receptora dopaminowego DA_2 była zwiększona u myszy $ER\beta^{-/-}$ we wszystkich analizowanych jądrach ciała migdałowatego w porównaniu z $ER\beta^{+/+}$. Wzrost ten mieścił się w przedziale 11-13%. Warto wspomnieć, że oprócz zautomatyzowanej analizy skanów liniowych struktur immunoreaktywnych wobec DA_1 i DA_2, dodatkowo policzone zostały komórki nerwowe wykazujące obecność wspomnianych receptorów dopaminowych. Analiza ta również potwierdziła brak różnic istotnie statystycznych w liczbie komórek nerwowych wykazujących immunoreaktywność wobec DA_1 pomiędzy myszami $ER\beta^{-/-}$ oraz $ER\beta^{+/+}$, podczas gdy liczba komórek nerwowych wykazujących obecność DA_2 była wyższa u $ER\beta^{-/-}$ niż $ER\beta^{+/+}$ (Rycina 3 i Tabela 4).



RYCINA 3. (Zmodyfikowano) Gęstość numeryczna struktur immunoreaktywnych wobec hydroksylazy tyrozynowej (TH; A), transportera dopaminy (DAT; B), receptora dopaminy typu 1 (DA_1; C) oraz typu 2 (DA_2; D), a także liczba immunoreaktywnych komórek nerwowych zawierających DA_1 (E) i DA_2 (F) w ciele migdałowatym myszy z deficytem ERβ ($ERβ^{-/-}$) i myszy typu dzikiego ($ERβ^{+/+}$). ** ($p \leqslant 0, 01$) i *** ($p \leqslant 0, 001$) wskazują na statystycznie istotne różnice między myszami $ERβ^{-/-}$a $ERβ^{+/+}$. LA — jądro boczne, BL — jądro podstawno-boczne, BM — jądro podstawno-przyśrodkowe, ME — jądro przyśrodkowe, CE — jądro środkowe, CO — jądro korowe.

FIGURE 3. *(Modified) The volumetric density of dopaminergic markers such as tyrosine hydroxylase (TH; A), dopamine transporter (DAT; B), dopamine D1-like receptor (DA_1; C) and dopamine D2-like receptor (DA_2; D) and automated cells counting for DA_1 (E) and DA_2 (F) in the amygdala of ERβ knockout ($ERβ^{-/-}$) and wild-type ($ERβ^{+/+}$) mice. ** ($p \leq 0.01$) and *** ($p \leq 0.001$) indicate statistically significant differences between $ERβ^{-/-}$ and $ERβ^{+/+}$ mice. LA — lateral nucleus, BL — basolateral nucleus, BM — basomedial nucleus, ME — medial nucleus, CE — central nucleus, CO — cortical nucleus.*

3.2.2. Markery cholinergiczne w ciele migdałowatym myszy ERβ$^{-/-}$ i ERβ$^{+/+}$

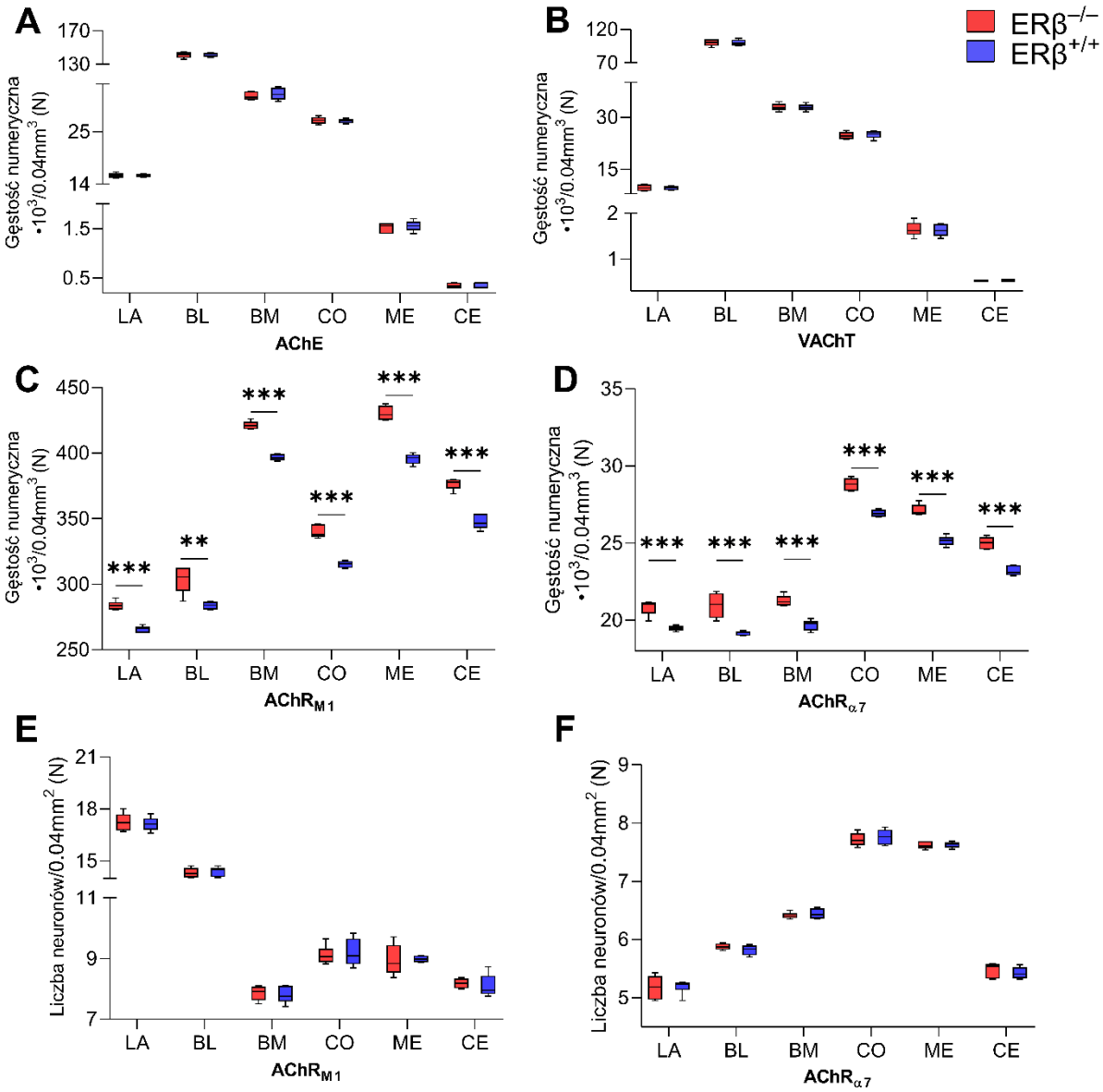
Przeprowadzone analizy ciała migdałowatego w obu grupach myszy wykazały, że charakter i wzór dystrybucji AChE i VAChT były zbliżone w obu badanych przypadkach. Co więcej, nie odbiegały one od wcześniejszych obserwacji dokonanych u dorosłych myszy i szczurów obu płci (Veinante i in. 2013; Olucha-Bordonau i in. 2015; Paxinos i Franklin 2019; McDonald 2020; Vereczki i in. 2021). Immunoreaktywność wobec AChE i VAChT wykazano przede wszystkim w cienkich i żylakowatych włóknach nerwowych oraz zakończeniach synaptycznych. Włókna nerwowe immunoreaktywne wobec AChE były gęsto upakowane, podczas gdy te zawierające VAChT były rozproszone. Zarówno u myszy ERβ$^{-/-}$, jak i ERβ$^{+/+}$, gęstość numeryczna struktur wykazujących obecność AChE i VAChT była wysoka w BL, umiarkowana w LA, BM i CO, podczas gdy w ME i CE była ona niewielka (Rycina 4). Na podstawie szczegółowej zautomatyzowanej analizy skanów liniowych nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie w gęstości numerycznej struktur zawierających AChE i VAChT pomiędzy myszami ERβ$^{+/+}$ a ERβ$^{-/-}$(Rycina 4 i Tabela 4).

Podobne jak we wcześniejszych badaniach przeprowadzonych u gryzoni (McDonald i Mascagni 2010; Muller i in. 2013; Pidoplichko i in. 2013; Równiak i in. 2017; McDonald i Mott 2021), w prezentowanej pracy obecność AChR$_{M1}$ i AChR$_{\alpha7}$ wykazano przede wszystkim w komórkach nerwowych obu grup myszy (ERβ$^{-/-}$ i ERβ$^{+/+}$). Warto zauważyć, że immunoreaktywność wobec AChR$_{M1}$ w strukturach ciała migdałowatego myszy była znacznie wyższa niż AChR$_{\alpha7}$. Pomimo to rozróżnienie pojedynczych ciał komórek zawierających AChR$_{M1}$ nastręczało pewnych trudności, ponieważ poziom ich immunoreaktywności był często porównywalny do poziomu otaczającego je neuropilu. Zautomatyzowana analiza skanów liniowych wykazała, że gęstość numeryczna struktur wykazujących immunoreaktywność wobec AChR$_{M1}$ była wysoka w ME i BM, natomiast niska w LA i BL (Rycina 4). W odniesieniu do AChR$_{\alpha7}$ wysoką gęstość numeryczną struktur wykazujących obecność tego receptora stwierdzono w ME i CO, podczas gdy w LA, BL i BM była ona niska (Rycina 4). Stwierdzono również wzrost gęstości numerycznej struktur wykazujących immunoreaktywność wobec AChR$_{M1}$ i AChR$_{\alpha7}$ we wszystkich analizowanych jądrach ciała migdałowatego samic myszy ERβ$^{-/-}$ w porównaniu z myszami ERβ$^{+/+}$. Wzrost ten mieścił się w zakresie 7-8% zarówno dla AChR$_{M1}$, jak i AChR$_{\alpha7}$.

Analiza automatycznego liczenia komórek nerwowych $AChR_{M1}$ i $AChR_{\alpha7}$ ujawniła brak różnic istotnych statystycznie pomiędzy myszami $ER\beta^{-/-}$ a $ER\beta^{+/+}$ (Rycina 4 i Tabela 4).

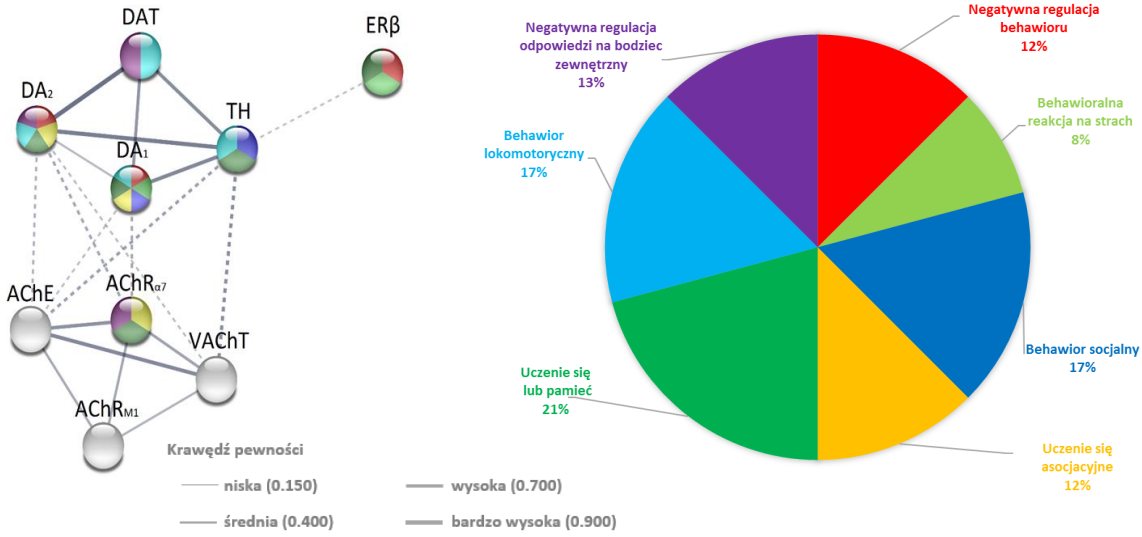
3.2.3. Analiza sieci interakcji białko-białko

W oparciu o biologiczną bazę danych STRING sporządzono i dokonano analizy sieci interakcji (ang. *protein-protein interaction*, PPI). Zawierała ona 9 węzłów i 20 krawędzi, z czego każdy węzeł reprezentował albo markery dopaminergiczne (TH, DAT, DA_1 i DA_2), albo cholinergiczne (ACHE, VAChT, $AChR_{M1}$, $AChR_{\alpha7}$) lub estrogenowe (ESR2 jako ERβ). Każda z krawędzi reprezentowała istotny typ pewności korelacji między dwoma badanymi węzłami (od najniższego 0,150 do najwyższego 0,900). W przeprowadzonej analizie nie stwierdzono węzłów rozłączonych, które mogłyby wskazywać na brak bezpośredniej lub pośredniej interakcji pomiędzy nimi. Spośród 129 wykrytych procesów biologicznych (BP) wybrano jedynie 7, potencjalnie związanych z przetwarzaniem zachowań emocjonalnych (dla wartości $p<0,05$) (Rycina 5). Ponadto, cała analiza dostarczyła wyniki o 3 lokalnych sieciach klastrów (STRING), a także o 3 szlakach biologicznych (Reactome) w obrębie interakcji pomiędzy analizowanymi w prezentowanych badaniach markerami, uzyskane na podstawie informacji zawartych w 5784 artykułach referencyjnych (PubMed).



RYCINA 4. (Zmodyfikowano) Gęstość numeryczna struktur immunoreaktywnych wobec acetylocholinoesterazy (AChE; A), pęcherzykowego transportera acetylocholiny (VAChT; B), receptora muskarynowego acetylocholiny typu 1(AChR$_{M1}$; C) oraz receptora nikotynowego acetylocholiny alfa-7 (AChR$_{α7}$; D), a także liczba komórek nerwowych wykazujących obecność AChR$_{M1}$ (E) i AChR$_{α7}$ (F) w ciele migdałowatym myszy z deficytem ERβ (ERβ$^{-/-}$) i myszy typu dzikiego (ERβ$^{+/+}$). ** ($p \leq 0, 01$) i *** ($p \leq 0, 001$) wskazują na statystycznie istotne różnice między myszami ERβ$^{-/-}$ a ERβ$^{+/+}$. LA — jądro boczne, BL — jądro podstawno-boczne, BM — jądro podstawno-przyśrodkowe, ME — jądro przyśrodkowe, CE — jądro środkowe, CO — jądro korowe.

FIGURE 4. *(Modified) The volumetric density of cholinergic markers such as acetylcholinesterase (AChE; A), vesicular acetylcholine transporter (VAChT; B), muscarinic acetylcholine type 1 receptor (AChR$_{M1}$; C), alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor (AChR$_{α7}$; D) and automated cells counting for AChR$_{M1}$ (E) and AChR$_{α7}$ (F) in the amygdala of ERβ knockout (ERβ$^{-/-}$) and wild-type (ERβ$^{+/+}$) mice. ** ($p \leqslant 0.01$) and *** ($p \leqslant 0.001$) indicate statistically significant differences between ERβ$^{-/-}$ and ERβ$^{+/+}$ mice. LA — lateral nucleus, BL — basolateral nucleus, BM — basomedial nucleus, ME — medial nucleus, CE — central nucleus, CO — cortical nucleus.*



***RYCINA* 5.** (Zmodyfikowano) Sieci interakcji białko-białko (PPI) badanych markerów dopaminergicznych (TH, DAT, DA_1 i DA_2), cholinergicznych (AChE, VAChT, $AChR_{M1}$ i $AChR_{\alpha7}$) oraz estrogenowych (ESR2 jako ERβ) według bazy danych STRING dla myszy domowej (łac. *Mus musculus*). (A) Sieć PPI zawiera 9 węzłów (badanych markerów) i 20 krawędzi (powiązania białko-białko). Przerywane linie reprezentują krawędzie pomiędzy 3 klastrami (dopaminergicznymi, cholinergicznymi i estrogenowymi). Grubość tych linii jest proporcjonalna do pewności krawędzi. (B) Wykres kołowy prezentuje procesy biologiczne związane z zachowaniami emocjonalnym. Każdy kolor reprezentuje określony proces biologiczny.

***FIGURE* 5.** *(Modified) Protein–protein interaction (PPI) networks of potential targets by STRING database (Mus musculus). (A) PPI network contains 9 nodes (proteins) and 20 edges (protein–protein associations). Dotted lines represent edges among 3 clusters (dopaminergic, cholinergic, and oestrogenic). The thickness of the line is proportional to the edge confidence. (B) Pie chart of term associated with emotional behaviour. Each colour represents a particular biological process.*

Tabela 4. Analiza statystyczna badanych markerów w ciele migdałowatym myszy ERβ$^{+/+}$ i ERβ$^{-/-}$

Table 4. *Statistical analysis of studied markers between ERβ$^{+/+}$ and ERβ$^{-/-}$ mice in the amygdala*

	LA		**BL**		**BM**		**ME**		**CE**		**CO**	
		p		*p*		*p*		*p*		*p*		*p*
TH	$t_{7.45}$=9.40	0.000031	$t_{15.21}$=6.52	0.000003	$t_{10.99}$=5.65	0.000050	$t_{19.55}$=8.62	0.000000	$t_{17.07}$=8.98	0.000000	$t_{7.00}$=7.30	0.000175
DAT	$t_{12.64}$=9.88	0.000000	$t_{10.21}$=9.36	0.000002	$t_{8.97}$=9.56	0.000005	$t_{6.72}$=6.42	0.0004	$t_{21.87}$=8.73	0.000000	$t_{4.05}$=7.14	0.005
DA$_1$	t_{10}=-0.28	0.79	t_{10}=-0.43	0.67	t_{10}=0.07	0.95	t_{10}=0.19	0.85	t_{10}=0.23	0.82	t_{10}=-0.10	0.92
DA$_1$ IR-neurony	t_{10}=-1.08	0.30	t_{10}=1.31	0.22	t_{10}=1.35	0.21	t_{10}=-1.68	0.12	t_{10}=0.03	0.98	t_{10}=-0.02	0.98
DA$_2$	$t_{6.72}$=-5.22	0.001386	$t_{7.39}$=-9.85	0.000016	$t_{8.02}$=-3.61	0.006820	$t_{9.64}$=-5.67	0.000236	$t_{9.79}$=-7.27	0.00003	$t_{6.13}$=-5.07	0.002144
DA$_2$ IR-neurony	$t_{9.83}$=-8.87	0.000005	$t_{7.62}$=-8.44	0.000039	$t_{7.40}$=-10.74	0.000009	$t_{8.01}$=-12.40	0.000002	$t_{8.24}$=-9.00	0.000015	$t_{7.70}$=-8.68	0.00003
AChE	t_{10}=-0.02	0.98	t_{10}=-0.23	0.82	t_{10}=0.73	0.48	t_{10}=0.44	0.67	t_{10}=-0.43	0.68	t_{10}=-0.44	0.67
VAChT	t_{10}=-0.14	0.89	t_{10}=0.06	0.95	t_{10}=-0.24	0.81	t_{10}=-0.29	0.78	t_{10}=0.46	0.66	t_{10}=0.45	0.66
AChR$_{M1}$	$t_{9.34}$=-11.11	0.000001	$t_{5.69}$=-4.76	0.004	$t_{9.34}$=-16.23	0.000000	$t_{9.10}$=-12.72	0.000000	$t_{9.40}$=-10.65	0.000002	$t_{7.52}$=-11.81	0.000004
AChR$_{M1}$ IR-neurony	t_{10}=-0.42	0.68	t_{10}=0.49	0.64	t_{10}=-0.44	0.67	t_{10}=0.16	0.88	t_{10}=-0.55	0.60	t_{10}=0.31	0.77
AChR$_{a7}$	$t_{9.34}$=-11.11	0.000001	$t_{5.69}$=-4.76	0.004	$t_{9.34}$=-16.23	0.000000	$t_{9.10}$=-12.72	0.000000	$t_{9.40}$=-10.65	0.000002	$t_{7.52}$=-11.81	0.000004
AChR$_{a7}$ IR-neurony	t_{10}=0.66	0.52	t_{10}=-1.49	0.17	t_{10}=1.10	0.30	t_{10}=0.41	0.69	t_{10}=-0.86	0.41	t_{10}=0.66	0.52

IR – immunoreaktywne

4. Podsumowanie

Cykl dwóch prezentowanych publikacji stanowiący niniejszą rozprawę doktorską oparty został na badaniach wykorzystujących metody immunohistochemiczne i zautomatyzowaną analizę skanów liniowych. Metody te pozwoliły na ocenę i szczegółowe przeanalizowanie zmian ilościowych w całkowitej populacji neuronów tworzących jądra ciała migdałowatego, a także zmian ilościowych markerów układu GABAergiczego, dopaminergicznego i cholinergicznego w ciele migdałowatym dorosłych samic myszy z deficytem ERβ. Wyniki otrzymane w trakcie realizacji prezentowanych badań wykazały nieprawidłowości w charakterze i wzorze dystrybucji głównych markerów układu GABAergicznego, dopaminergicznego i cholinergicznego. Przyjmuje się, że obserwowane zmiany prowadzą, bądź są efektem zaburzonej sygnalizacji, która z kolei może zmieniać plastyczność synaptyczną ciała migdałowatego u badanych samic myszy. W dalszej konsekwencji, zmiany w obrębie tych populacji neuronalnych, mogą prowadzić do powstawania zaburzeń lękowych, których leczenie może obejmować modyfikację aktywności układu GABAergicznego, dopaminergicznego i cholinergicznego w ciele migdałowatym. Jednak dokładne określenie roli ERβ w zachowaniach związanych z lękiem w tym procesie wymaga dalszych badań.

Przeprowadzone analizy wykazały znaczące deficyty w liczbie komórek nerwowych we wszystkich głównych jądrach ciała migdałowatego u samic myszy z deficytem ERβ, którym towarzyszył wyższy poziom ekspresji GFAP w jądrze podstawno-przyśrodkowym, przyśrodkowym i korowym (**Publikacja 1**). Ponadto liczba komórek nerwowych wykazujących ekspresję dla CB, markera najliczniejszej subpopulacji komórkowej układu GABAergicznego, była istotnie obniżona we wszystkich jądrach ciała migdałowatego samic myszy $ER\beta^{-/-}$ w porównaniu z samicami myszami typu dzikiego. Tymczasem poziom ekspresji pozostałych markerów GABAergicznych w tym PV, CR, SOM, $GABA_{A\alpha1}$ i VGAT był porównywalny w obu badanych grupach myszy (**Publikacja 1**). Co więcej, poziom ekspresji markerów dopaminergicznych, takich jak: TH, DAT, DA_2 i cholinergicznych: $AChR_{M1}$ i $AChR_{\alpha7}$ był istotnie wyższy we wszystkich jądrach ciała migdałowatego samic myszy z deficytem ERβ niż u samic myszy typu dzikiego. Z kolei, poziom ekspresji struktur ciała migdałowatego wykazujących immunoreaktywność wobec pozostałych markerów

m.in. DA_1 (dopaminergiczny) i AChE i VAChT (cholinergiczne) w obu badanych grupach zwierząt był zbliżony (**Publikacja 2**).

5. Wnioski

Uzyskane wyniki są podstawą do przedstawienia następujących wniosków:

− deficyt receptora estrogenowego β u badanych samic myszy, zaburzając równowagę pomiędzy pobudzeniem a hamowaniem w ciele migdałowatym, a także oddziałując na główne neurotransmitery układu GABAergicznego, dopaminergicznego i cholinergicznego zaopatrujące tę strukturę mózgowia, może prowadzić do zaburzeń lękowych;

− redukcja liczby komórek nerwowych w badanych jądrach ciała migdałowatego u samic myszy z deficytem receptora estrogenowego β może wskazywać na postępujące procesy neurodegeneracyjne, zaburzające prawidłowe funkcjonowanie ciała migdałowatego tych zwierząt. Dodatkowo wyższy poziom ekspresji GFAP w jądrze podstawno-przyśrodkowym, przyśrodkowym i korowym, który towarzyszył obniżonej liczbie komórek nerwowych, może być związany z nasileniem stanu zapalnego w jądrach ciała migdałowatego, a w szczególności tych odpowiedzialnych za wygaszanie lęku, co również może być czynnikiem zakłócającym działanie ciała migdałowatego u tych zwierząt;

− niedobór CB, głównego markera subpopulacji komórek nerwowych GABAergicznych, może obniżać aktywność interneuronów, a w następstwie tego odblokowywać neurony piramidalne, które będą nasilały zachowania lękowe obserwowane u samic myszy z deficytem receptora estrogenowego β;

− brak zmian w poziomie ekspresji pozostałych markerów subpopulacji komórek nerwowych GABAergicznych tj. PV, CR, SOM, $GABA_{A\alpha1}$ i VGAT we wszystkich analizowanych jądrach ciała migdałowatego samic myszy ERβ, może świadczyć o tym, że nie są one w pełni zaangażowane w procesy związane z zachowaniami lękowymi, które są nasilone u tych zwierząt;

− podwyższony poziom ekspresji wybranych markerów układu dopaminergicznego (TH oraz DA_2) i cholinergicznego ($AChR_{M1}$) we wszystkich jądrach ciała migdałowatego samic myszy z deficytem receptora estrogenowego β może świadczyć o ich istotnym udziale w regulowaniu zachowań lękowych, a konkretnie w ich wygaszaniu (funkcja anksjolityczna).

Jednakże, zwiększony poziom ekspresji markera dopaminergicznego takiego jak DAT w analizowanych jądrach ciała migdałowatego tych samic myszy może być związany z przeciwstawnym jego wpływem, a mianowicie pobudzającym te zachowania (funkcja aksjogenna);

− podwyższony poziom ekspresji markera układu cholinergicznego tj. $AChR_{\alpha 7}$ we wszystkich analizowanych jądrach ciała migdałowatego samic myszy z deficytem receptora estrogenowego β może być również związany z zachowaniami lękowymi obserwowanymi u tych zwierząt, jednakże mechanizm jego działania wydaje się być niejednoznaczny, gdyż może pełnić funkcję ankjolityczną lub aksjogenną.

6. Piśmiennictwo

Albuquerque EX, Pereira EFR, Alkondon M, Rogers SW (2009) Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. Physiol Rev 89:73–120. https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2008

Altwaijri YA, Al-Subaie AS, Al-Habeeb A, et al (2020) Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of mental disorders in the Saudi National Mental Health Survey. Int J Methods Psychiatr Res 29:e1836. https://doi.org/10.1002/mpr.1836

Asan E (1998) The catecholaminergic innervation of the rat amygdala. Adv Anat Embryol Cell Biol 142:1–118. https://doi.org/10.1007/978-3-642-72085-7

Asan E (1997) Ultrastructural features of tyrosine-hydroxylase-immunoreactive afferents and their targets in the rat amygdala. Cell Tissue Res 288:449–469. https://doi.org/10.1007/s004410050832

Baker AE, Brautigam VM, Watters JJ (2004) Estrogen Modulates Microglial Inflammatory Mediator Production via Interactions with Estrogen Receptor β. Endocrinology 145:5021–5032. https://doi.org/10.1210/en.2004-0619

Bananej M, Karimi-Sori A, Zarrindast MR, Ahmadi S (2012) D1 and D2 dopaminergic systems in the rat basolateral amygdala are involved in anxiogenic-like effects induced by histamine. J Psychopharmacol Oxf Engl 26:564–574. https://doi.org/10.1177/0269881111405556

Bansal S, Chopra K (2021) Selective ER-β agonists alleviate neuronal deficits in insulin-resistant estrogen-deficient rats. Climacteric 24:415–420. https://doi.org/10.1080/13697137.2020.1857353

Barth C, Villringer A, Sacher J (2015) Sex hormones affect neurotransmitters and shape the adult female brain during hormonal transition periods. Front Neurosci 9:. https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00037

Baum MJ (2009) Sexual differentiation of pheromone processing: Links to male-typical mating behavior and partner preference. Horm Behav 55:579–588. https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2009.02.008

Baxter MG, Chiba AA (1999) Cognitive functions of the basal forebrain. Curr Opin Neurobiol 9:178–183. https://doi.org/10.1016/s0959-4388(99)80024-5

Beaulieu J-M, Gainetdinov RR (2011) The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. Pharmacol Rev 63:182–217. https://doi.org/10.1124/pr.110.002642

Beyer C, Pilgrim C, Reisert I (1991) Dopamine content and metabolism in mesencephalic and diencephalic cell cultures: sex differences and effects of sex steroids. J Neurosci 11:1325–1333. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.11-05-01325.1991

Bhatnagar S, Vining C, Denski K (2004) Regulation of Chronic Stress-Induced Changes in Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Activity by the Basolateral Amygdala. Ann N Y Acad Sci 1032:315–319. https://doi.org/10.1196/annals.1314.050

Blackburn JR, Pfaus JG, Phillips AG (1992) Dopamine functions in appetitive and defensive behaviours. Prog Neurobiol 39:247–279. https://doi.org/10.1016/0301-0082(92)90018-a

Boccia MM, Blake MG, Baratti CM, McGaugh JL (2009) Involvement of the basolateral amygdala in muscarinic cholinergic modulation of extinction memory consolidation. Neurobiol Learn Mem 91:93–97. https://doi.org/10.1016/j.nlm.2008.07.012

Braun AR, Chase TN (1986) Obligatory D-1/D-2 receptor interaction in the generation of dopamine agonist related behaviors. Eur J Pharmacol 131:301–306. https://doi.org/10.1016/0014-2999(86)90588-1

Briand LA, Gritton H, Howe WM, et al (2007) Modulators in concert for cognition: modulator interactions in the prefrontal cortex. Prog Neurobiol 83:69–91. https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2007.06.007

Canli T, Sivers H, Whitfield SL, et al (2002) Amygdala response to happy faces as a function of extraversion. Science 296:2191. https://doi.org/10.1126/science.1068749

Cardoso CC, Pereira RTS, Koyama CA, et al (2004) Effects of Estrogen on Muscarinic Acetylcholine Receptors in the Rat Hippocampus. Neuroendocrinology 80:379–386. https://doi.org/10.1159/000084202

Carlsen J, Záborszky L, Heimer L (1985) Cholinergic projections from the basal forebrain to the basolateral amygdaloid complex: a combined retrograde fluorescent and immunohistochemical study. J Comp Neurol 234:155–167. https://doi.org/10.1002/cne.902340203

Chen C, Gong X, Yang X, et al (2019) The roles of estrogen and estrogen receptors in gastrointestinal disease. Oncol Lett 18:5673–5680. https://doi.org/10.3892/ol.2019.10983

Chu H-Y, Ito W, Li J, Morozov A (2012) Target-Specific Suppression of GABA Release from Parvalbumin Interneurons in the Basolateral Amygdala by Dopamine. J Neurosci 32:14815–14820. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2997-12.2012

Craske MG, Stein MB (2016) Anxiety. The Lancet 388:3048–3059. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30381-6

Dalla C, Shors TJ (2009) Sex differences in learning processes of classical and operant conditioning. Physiol Behav 97:229–238. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.02.035

de la Mora MP, Gallegos-Cari A, Arizmendi-García Y, et al (2010) Role of dopamine receptor mechanisms in the amygdaloid modulation of fear and anxiety: Structural and functional analysis. Prog Neurobiol 90:198–216. https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2009.10.010

de la Mora MP, Gallegos-Cari A, Crespo-Ramirez M, et al (2012) Distribution of dopamine D2-like receptors in the rat amygdala and their role in the modulation of unconditioned fear and anxiety. Neuroscience 201:252–266. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.10.045

Degroot A, Kashluba S, Treit D (2001) Septal GABAergic and hippocampal cholinergic systems modulate anxiety in the plus-maze and shock-probe tests. Pharmacol Biochem Behav 69:391–399. https://doi.org/10.1016/S0091-3057(01)00541-X

Del Río JP, Alliende MI, Molina N, et al (2018) Steroid Hormones and Their Action in Women's Brains: The Importance of Hormonal Balance. Front Public Health 6:141. https://doi.org/10.3389/fpubh.2018.00141

Disshon KA, Boja JW, Dluzen DE (1998) Inhibition of striatal dopamine transporter activity by 17beta-estradiol. Eur J Pharmacol 345:207–211. https://doi.org/10.1016/s0014-2999(98)00008-9

Dohanich GP, Witcher JA, Weaver DR, Clemens LG (1982) Alteration of muscarinic binding in specific brain areas following estrogen treatment. Brain Res 241:347–350. https://doi.org/10.1016/0006-8993(82)91075-7

Dombret C, Naulé L, Trouillet A-C, et al (2020) Effects of neural estrogen receptor beta deletion on social and mood-related behaviors and underlying mechanisms in male mice. Sci Rep 10:6242. https://doi.org/10.1038/s41598-020-63427-4

El-Bakri NK, Adem A, Suliman IA, et al (2002) Estrogen and progesterone treatment: effects on muscarinic M(4) receptor subtype in the rat brain. Brain Res 948:131–137. https://doi.org/10.1016/s0006-8993(02)02962-1

Engin E, Treit D (2008) The effects of intra-cerebral drug infusions on animals' unconditioned fear reactions: a systematic review. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 32:1399–1419. https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2008.03.020

Fadok JP, Dickerson TMK, Palmiter RD (2009) Dopamine is necessary for cue-dependent fear conditioning. J Neurosci 29:11089–11097. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1616-09.2009

Genazzani AR, Spinetti A, Gallo R, Bernardi F (1999) Menopause and the central nervous system: intervention options. Maturitas 31:103–110. https://doi.org/10.1016/S0378-5122(98)00112-1

Gibbs RB (1996) Expression of estrogen receptor-like immunoreactivity by different subgroups of basal forebrain cholinergic neurons in gonadectomized male and female rats. Brain Res 720:61–68. https://doi.org/10.1016/0006-8993(96)00106-0

Glover EM, Mercer KB, Norrholm SD, et al (2013) Inhibition of fear is differentially associated with cycling estrogen levels in women. J Psychiatry Neurosci JPN 38:341–348. https://doi.org/10.1503/jpn.120129

Gonchar Y, Burkhalter A (1999) Connectivity of GABAergic calretinin-immunoreactive neurons in rat primary visual cortex. Cereb Cortex 9:683–696. https://doi.org/10.1093/cercor/9.7.683

Gotti C, Clementi F, Fornari A, et al (2009) Structural and functional diversity of native brain neuronal nicotinic receptors. Biochem Pharmacol 78:703–711. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.05.024

Guarraci FA, Frohardt RJ, Falls WA, Kapp BS (2000) The effects of intra-amygdaloid infusions of a D2 dopamine receptor antagonist on Pavlovian fear conditioning. Behav Neurosci 114:647–651. https://doi.org/10.1037//0735-7044.114.3.647

Guarraci FA, Frohardt RJ, Kapp BS (1999) Amygdaloid D1 dopamine receptor involvement in Pavlovian fear conditioning. Brain Res 827:28–40. https://doi.org/10.1016/s0006-8993(99)01291-3

Gulyás AI, Hájos N, Freund TF (1996) Interneurons containing calretinin are specialized to control other interneurons in the rat hippocampus. J Neurosci 16:3397–3411

Guyton AC, Hall JE (2011) Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology. Elsevier

Handa RJ, Ogawa S, Wang JM, Herbison AE (2012) Roles for Oestrogen Receptor β in Adult Brain Function. J Neuroendocrinol 24:160–173. https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2011.02206.x

Herrera AY, Hodis HN, Mack WJ, Mather M (2017) Estradiol Therapy After Menopause Mitigates Effects of Stress on Cortisol and Working Memory. J Clin Endocrinol Metab 102:4457–4466. https://doi.org/10.1210/jc.2017-00825

Hornung J-P (2003) The human raphe nuclei and the serotonergic system. J Chem Neuroanat 26:331–343. https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2003.10.002

Hörtnagl H, Tasan RO, Wieselthaler A, et al (2013) Patterns of mRNA and protein expression for 12 GABAA receptor subunits in the mouse brain. Neuroscience 236:345–372. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.01.008

Hyman SE, Malenka RC, Nestler EJ (2006) Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. Annu Rev Neurosci 29:565–598. https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.29.051605.113009

Imamov O, Shim G-J, Warner M, Gustafsson J-Å (2005) Estrogen Receptor beta in Health and Disease1. Biol Reprod 73:866–871. https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.043497

Imwalle DB, Gustafsson J-A, Rissman EF (2005) Lack of functional estrogen receptor beta influences anxiety behavior and serotonin content in female mice. Physiol Behav 84:157–163. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.11.002

Irwin RW, Yao J, To J, et al (2012) Selective oestrogen receptor modulators differentially potentiate brain mitochondrial function. J Neuroendocrinol 24:236–248. https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2011.02251.x

Jacobs E, D'Esposito M (2011) Estrogen shapes dopamine-dependent cognitive processes: implications for women's health. J Neurosci Off J Soc Neurosci 31:5286–5293. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6394-10.2011

Jacome LF, Gautreaux C, Inagaki T, et al (2010) Estradiol and ERβ agonists enhance recognition memory, and DPN, an ERβ agonist, alters brain monoamines. Neurobiol Learn Mem 94:488–498. https://doi.org/10.1016/j.nlm.2010.08.016

Janak PH, Tye KM (2015) From circuits to behaviour in the amygdala. Nature 517:284–292. https://doi.org/10.1038/nature14188

Jiang L, Kundu S, Lederman JD, et al (2016) Cholinergic Signaling Controls Conditioned Fear Behaviors and Enhances Plasticity of Cortical-Amygdala Circuits. Neuron 90:1057–1070. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.04.028

Kaufmann WA, Humpel C, Alheid GF, Marksteiner J (2003) Compartmentation of alpha 1 and alpha 2 GABAA receptor subunits within rat extended amygdala: implications for benzodiazepine action. Brain Res 964:91–99. https://doi.org/10.1016/S0006-8993(02)04082-9

Kebabian JW, Calne DB (1979) Multiple receptors for dopamine. Nature 277:93–96. https://doi.org/10.1038/277093a0

Kemppainen, Pitkänen (2000) Distribution of parvalbumin, calretinin, and calbindin-D28k immunoreactivity in the rat amygdaloid complex and colocalization with γ-aminobutyric acid. J Comp Neurol 426:441–467. https://doi.org/10.1002/1096-9861(20001023)426:3<441::AID-CNE8>3.0.CO;2-7

Klein RC, Yakel JL (2006) Functional somato-dendritic alpha7-containing nicotinic acetylcholine receptors in the rat basolateral amygdala complex. J Physiol 576:865–872. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.118232

Kordower JH, Bartus RT, Marciano FF, Gash DM (1989) Telencephalic cholinergic system of the New World monkey (Cebus apella): morphological and cytoarchitectonic assessment and analysis of the projection to the amygdala. J Comp Neurol 279:528–545. https://doi.org/10.1002/cne.902790403

Krabbe S, Gründemann J, Lüthi A (2018) Amygdala Inhibitory Circuits Regulate Associative Fear Conditioning. Biol Psychiatry 83:800–809. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.10.006

Krężel W, Dupont S, Krust A, et al (2001) Increased anxiety and synaptic plasticity in estrogen receptor -deficient mice. Proc Natl Acad Sci 98:12278–12282. https://doi.org/10.1073/pnas.221451898

Krichmar JL (2008) The Neuromodulatory System: A Framework for Survival and Adaptive Behavior in a Challenging World. Adapt Behav 16:385–399. https://doi.org/10.1177/1059712308095775

Kritzer MF (2006) Regional, laminar and cellular distribution of immunoreactivity for ERbeta in the cerebral cortex of hormonally intact, postnatally developing male and female rats. Cereb Cortex N Y N 1991 16:1181–1192. https://doi.org/10.1093/cercor/bhj059

Kröner S, Rosenkranz JA, Grace AA, Barrionuevo G (2005) Dopamine Modulates Excitability of Basolateral Amygdala Neurons In Vitro. J Neurophysiol 93:1598–1610. https://doi.org/10.1152/jn.00843.2004

Kupfer DJ (2015) Anxiety and DSM-5. Dialogues Clin Neurosci 17:245. https://doi.org/10.31887/DCNS.2015.17.3/dkupfer

Lalumiere RT, Nguyen LT, McGaugh JL (2004) Post-training intrabasolateral amygdala infusions of dopamine modulate consolidation of inhibitory avoidance memory: involvement of noradrenergic and cholinergic systems. Eur J Neurosci 20:2804–2810. https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03744.x

LeDoux J (2003) The emotional brain, fear, and the amygdala. Cell Mol Neurobiol 23:727–738. https://doi.org/10.1023/A:1025048802629

Li X, Wang Z, Tan L, et al (2017) Correcting miR92a-vGAT-Mediated GABAergic Dysfunctions Rescues Human Tau-Induced Anxiety in Mice. Mol Ther J Am Soc Gene Ther 25:140–152. https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2016.10.010

Liu X, Song M, Chen X, et al (2022) Activation of Estrogen Receptor β in the Lateral Habenula Improves Ovariectomy-Induced Anxiety-Like Behavior in Rats. Front Behav Neurosci 16:

Luine VN (1985) Estradiol increases choline acetyltransferase activity in specific basal forebrain nuclei and projection areas of female rats. Exp Neurol 89:484–490. https://doi.org/10.1016/0014-4886(85)90108-6

Lund TD, Rovis T, Chung WCJ, Handa RJ (2005) Novel Actions of Estrogen Receptor-β on Anxiety-Related Behaviors. Endocrinology 146:797–807. https://doi.org/10.1210/en.2004-1158

Maharjan S, Serova L, Sabban EL (2005) Transcriptional regulation of tyrosine hydroxylase by estrogen: opposite effects with estrogen receptors α and β and interactions with cyclic AMP. J Neurochem 93:1502–1514. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03142.x

Martins DB, Mazzanti CM, França RT, et al (2012) 17-β estradiol in the acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation in the brain and blood of ovariectomized adult and middle-aged rats. Life Sci 90:351–359. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2011.12.006

Martínez-García F, Martínez-Marcos A, Lanuza E (2002) The pallial amygdala of amniote vertebrates: evolution of the concept, evolution of the structure. Brain Res Bull 57:463–469. https://doi.org/10.1016/S0361-9230(01)00665-7

Mascagni F, Muly EC, Rainnie DG, McDonald AJ (2009) Immunohistochemical characterization of parvalbumin-containing interneurons in the monkey basolateral amygdala. Neuroscience 158:1541–1550. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.11.017

Matsuda S, Matsuzawa D, Ishii D, et al (2012) Effects of perinatal exposure to low dose of bisphenol A on anxiety like behavior and dopamine metabolites in brain. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 39:273–279. https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2012.06.016

McDonald AJ (1996) Glutamate and aspartate immunoreactive neurons of the rat basolateral amygdala: Colocalization of excitatory amino acids and projections to the limbic circuit. J Comp Neurol 365:367–379. https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19960212)365:3<367::AID-CNE3>3.0.CO;2-2

McDonald AJ (2020) Chapter 1 - Functional neuroanatomy of the basolateral amygdala: Neurons, neurotransmitters, and circuits. In: Urban JH, Rosenkranz JA (eds) Handbook of Behavioral Neuroscience. Elsevier, pp 1–38

McDonald AJ, Mascagni F (2002) Immunohistochemical characterization of somatostatin containing interneurons in the rat basolateral amygdala. Brain Res 943:237–244

McDonald AJ, Mascagni F (2004) Parvalbumin-containing interneurons in the basolateral amygdala express high levels of the ?1 subunit of the GABAA receptor. J Comp Neurol 473:137–146. https://doi.org/10.1002/cne.20101

McDonald AJ, Mascagni F (2010) Neuronal localization of m1 muscarinic receptor immunoreactivity in the rat basolateral amygdala. Brain Struct Funct 215:37–48. https://doi.org/10.1007/s00429-010-0272-y

McDonald AJ, Mott DD (2021) Neuronal localization of m1 muscarinic receptor immunoreactivity in the monkey basolateral amygdala. J Comp Neurol 529:2450–2463. https://doi.org/10.1002/cne.25104

McDonald, Mascagni (2001) Colocalization of calcium-binding proteins and GABA in neurons of the rat basolateral amygdala. Neuroscience 105:681–693. https://doi.org/10.1016/S0306-4522(01)00214-7

McDonald, Pearson (1989) Coexistence of GABA and peptide immunoreactivity in non-pyramidal neurons of the basolateral amygdala. Neurosci Lett 100:53–58. https://doi.org/10.1016/0304-3940(89)90659-9

McEwen BS, Alves SE (1999) Estrogen actions in the central nervous system. Endocr Rev 20:279–307. https://doi.org/10.1210/edrv.20.3.0365

McGaugh JL (2004) The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. Annu Rev Neurosci 27:1–28. https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.27.070203.144157

McMillan PJ, Singer CA, Dorsa DM (1996) The effects of ovariectomy and estrogen replacement on trkA and choline acetyltransferase mRNA expression in the basal forebrain of the adult female Sprague-Dawley rat. J Neurosci 16:1860–1865. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-05-01860.1996

Meijering E (2003) FeatureJ: An ImageJ Plugin Suite for Image Feature Extraction. https://imagescience.org/meijering/software/featurej/. Accessed 27 May 2022

Melchitzky DS, Lewis DA (2008) Dendritic-targeting GABA neurons in monkey prefrontal cortex: Comparison of somatostatin- and calretinin-immunoreactive axon terminals. Synapse 62:456–465. https://doi.org/10.1002/syn.20514

Merchenthaler I, Lane MV, Numan S, Dellovade TL (2004) Distribution of estrogen receptor α and β in the mouse central nervous system: In vivo autoradiographic and immunocytochemical analyses. J Comp Neurol 473:270–291. https://doi.org/10.1002/cne.20128

Meskenaite V (1997) Calretinin-immunoreactive local circuit neurons in area 17 of the cynomolgus monkey, Macaca fascicularis. J Comp Neurol 379:113–132. https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19970303)379:1<113::AID-CNE8>3.0.CO;2-7

Milad MR, Igoe SA, Lebron-Milad K, Novales JE (2009) Estrous cycle phase and gonadal hormones influence conditioned fear extinction. Neuroscience 164:887–895. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.09.011

Milad MR, Zeidan MA, Contero A, et al (2010) The influence of gonadal hormones on conditioned fear extinction in healthy humans. Neuroscience 168:652–658. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.04.030

Mineur YS, Fote GM, Blakeman S, et al (2016) Multiple Nicotinic Acetylcholine Receptor Subtypes in the Mouse Amygdala Regulate Affective Behaviors and Response to Social Stress. Neuropsychopharmacology 41:1579–1587. https://doi.org/10.1038/npp.2015.316

Mitsushima D (2010) Sex steroids and acetylcholine release in the hippocampus. Vitam Horm 82:263–277. https://doi.org/10.1016/S0083-6729(10)82014-X

Morrison JH, Brinton RD, Schmidt PJ, Gore AC (2006) Estrogen, Menopause, and the Aging Brain: How Basic Neuroscience Can Inform Hormone Therapy in Women. J Neurosci 26:10332–10348. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3369-06.2006

Muller JF, Mascagni F, McDonald AJ (2005) Coupled Networks of Parvalbumin-Immunoreactive Interneurons in the Rat Basolateral Amygdala. J Neurosci 25:7366–7376. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0899-05.2005

Muller JF, Mascagni F, McDonald AJ (2007) Serotonin-immunoreactive axon terminals innervate pyramidal cells and interneurons in the rat basolateral amygdala. J Comp Neurol 505:314–335. https://doi.org/10.1002/cne.21486

Muller JF, Mascagni F, McDonald AJ (2009) Dopaminergic innervation of pyramidal cells in the rat basolateral amygdala. Brain Struct Funct 213:275–288. https://doi.org/10.1007/s00429-008-0196-y

Muller JF, Mascagni F, McDonald AJ (2011) Cholinergic Innervation of Pyramidal Cells and Parvalbumin-Immunoreactive Interneurons in the Rat Basolateral Amygdala. J Comp Neurol 519:790–805. https://doi.org/10.1002/cne.22550

Muller JF, Mascagni F, Zaric V, McDonald AJ (2013) Muscarinic Cholinergic Receptor M1 in the Rat Basolateral Amygdala: Ultrastructural Localization and Synaptic Relationships to Cholinergic Axons. J Comp Neurol 521:1743–1759. https://doi.org/10.1002/cne.23254

Murakami G (2016) Distinct Effects of Estrogen on Mouse Maternal Behavior: The Contribution of Estrogen Synthesis in the Brain. PLoS ONE 11:e0150728. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150728

Nakano Y, Lénárd L, Oomura Y, et al (1987) Functional involvement of catecholamines in reward-related neuronal activity of the monkey amygdala. J Neurophysiol 57:72–91. https://doi.org/10.1152/jn.1987.57.1.72

Neves GA, Grace AA (2019) α7 nicotinic receptor full agonist reverse basolateral amygdala hyperactivity and attenuation of dopaminergic neuron activity in rats exposed to chronic mild stress. Eur Neuropsychopharmacol 29:1343–1353. https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2019.09.009

Nilsson ME, Vandenput L, Tivesten Å, et al (2015) Measurement of a Comprehensive Sex Steroid Profile in Rodent Serum by High-Sensitive Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. Endocrinology 156:2492–2502. https://doi.org/10.1210/en.2014-1890

Nilsson S, Gustafsson J-Å (2011) Estrogen receptors: therapies targeted to receptor subtypes. Clin Pharmacol Ther 89:44–55. https://doi.org/10.1038/clpt.2010.226

Nomura M, Durbak L, Chan J, et al (2002) Genotype/Age Interactions on Aggressive Behavior in Gonadally Intact Estrogen Receptor β Knockout (βERKO) Male Mice. Horm Behav 41:288–296. https://doi.org/10.1006/hbeh.2002.1773

Oei TP, King MG (1980) Catecholamines and aversive learning: a review. Neurosci Biobehav Rev 4:161–173. https://doi.org/10.1016/0149-7634(80)90014-7

Ogawa S, Chan J, Chester AE, et al (1999) Survival of reproductive behaviors in estrogen receptor beta gene-deficient (betaERKO) male and female mice. Proc Natl Acad Sci U S A 96:12887–12892. https://doi.org/10.1073/pnas.96.22.12887

Ogawa S, Lubahn DB, Korach KS, Pfaff DW (1997) Behavioral effects of estrogen receptor gene disruption in male mice. Proc Natl Acad Sci 94:1476–1481. https://doi.org/10.1073/pnas.94.4.1476

Olucha-Bordonau FE, Fortes-Marco L, Otero-García M, et al (2015) Amygdala. In: The Rat Nervous System. Elsevier, pp 441–490

O'Malley CA, Hautamaki RD, Kelley M, Meyer EM (1987) Effects of ovariectomy and estradiol benzoate on high affinity choline uptake, ACh synthesis, and release from rat cerebral cortical synaptosomes. Brain Res 403:389–392. https://doi.org/10.1016/0006-8993(87)90082-5

Oyola MG, Portillo W, Reyna A, et al (2012) Anxiolytic Effects and Neuroanatomical Targets of Estrogen Receptor-β (ERβ) Activation by a Selective ERβ Agonist in Female Mice. Endocrinology 153:837–846. https://doi.org/10.1210/en.2011-1674

Pabba M (2013) Evolutionary development of the amygdaloid complex. Front Neuroanat 7:. https://doi.org/10.3389/fnana.2013.00027

Pape H-C, Narayanan RT, Smid J, et al (2005) Theta activity in neurons and networks of the amygdala related to long-term fear memory. Hippocampus 15:874–880. https://doi.org/10.1002/hipo.20120

Pape H-C, Pare D (2010) Plastic Synaptic Networks of the Amygdala for the Acquisition, Expression, and Extinction of Conditioned Fear. Physiol Rev 90:419–463. https://doi.org/10.1152/physrev.00037.2009

Paxinos G, Franklin KBJ (2019) Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. Academic Press

Pezze MA, Feldon J (2004) Mesolimbic dopaminergic pathways in fear conditioning. Prog Neurobiol 74:301–320. https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2004.09.004

Picciotto MR, Lewis AS, van Schalkwyk GI, Mineur YS (2015) Mood and anxiety regulation by nicotinic acetylcholine receptors: A potential pathway to modulate aggression and related behavioral states. Neuropharmacology 96:235–243. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.12.028

Pidoplichko VI, Prager EM, Aroniadou-Anderjaska V, Braga MFM (2013) α7-Containing nicotinic acetylcholine receptors on interneurons of the basolateral amygdala and their role in the regulation of the network excitability. J Neurophysiol 110:2358–2369. https://doi.org/10.1152/jn.01030.2012

Pinard CR, Muller JF, Mascagni F, McDonald AJ (2008) Dopaminergic innervation of interneurons in the rat basolateral amygdala. Neuroscience 157:850–863. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.09.043

Pitkanen A, Amaral D (1994) The distribution of GABAergic cells, fibers, and terminals in the monkey amygdaloid complex: an immunohistochemical and in situ hybridization study. J Neurosci 14:2200–2224. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-04-02200.1994

Power AE, Vazdarjanova A, McGaugh JL (2003) Muscarinic cholinergic influences in memory consolidation. Neurobiol Learn Mem 80:178–193. https://doi.org/10.1016/s1074-7427(03)00086-8

Prager EM, Bergstrom HC, Wynn GH, Braga MFM (2016) The Basolateral Amygdala GABAergic System in Health and Disease. J Neurosci Res 94:548–567. https://doi.org/10.1002/jnr.23690

Puelles L, Kuwana E, Puelles E, et al (2000) Pallial and subpallial derivatives in the embryonic chick and mouse telencephalon, traced by the expression of the genes Dlx-2, Emx-1, Nkx-2.1, Pax-6, and Tbr-1. J Comp Neurol 424:409–438. https://doi.org/10.1002/1096-9861(20000828)424:3<409::aid-cne3>3.0.co;2-7

Rajmohan V, Mohandas E (2007) The limbic system. Indian J Psychiatry 49:132–139. https://doi.org/10.4103/0019-5545.33264

Revay R, Vaughan R, Grant S, Kuhar MJ (1996) Dopamine transporter immunohistochemistry in median eminence, amygdala, and other areas of the rat brain. Synapse 22:93–99. https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2396(199602)22:2<93::AID-SYN1>3.0.CO;2-C

Równiak M (2017) The neurons expressing calcium-binding proteins in the amygdala of the guinea pig: precisely designed interface for sex hormones. Brain Struct Funct 222:3775–3793. https://doi.org/10.1007/s00429-017-1432-0

Równiak M, Bogus-Nowakowska K, Robak A (2015) The densities of calbindin and parvalbumin, but not calretinin neurons, are sexually dimorphic in the amygdala of the guinea pig. Brain Res. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.01.048

Równiak M, Kolenkiewicz M, Kozłowska A (2017) Parvalbumin, but not calretinin, neurons express high levels of α1-containing GABAA receptors, α7-containing nicotinic acetylcholine receptors and D2-dopamine receptors in the basolateral amygdala of the rat. J Chem Neuroanat 86:41–51. https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2017.08.002

Równiak M, Robak A, Bogus-Nowakowska K, et al (2008) Somatostatin-like immunoreactivity in the amygdala of the pig. Folia Histochem Cytobiol 46:229–238. https://doi.org/10.2478/v10042-008-0035-2

Równiak M, Szteyn S, Robak A (2003) A comparative study of the mammalian amygdala: a Golgi study of the basolateral amygdala. Folia Morphol 62:331–339

Sah P, Faber ESL, Lopez De Armentia M, Power J (2003) The Amygdaloid Complex: Anatomy and Physiology. Physiol Rev 83:803–834. https://doi.org/10.1152/physrev.00002.2003

Salinas-Hernández XI, Duvarci S (2021) Dopamine in Fear Extinction. Front Synaptic Neurosci 13:635879. https://doi.org/10.3389/fnsyn.2021.635879

Sathyanesan A, Ogura T, Lin W (2012) Automated Measurement of Nerve Fiber Density Using Line Intensity Scan Analysis. J Neurosci Methods 206:165–175. https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2012.02.019

Sato Y, Nakajima S, Shiraga N, et al (1998) Three-dimensional multi-scale line filter for segmentation and visualization of curvilinear structures in medical images. Med Image Anal 2:143–168. https://doi.org/10.1016/s1361-8415(98)80009-1

Scatton B, Simon H, Le Moal M, Bischoff S (1980) Origin of dopaminergic innervation of the rat hippocampal formation. Neurosci Lett 18:125–131. https://doi.org/10.1016/0304-3940(80)90314-6

See RE (2005) Neural substrates of cocaine-cue associations that trigger relapse. Eur J Pharmacol 526:140–146. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.09.034

Seidlitz L, Diener E (1998) Sex differences in the recall of affective experiences. J Pers Soc Psychol. https://doi.org/10.1037/0022-3514.74.1.262

Sienkiewicz-Jarosz H, Członkowska AI, Siemiatkowski M, et al (2000) The effects of physostigmine and cholinergic receptor ligands on novelty-induced neophobia. J Neural Transm Vienna Austria 1996 107:1403–1412. https://doi.org/10.1007/s007020070004

Simpkins JW, Green PS, Gridley KE, et al (1997) Role of estrogen replacement therapy in memory enhancement and the prevention of neuronal loss associated with Alzheimer's disease. Am J Med 103:19S-25S. https://doi.org/10.1016/s0002-9343(97)00260-x

Simpson ER (2003) Sources of estrogen and their importance. J Steroid Biochem Mol Biol 86:225–230. https://doi.org/10.1016/s0960-0760(03)00360-1

Song Y-H, Yoon J, Lee S-H (2021) The role of neuropeptide somatostatin in the brain and its application in treating neurological disorders. Exp Mol Med 53:328–338. https://doi.org/10.1038/s12276-021-00580-4

Sorvari H, Miettinen R, Soininen H, Pitkanen A (1996) Parvalbumin-immunoreactive neurons make inhibitory synapses on pyramidal cells in the human amygdala: a light and electron microscopic study. Neurosci Lett 217:93–96. https://doi.org/10.1016/0304-3940(96)13067-6

Sorvari H, Soininen H, Paljärvi L, et al (1995) Distribution of parvalbumin-immunoreactive cells and fibers in the human amygdaloid complex. J Comp Neurol 360:185–212. https://doi.org/10.1002/cne.903600202

Steel Z, Marnane C, Iranpour C, et al (2014) The global prevalence of common mental disorders: a systematic review and meta-analysis 1980-2013. Int J Epidemiol 43:476–493. https://doi.org/10.1093/ije/dyu038

Sugiyama N, Barros RPA, Warner M, Gustafsson J-Å (2010) ERβ: recent understanding of estrogen signaling. Trends Endocrinol Metab 21:545–552. https://doi.org/10.1016/j.tem.2010.05.001

Swanson LW, Petrovich GD (1998) What is the amygdala? Trends Neurosci 21:323–331. https://doi.org/10.1016/s0166-2236(98)01265-x

Swenson RS, Gulledge AT (2017) The Cerebral Cortex. In: Conn's Translational Neuroscience. Elsevier, pp 263–288

Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, et al (2015) STRING v10: protein–protein interaction networks, integrated over the tree of life. Nucleic Acids Res 43:D447–D452. https://doi.org/10.1093/nar/gku1003

Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, et al (2019) STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. Nucleic Acids Res 47:D607–D613. https://doi.org/10.1093/nar/gky1131

Szklarczyk D, Gable AL, Nastou KC, et al (2021) The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. Nucleic Acids Res 49:D605–D612. https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1074

Vandegrift BJ, You C, Satta R, et al (2017) Estradiol increases the sensitivity of ventral tegmental area dopamine neurons to dopamine and ethanol. PLOS ONE 12:e0187698. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187698

Vargas KG, Milic J, Zaciragic A, et al (2016) The functions of estrogen receptor beta in the female brain: A systematic review. Maturitas 93:41–57. https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2016.05.014

Vaucher E, Reymond I, Najaffe R, et al (2002) Estrogen effects on object memory and cholinergic receptors in young and old female mice. Neurobiol Aging 23:87–95. https://doi.org/10.1016/S0197-4580(01)00250-0

Vazdarjanova A, McGaugh JL (1999) Basolateral Amygdala Is Involved in Modulating Consolidation of Memory for Classical Fear Conditioning. J Neurosci 19:6615–6622. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-15-06615.1999

Veinante P, Yalcin I, Barrot M (2013) The amygdala between sensation and affect: a role in pain. J Mol Psychiatry 1:9. https://doi.org/10.1186/2049-9256-1-9

Vereczki VK, Müller K, Krizsán É, et al (2021) Total Number and Ratio of GABAergic Neuron Types in the Mouse Lateral and Basal Amygdala. J Neurosci 41:4575–4595. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2700-20.2021

Walf AA, Frye CA (2007) Administration of estrogen receptor beta-specific selective estrogen receptor modulators to the hippocampus decrease anxiety and depressive behavior of ovariectomized rats. Pharmacol Biochem Behav 86:407–414. https://doi.org/10.1016/j.pbb.2006.07.003

Walf AA, Koonce C, Manley K, Frye CA (2009) Proestrous compared to diestrous wildtype, but not estrogen receptor beta knockout, mice have better performance in the spontaneous alternation and object recognition tasks and reduced anxiety-like behavior in the elevated plus and mirror maze. Behav Brain Res 196:254–260. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.09.016

Walters JR, Bergstrom DA, Carlson JH, et al (1987) D1 dopamine receptor activation required for postsynaptic expression of D2 agonist effects. Science 236:719–722. https://doi.org/10.1126/science.2953072

Wang L, Andersson S, Warner M, Gustafsson J-A (2001) Morphological abnormalities in the brains of estrogen receptor knockout mice. Proc Natl Acad Sci 98:2792–2796. https://doi.org/10.1073/pnas.041617498

Washburn MS, Moises HC (1992) Muscarinic responses of rat basolateral amygdaloid neurons recorded in vitro. J Physiol 449:121–154. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1992.sp019078

Wei X, Ma T, Cheng Y, et al (2018) Dopamine D1 or D2 receptor-expressing neurons in the central nervous system. Addict Biol 23:569–584. https://doi.org/10.1111/adb.12512

Weiser MJ, Foradori CD, Handa RJ (2010) Estrogen receptor beta activation prevents glucocorticoid receptor-dependent effects of the central nucleus of the amygdala on behavior and neuroendocrine function. Brain Res 1336:78–88. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.03.098

Woodruff AR, Sah P (2007) Networks of parvalbumin-positive interneurons in the basolateral amygdala. J Neurosci Off J Soc Neurosci 27:553–563. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3686-06.2007

Wright A (2020) Limbic System: Amygdala (Section 4, Chapter 6) Neuroscience Online: An Electronic Textbook for the Neurosciences | Department of Neurobiology and Anatomy - The University of Texas Medical School at Houston. https://nba.uth.tmc.edu/neuroscience/m/s4/chapter06.html. Accessed 23 Mar 2023

Wu X, Glinn MA, Ostrowski NL, et al (1999) Raloxifene and estradiol benzoate both fully restore hippocampal choline acetyltransferase activity in ovariectomized rats. Brain Res 847:98–104. https://doi.org/10.1016/s0006-8993(99)02062-4

Zaldivar A, Krichmar JL (2013) Interactions between the neuromodulatory systems and the amygdala: exploratory survey using the Allen Mouse Brain Atlas. Brain Struct Funct 218:1513–1530. https://doi.org/10.1007/s00429-012-0473-7

Zarrindast M-R, Azami B-N, Rostami P, Rezayof A (2006) Repeated administration of dopaminergic agents in the nucleus accumbens and morphine-induced place preference. Behav Brain Res 169:248–255. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.01.011

Zeidan MA, Igoe SA, Linnman C, et al (2011) Estradiol modulates medial prefrontal cortex and amygdala activity during fear extinction in women and female rats. Biol Psychiatry 70:920–927. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.05.016

Zhu PJ, Stewart RR, McIntosh JM, Weight FF (2005) Activation of Nicotinic Acetylcholine Receptors Increases the Frequency of Spontaneous GABAergic IPSCs in Rat Basolateral Amygdala Neurons. J Neurophysiol 94:3081–3091. https://doi.org/10.1152/jn.00974.2004

7. Spis rycin

RYCINA 1. *(Zmodyfikowano)* Całkowita liczba neuronów (NeuN; A) oraz neurony wykazujące immunoreaktywność wobec kalbindyny (CB; B), parwalbuminy (PV; C), kalretyniny (CR; D) i somatostatyny (SOM, E) w ciele migdałowatym myszy z deficytem ERβ ($ER\beta^{-/-}$) i myszy typu dzikiego ($ER\beta^{+/+}$). **($p \leq 0, 01$) i *** ($p \leq 0, 001$) wskazują na statystycznie istotne różnice między myszami $ER\beta^{+/+}$ a $ER\beta^{-/-}$. LA — jądro boczne, BL — jądro podstawno-boczne, BM — jądro podstawno-przyśrodkowe, ME — jądro przyśrodkowe, CE — jądro środkowe, CO — jądro korowe, I — jądro wtrącone, CPU — prążkowie. 36

RYCINA 2. *(Zmodyfikowano)* Gęstość numeryczna struktur wykazujących obecność receptora GABA typu A podjednostki α1 ($GABA_{A\alpha1}$; A) oraz intensywność tego sygnału (C), a także gęstość numeryczna struktur wykazujących obecność pęcherzykowego transportera GABA (VGAT; B) i intensywność tego sygnału (D) w ciele migdałowatym myszy z deficytem ERβ ($ER\beta^{-/-}$) i myszy typu dzikiego ($ER\beta^{+/+}$). LA — jądro boczne, BL — jądro podstawno-boczne, BM — jądro podstawno-przyśrodkowe, ME — jądro przyśrodkowe, CE — jądro środkowe, CO — jądro korowe. 37

RYCINA 3. (Zmodyfikowano) Gęstość numeryczna struktur immunoreaktywnych wobec hydroksylazy tyrozynowej (TH; A), transportera dopaminy (DAT; B), receptora dopaminy typu 1 (DA_1; C) oraz typu 2 (DA_2; D), a także liczba immunoreaktywnych komórek nerwowych zawierających DA_1 (E) i DA_2 (F) w ciele migdałowatym myszy z deficytem ERβ ($ER\beta^{-/-}$) i myszy typu dzikiego ($ER\beta^{+/+}$). ** ($p \leq 0, 01$) i *** ($p \leq 0, 001$) wskazują na statystycznie istotne różnice między myszami $ER\beta^{-/-}$a $ER\beta^{+/+}$. LA — jądro boczne, BL —jądro podstawno-boczne, BM — jądro podstawno-przyśrodkowe, ME — jądro przyśrodkowe, CE — jądro środkowe, CO — jądro korowe. 41

RYCINA 4. (Zmodyfikowano) Gęstość numeryczna struktur immunoreaktywnych wobec acetylocholinoesterazy (AChE; A), pęcherzykowego transportera acetylocholiny (VAChT; B), receptora muskarynowego acetylocholiny typu 1($AChR_{M1}$; C) oraz receptora nikotynowego acetylocholiny alfa-7 ($AChR_{\alpha7}$; D), a także liczba komórek nerwowych wykazujących obecność $AChR_{M1}$ (E) i $AChR_{\alpha7}$ (F) w ciele migdałowatym myszy z deficytem ERβ ($ER\beta^{-/-}$) i myszy typu dzikiego ($ER\beta^{+/+}$). ** ($p \leq 0, 01$) i *** ($p \leq 0, 001$) wskazują na statystycznie istotne różnice między myszami $ER\beta^{-/-}$ a $ER\beta^{+/+}$. LA — jądro boczne, BL — jądro podstawno-boczne, BM — jądro podstawno-przyśrodkowe, ME — jądro przyśrodkowe, CE — jądro środkowe, CO — jądro korowe. 44

RYCINA 5. (Zmodyfikowano) Sieci interakcji białko-białko (PPI) badanych markerów dopaminergicznych (TH, DAT, DA_1 i DA_2), cholinergicznych (AChE, VAChT, $AChR_{M1}$ i $AChR_{\alpha7}$) oraz estrogenowych (ESR2 jako ERβ) według bazy danych STRING dla myszy domowej (łac. Mus musculus). (A) Sieć PPI zawiera 9 węzłów (badanych markerów) i 20 krawędzi (powiązania białko-białko). Przerywane linie reprezentują krawędzie pomiędzy 3 klastrami (dopaminergicznymi, cholinergicznymi i estrogenowymi). Grubość tych linii jest proporcjonalna do pewności krawędzi. (B) Wykres kołowy prezentuje procesy biologiczne związane z zachowaniami emocjonalnym. Każdy kolor reprezentuje określony proces biologiczny..... 45

8. Załączniki

8.1. Publikacja 1 wraz z oświadczeniami współautorów

8.2. Publikacja 2 wraz z oświadczeniami współautorów