



Instytut Farmakologii
im. Jerzego Maja
Polskiej Akademii Nauk

Mgr Michał Wilczkowski

**Regulacja plastyczności synaptycznej przez kortykosteron:
badanie mechanizmów w kortykalnych i hipokampalnych
hodowlach pierwotnych**

Praca doktorska wykonana w Zakładzie Biochemii Mózgu
Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk

Promotor:

Prof. dr hab. Irena Nalepa

Promotor pomocniczy:

Dr Agnieszka Zelek-Molik

Kraków, 2025

Badania przedstawione w niniejszej pracy przeprowadzono w ramach projektu badawczego finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki pt.: „Badanie roli kinazy płytek przylegania i powiązanych z nią szlaków molekularnych w plastyczności neuronalnej indukowanej glikokortykoidami i przewlekłym stresem” (PRELUDIUM 20 nr 2021/41/N/NZ4/01845, kierownik: mgr Michał Wilczkowski)



NARODOWE CENTRUM NAUKI

Chciałbym serdecznie podziękować

Prof. dr hab. Irenie Nalepie

Za opiekę naukową. Ponadto, za obdarzenie zaufaniem, przyjęcie w szeregi Zakładu Biochemii Mózgu, umożliwienie samodzielnej realizacji badań i wiarę, że badania zostaną ukończone.

Dr Agnieszce Zelek Molik

Za wsparcie, pomoc eksperymentalną, a także pomoc naukową, która przyczyniła się do otrzymania projektu Preludium.

Dr hab. Grzegorzowi Kreinerowi

Za zaufanie i niezbędną pomoc w zapewnieniu ciągłości realizacji projektu i badań w Zakładzie Biochemii Mózgu.

Dr Piotrowi Chmielarzowi

Za liczne rozmowy o nauce, które w wielu przypadkach owocowały przemyśleniami jak właściwie projektować i przeprowadzać badania.

Kolegom i Koleżankom z Zakładu Biochemii Mózgu

Za świetną atmosferę w pracy i pomoc techniczną.

Mojej Karolinie i mojemu synowi - Krzysiowi

Karolinie za wsparcie i wyrozumiałość oraz za świetne opanowanie w wielu sytuacjach, w których nie mogłem pomóc.

Krzysiowi za to, że jest. A to, że jest to największa motywacja.

Moim Rodzicom, Rodzinie i Przyjaciółom

To, że jestem jest ich zasługą, to gdzie jestem, jest też ich zasługą.

Spis treści

Wykaz skrótów	8
Streszczenie	11
Summary	13
1. Wstęp	15
1.1 Kolce dendrytyczne.....	15
1.1.1 Plastyczność synaptyczna a kolce dendrytyczne – operacjonalizacja.....	15
1.1.2 Podstawowe aspekty struktury kolców dendrytycznych.....	16
1.1.3 Podstawowe aspekty molekularnej struktury kolców dendrytycznych.....	18
1.1.4 Funkcje kolców dendrytycznych.....	19
1.1.5 Obecnie znane mechanizmy molekularne, leżące u podłoża zmian morfologicznych kolców dendrytycznych.....	20
1.1.6 Wpływ wybranych czynników na strukturę kolców dendrytycznych.....	21
1.1.7 Pierwotne komórki korowe oraz hipokampalne jako model badania zmian morfologicznych kolców dendrytycznych.....	22
1.2 Kortykosteron (CORT).....	23
1.2.1 CORT – ogólna charakterystyka.....	23
1.2.2 Receptory za pośrednictwem których działa CORT.....	25
1.2.3 Charakterystyka działania CORT.....	26
1.2.4 Funkcje CORT.....	26
1.2.5 Wpływ zaburzonej transmisji zależnej od CORT na neurony mózgowia i kolce dendrytyczne.....	27
1.2.6 Molekularny mechanizm wpływu CORT na morfologię kolców dendrytycznych.....	29
1.3 Kinaza płytek przylegania (FAK).....	30
1.3.1 FAK – ogólna charakterystyka.....	30
1.3.2 FAK w neuronach.....	31
1.3.3 FAK a kolce dendrytyczne.....	33
1.4 Przesłanki do hipotez badawczych o wpływie kortykosteronu na morfologię kolców dendrytycznych oraz udziale kinazy płytek przylegania w mechanizmie regulowania morfologii kolców dendrytycznych przez kortykosteron – synteza.....	34
2. Cele pracy i hipotezy badawcze	36
3. Materiały i metody	38
3.1 Składy roztworów stosowanych w eksperymentach.....	38
3.2 Hodowle komórek pierwotnych.....	38
3.2.1 Przygotowanie szkiełek nakrywkowych oraz płytek wielodołkowych.....	38
3.2.2 Zakładanie hodowli mysich, pierwotnych komórek korykalnych i hipokampalnych.....	39
3.2.3 Medium wykorzystywane w utrzymaniu hodowli pierwotnych komórek korykalnych i hipokampalnych oraz w procedurze eksperymentalnej.....	40
3.2.4 Utrwalenie pierwotnych komórek korykalnych i hipokampalnych.....	41
3.2.5 Substancje wykorzystywane w eksperymentach.....	41
3.3 Analiza morfologiczna neuronów korykalnych oraz hipokampalnych.....	42

3.3.1	Transfekcja pierwotnych neuronów korykalnych i hipokampalnych	42
3.3.2	Obrazowanie pierwotnych neuronów korykalnych i hipokampalnych	43
3.3.3	Analiza struktury pierwotnych neuronów korykalnych i hipokampalnych.....	43
3.3.4	Znakowanie pierwotnych komórek korykalnych i hipokampalnych lipofilną indokarbocyaniną (DiI).....	44
3.3.5	Obrazowanie kolców dendrytycznych pierwotnych neuronów korykalnych i hipokampalnych	45
3.3.6	Analiza struktury kolców dendrytycznych pierwotnych neuronów korykalnych i hipokampalnych	45
3.4	Barwienia immunofluorescencyjne pierwotnych komórek korykalnych oraz hipokampalnych	46
3.4.1	Procedura barwienia immunofluorescencyjnego komórek korykalnych oraz hipokampalnych	46
3.4.2	Zbieranie obrazów mikroskopowych barwień immunofluorescencyjnych – PSD95	47
3.4.3	Zbieranie obrazów mikroskopowych barwień immunofluorescencyjnych – pozostałe białka.....	47
3.4.4	Analiza gęstości oraz intensywności klastrów PSD95.....	48
3.5	Metodyka pracy z RNA.....	48
3.5.1	Izolacja i oznaczanie stężenia RNA	48
3.5.2	Reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją (RT-PCR) – synteza cDNA	49
3.5.3	Ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (qRT-PCR).....	49
3.6	Procedury stosowane przy oznaczaniu poziomu białek	51
3.6.1	Izolacja białka z hodowli pierwotnych komórek korykalnych i hipokampalnych	51
3.6.2	Oznaczenie stężenia białka.....	51
3.6.3	Oznaczenie poziomu wybranych białek przy wykorzystaniu metody kapilarnej immunodetekcji i sprzętu SimpleJess	52
3.7	Enzymatyczne testy kolorymetryczne	54
3.7.1	Pomiar poziomu CORT w medium hodowlanym.....	54
3.7.2	Pomiar poziomu dehydrogenazy mleczanowej (LDH) w medium hodowlanym.....	54
3.8	Analiza danych.....	55
3.8.1	Wizualizacja i statystyczna analiza danych	55
4.	Wyniki	57
4.1	Charakterystyka hodowli mysich, pierwotnych komórek korykalnych oraz hipokampalnych, pochodzących z embrionów	57
4.2	Analiza stężenia CORT w medium hodowlanym oraz odpowiedź pierwotnych hodowli korykalnych i hipokampalnych na ekspozycję CORT, w aspekcie przeżywalności oraz sygnalizacji glikokortykoidowej	60
4.3	Ocena wpływu inkubacji pierwotnych hodowli korykalnych i hipokampalnych z różnymi stężeniami CORT na ogólną morfologię neuronów	63
4.3.1	Analiza korykalnych neuronów pierwotnych – ogólna morfologia neuronów	63
4.3.2	Analiza hipokampalnych neuronów pierwotnych – ogólna morfologia neuronów	64
4.4	Indukowanie zmian morfologicznych kolców dendrytycznych, korykalnych i hipokampalnych neuronów pierwotnych, poprzez inkubację z różnymi stężeniami CORT oraz charakterystyka wywołanych zmian.....	67
4.4.1	Analiza korykalnych neuronów pierwotnych – gęstość i morfologia kolców dendrytycznych	67
4.4.2	Analiza hipokampalnych neuronów pierwotnych – gęstość i morfologia kolców dendrytycznych	69

4.5	Wpływ CORT na poziom białka PSD95 w dendrytach i kolcach dendrytycznych korykalnych i hipokampalnych neuronów pierwotnych.....	71
4.5.1	Analiza korykalnych neuronów pierwotnych – analiza białka PSD95 w dendrytach i kolcach dendrytycznych	71
4.5.2	Analiza hipokampalnych neuronów pierwotnych – analiza białka PSD95 w dendrytach i kolcach dendrytycznych	72
4.6	Ocena wpływu manipulacji aktywnością białka FAK na zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych korykalnych i hipokampalnych neuronów pierwotnych, wywołane przez CORT	74
4.6.1	Analiza korykalnych neuronów pierwotnych – wpływ manipulacji aktywnością FAK na zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych, wywołane CORT	74
4.6.2	Analiza hipokampalnych neuronów pierwotnych - wpływ manipulacji aktywnością FAK na zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych, wywołane CORT	79
4.7	Ocena wpływu CORT i różnych czasów inkubacji korykalnych i hipokampalnych hodowli pierwotnych z CORT na zmiany w poziomie mRNA genu <i>PTK2</i> oraz w poziomie białka FAK	83
4.7.1	Analiza korykalnych hodowli pierwotnych – poziom mRNA genu <i>PTK2</i> oraz poziom całkowitego i fosforylowanego FAK.....	83
4.7.2	Analiza hipokampalnych hodowli pierwotnych - poziom mRNA genu <i>PTK2</i> oraz poziom całkowitego i fosforylowanego FAK.....	87
4.8	Analiza wpływu CORT i różnych czasów inkubacji korykalnych i hipokampalnych hodowli pierwotnych z CORT na poziom mRNA genów kodujących białka związane z plastycznością synaptyczną i/lub wchodzące w interakcję z białkiem FAK.....	90
4.8.1	Analiza korykalnych hodowli pierwotnych – poziom mRNA genów kodujących białka związane z plastycznością synaptyczną i/lub wchodzące w interakcję z białkiem FAK	90
4.8.2	Analiza hipokampalnych hodowli pierwotnych - poziom mRNA genów kodujących białka związane z plastycznością synaptyczną i/lub wchodzące w interakcję z białkiem FAK	93
5.	Dyskusja	95
5.1	Hodowle pierwotne jako model badawczy zmian morfologicznych kolców dendrytycznych wywołanych CORT	96
5.2	Ocena zastosowanej metody ekspozycji hodowli pierwotnych na CORT oraz wpływ zróżnicowanych stężeń CORT na podstawowe parametry funkcjonowania komórek pierwotnych	97
5.2.1	Zastosowany schemat wymiany medium hodowlanego	98
5.2.2	Dobór stężeń CORT oraz czasu inkubacji hodowli pierwotnych z CORT	99
5.2.3	Ekspresja genów <i>FKBP5</i> oraz <i>NR3C1</i> – wybrane elementy sygnalizacji wzbudzonej przez glikokortykoidy	99
5.2.4	Zastosowany układ eksperymentalny a cytotoksyczność	101
5.3	Ocena wpływu zróżnicowanych stężeń CORT na morfologię korykalnych oraz hipokampalnych neuronów pierwotnych.....	102
5.4	Ocena wpływu zróżnicowanych stężeń CORT na morfologię kolców dendrytycznych oraz stabilność synaps korykalnych i hipokampalnych neuronów pierwotnych.....	104
5.4.1	Wpływ CORT na kolce dendrytyczne korykalnych neuronów pierwotnych.....	105
5.4.2	Wpływ CORT na stabilność synaps korykalnych neuronów pierwotnych	108
5.4.3	Wpływ CORT na kolce dendrytyczne hipokampalnych neuronów pierwotnych	109
5.4.4	Wpływ CORT na stabilność synaps hipokampalnych neuronów pierwotnych.....	110

5.5	Badanie mechanizmu, pośredniczącego w indukowanych przez CORT zmianach morfologii kolców dendrytycznych – udział kinazy płytek przylegania (FAK).....	111
5.5.1	Manipulacja aktywnością FAK a zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych wywołane CORT w korykalnych hodowlach pierwotnych	111
5.5.2	Wpływ zróżnicowanych czasów inkubacji pierwotnych komórek korykalnych z CORT, na ekspresję genu <i>PTK2</i> oraz poziom białka FAK.....	115
5.5.3	Manipulacja aktywnością FAK a zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych wywołane CORT w hipokampalnych hodowlach pierwotnych.....	118
5.5.4	Wpływ zróżnicowanych czasów inkubacji pierwotnych komórek hipokampalnych z CORT, na ekspresję genu <i>PTK2</i> oraz poziom białka FAK.....	120
5.6	Badanie wpływu CORT i zróżnicowanych czasów inkubacji korykalnych i hipokampalnych hodowli pierwotnych z CORT, na poziom mRNA genów kodujących białka związane z plastycznością synaptyczną i/lub wchodzące w interakcję z białkiem FAK.....	121
5.6.1	Wpływ CORT na poziom mRNA genów kodujących białka związane z plastycznością synaptyczną i/lub wchodzące w interakcję z białkiem FAK w korykalnych neuronach pierwotnych.....	121
5.6.2	Wpływ CORT na poziom mRNA genów kodujących białka związane z plastycznością synaptyczną i/lub wchodzące w interakcję z białkiem FAK w hipokampalnych neuronach pierwotnych.....	123
5.7	Podsumowanie i wnioski.....	124
5.7.1	Wnioski.....	125
	Piśmiennictwo.....	127
	Spis rycin.....	156
	Spis tabel.....	156

Wykaz skrótów

- ACTH** hormon adrenokortykotropowy (*ang. adrenocorticotropic hormone*)
- AKT** kinaza białkowa B (*ang. protein kinase B*)
- AVP** argininowazopresyna (*ang. arginine vasopressin*)
- BCA** kwas bicinchoninowy (*ang. bicinchoninic acid*)
- BDNF** neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego (*ang. brain-derived neurotrophic factor*)
- BSA** albumina surowicy bydłowej (*ang. bovine serum albumin*)
- Ca²⁺** jon wapniowy (*ang. calcium ion*)
- CaMKII** kinaza II zależna od Ca²⁺/kalmoduliny (*ang. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II*)
- Cdc42** mała GTPaza Cdc42 (*ang. cell division cycle 42*)
- CORT** kortykosteron (*ang. corticosterone*)
- CRF** czynnik uwalniający kortykotropinę (*ang. corticotropin-releasing factor*)
- DEX** deksametazon (*ang. dexamethasone*)
- DiI** barwnik lipofilowy DiI (*ang. 1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine*)
- DMSO** dimetylosulfotlenek (*ang. dimethyl sulfoxide*)
- DNA** kwas deoksyrybonukleinowy (*ang. deoxyribonucleic acid*)
- EphB2** receptor efrinowy typu B2 (*ang. ephrin type-B receptor 2*)
- ERK2** kinaza regulowana sygnałami zewnątrzkomórkowymi 2 (*ang. extracellular signal-regulated kinase 2*)
- FAK** kinaza adhezji ogniskowej (*ang. focal adhesion kinase*)
- FAT** domena kierowania do ognisk adhezji (*ang. focal-adhesion targeting domain*)
- FERM** domena FERM (*ang. band 4.1/ezrin/radixin/moesin homology*)
- FKBP5** izomeraza peptydyloprolilowa cis-trans FKBP5 (*ang. peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP5*)
- FKBP51** białko wiążące FK506 51 (*ang. FK506-binding protein 51*)
- FKBP52** białko wiążące FK506 52 (*ang. FK506-binding protein 52*)
- FRNK** białko pokrewne FAK bez aktywności kinazowej (*ang. FAK-related non-kinase*)
- FYN** protoonkogenowa kinaza tyrozynowa Fyn (*ang. proto-oncogene tyrosine-protein kinase Fyn*)
- GDP** guanozyno-5'-difosforan (*ang. guanosine-5'-diphosphate*)
- GEF** czynnik wymiany nukleotydów guaninowych (*ang. guanine nucleotide exchange factor*)
- GEF-H1** czynnik wymiany nukleotydów guaninowych H1 (*ang. guanine nucleotide exchange factor H1*)
- GFP** zielone białko fluorescencyjne (*ang. green fluorescent protein*)
- GRAF** regulator GTPazy związany z FAK (*ang. GTPase regulator associated with focal adhesion kinase*)
- GR** receptor glikokortykoidowy (*ang. glucocorticoid receptor*)
- Grb2** białko 2 związane z receptorem czynnika wzrostu (*ang. growth factor receptor-bound protein 2*)
- GRs** elementy odpowiedzi glikokortykoidowej (*ang. glucocorticoid response elements*)
- GTP** guanozyno-5'-trifosforan (*ang. guanosine-5'-triphosphate*)
- GTPazy** białka wiążące GTP (*ang. GTPases*)

HeLa komórki HeLa (*ang. HeLa cells*)

HPA oś podwzgórze–przysadka–nadnercza (*ang. hypothalamic–pituitary–adrenal axis*)

LDH dehydrogenaza mleczanowa (*ang. lactate dehydrogenase*)

LIM kinaza domeny LIM (*ang. LIM domain kinase*)

LIMK kinaza domeny LIM (*ang. LIM domain kinase*)

LTP długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (*ang. long-term potentiation*)

MAP2 białko towarzyszące mikrotubulom 2 (*ang. microtubule-associated protein 2*)

microRNA mikroRNA (*ang. microRNA*)

MR receptor mineralokortykoidowy (*ang. mineralocorticoid receptor*)

mTOR mechanistyczny cel rapamycyny (*ang. mechanistic target of rapamycin*)

mTORC1 kompleks mTOR 1 (*ang. mTOR complex 1*)

NeuN antygen jądrowy neuronów (*ang. hexaribonucleotide-binding protein-3*)

NMDA kwas N-metylo-D-asparaginowy (*ang. N-methyl-D-aspartic acid*)

NR3C1 receptor jądrowy podrodziny 3, grupy C, członek 1 (*ang. nuclear receptor subfamily 3 group C member 1*)

NRSF czynnik wyciszający specyficzny dla neuronów (*ang. neuron-restrictive silencer factor*)

PAK kinaza aktywowana przez p21 (*ang. p21-activated kinase*)

PFA paraformaldehyd (*ang. paraformaldehyde*)

PI3K fosfatydyloinozydowa 3-kinaza (*ang. phosphoinositide 3-kinase*)

PIP2 fosfatydyloinozytylo-4,5-bisfosforan (*ang. phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*)

PIP3 fosfatydyloinozytylo-3,4,5-trisfosforan (*ang. phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate*)

PROX1 prosperohomeobiałko 1 (*ang. prospero homeobox 1*)

PSD95 białko 95 postsynaptycznej gęstości (*ang. postsynaptic density protein 95*)

PTEN fosfataza i homolog tensyny (*ang. phosphatase and tensin homolog [deleted on chromosome 10]*)

PYK2 bogata w prolinę kinaza tyrozynowa 2 (*ang. proline-rich tyrosine kinase 2*)

RAC1 mała GTP-aza Rac1 (*ang. Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*)

REDD1 białko regulowane w rozwoju i odpowiedziach na uszkodzenia DNA 1 (*ang. regulated in development and DNA damage responses 1*)

REML resztowa estymacja największej wiarygodności (*ang. restricted maximum likelihood*)

RhoA mała GTP-aza RhoA (*ang. Ras homolog family member A*)

RM ANOVA analiza wariancji z powtarzanimi pomiarami (*ang. repeated-measures analysis of variance*)

ROCK kinaza białkowa związana z Rho zawierająca domenę coiled-coil (*ang. Rho-associated coiled-coil containing protein kinase*)

S100B białko wiążące wapń S100B (*ang. S100 calcium-binding protein B*)

SATB2 białko wiążące sekwencje bogate w AT 2 (*ang. special AT-rich sequence-binding protein 2*)

siRNA małe interferujące RNA (*ang. small interfering RNA*)

sLTP strukturalne długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (*ang. structural long-term potentiation*)

SRC protoonkogenowa kinaza tyrozynowa Src (*ang. proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src*)

Tiam1 białko indukujące inwazję i przerzuty chłoniaka T 1 (*ang. T-lymphoma invasion and metastasis-inducing protein 1*)

TrkB receptor kinazowy tropomiozyny B (*ang. tropomyosin receptor kinase B*)

uEPSC prąd pobudzający postsynaptyczny wywołany odklatkowaniem (*ang. uncaging excitatory postsynaptic current*)

uEPSP potencjał pobudzający postsynaptyczny wywołany odklatkowaniem (*ang. uncaging excitatory postsynaptic potential*)

Y15 inhibitor kinazy FAK (*ang. FAK inhibitor 14*)

ZN27 aktywator kinazy FAK (*ang. FAK activator; ZINC40099027*)

β-PIX beta czynnik wymiany nukleotydów guaninowych oddziałujący z PAK (*ang. PAK-interacting exchange factor beta; ARHGEF7*)

Streszczenie

Plastyczność synaptyczna, jedna z form neuroplastyczności, leży u podłoża prawidłowego funkcjonowania mózgowia. W związku z tym, że dominujące w mózgowiu synapsy chemiczne zlokalizowane są na kolcach dendrytycznych, plastyczność synaptyczną można badać analizując morfologię i/lub gęstość kolców dendrytycznych. Nawet niewielkie odstępstwo od typowej morfologii kolców dendrytycznych, może prowadzić do zaburzeń działania na poziomie pojedynczej komórki oraz całej sieci neuronalnej. Dlatego, zrozumienie jak różne czynniki biologiczne wpływają na morfologię kolców dendrytycznych, tym samym plastyczność synaptyczną, jest kluczowe.

Jednym z czynników, które wpływają na morfologię kolców dendrytycznych, jest długotrwałe podwyższony poziom kortykosteronu (CORT). Chronicznie podwyższony poziom CORT, skutkuje redukcją liczby kolców neuronów korykalnych i hipokampalnych oraz modyfikacją ich struktury. Jednakże, wciąż nie wiadomo, czy CORT jest bezpośrednim czynnikiem wywołującym zmiany morfologiczne kolców, a jeżeli tak, to w jakim stopniu i jakie konkretnie parametry struktury kolców ulegają zmianie w neuronach korykalnych oraz hipokampalnych, za sprawą długotrwałego działania podniesionego poziomu CORT. Co więcej, ścieżki sygnałowe za pośrednictwem których CORT wpływa na strukturę kolców dendrytycznych, również nie zostały w pełni poznane. Jedno z białek, którego aktywność jest związana z reorganizacją struktury kolców i jednocześnie może być pośrednio modulowana przez CORT jest kinaza płytek przylegania (FAK). Pomimo przesłanek wskazujących na potencjalne zaangażowanie FAK w zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych neuronów korykalnych i hipokampalnych, wywołane długotrwałe podniesionym poziomem CORT, nadal brakuje jednoznacznych danych potwierdzających słuszność tej hipotezy.

Biorąc pod uwagę powyższe, pierwszym celem badań przedstawionych w niniejszej rozprawie doktorskiej, było zweryfikowanie hipotezy, że efektem zastosowania długotrwałe podniesionego poziomu CORT, będzie wywołanie zmian morfologicznych kolców dendrytycznych neuronów korykalnych oraz hipokampalnych, a następnie scharakteryzowanie obserwowanych zmian. Drugim celem była weryfikacja hipotezy zakładającej zaangażowanie FAK w zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych neuronów korykalnych i hipokampalnych, wywołane przez długotrwałe podniesiony poziom CORT.

Aby zrealizować wyżej opisane cele, wykorzystano mysie, pierwotne hodowle korykalne oraz hipokampalne, które inkubowano długotrwałe w środowisku podwyższonego stężenia CORT, a następnie morfologię ich kolców dendrytycznych, wizualizowano i obrazowano przy użyciu mikroskopu konfokalnego oraz analizowano biorąc pod uwagę wybrane parametry struktury kolców. Ponadto,

wykorzystując narzędzia farmakologiczne, takie jak aktywator oraz inhibitor białka FAK oraz stosując metody biologii molekularnej, takie jak reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (RT-qPCR), analizowano rolę białka FAK w zmianach morfologicznych kolców dendrytycznych, wywołanych długotrwałe podniesionym poziomem CORT.

W pierwszym etapie badań, doświadczalnie wyznaczono stężenie CORT, które wywołuje odpowiedź w zakresie sygnalizacji glikokortykoidowej, jednocześnie nie wpływając na przeżywalność komórek pierwotnych oraz na ogólną morfologię neuronów. W kolejnym etapie, wykazano, że długotrwałe podniesiony poziom CORT, w odmienny sposób wpływa na morfologię kolców dendrytycznych pierwotnych neuronów hipokampalnych oraz korykalnych. W przypadku kolców neuronów korykalnych, wykazano tendencję wzrostową, zaś w przypadku kolców neuronów hipokampalnych, wykazano spadek, w zakresie ich przeciętnej długości. Dodatkowo, w przypadku komórek pierwotnych z obu tych regionów, wykazano spadek w zakresie szerokości głów kolców. W dalszych badaniach, wykazano, że manipulowanie aktywnością białka FAK, może odtwarzać bądź przeciwdziałać efektom CORT. W przypadku pierwotnych neuronów korykalnych, zaobserwowano, że zastosowanie inhibitora fosforylacji FAK, prowadzi do zmian w zakresie morfologii kolców, które są analogiczne do efektów długotrwałego działania CORT. Podobnych rezultatów nie zaobserwowano w przypadku pierwotnych komórek hipokampalnych. Z drugiej strony, poprzez zastosowanie aktywatora FAK, udało się przeciwdziałać zmianom w zakresie długości kolców i szerokości ich głów, w pierwotnych hodowlach korykalnych, ale nie hipokampalnych, gdzie aktywacja FAK przeciwdziała jedynie wywołanemu przez CORT, spadkowi przeciętnej szerokości głowy kolców, a pozostawała bez wpływu na zależny od CORT, spadek w zakresie przeciętnej długości kolców. W dalszych badaniach, wykazano zależne od czasu trwania inkubacji komórek z CORT, zmiany w poziomie mRNA genu kodującego FAK, w komórkach korykalnych. Podobnych zmian nie wykazano w przypadku komórek hipokampalnych. W ostatnim etapie, wykazano brak wpływu długotrwałe podniesionego poziomu CORT na poziom całkowitego i fosforylowanego białka FAK, zarówno w komórkach korykalnych jak i hipokampalnych.

Podsumowując, wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej, dostarczają nowych informacji o specyficie wpływu długotrwałe podniesionego poziomu CORT na morfologię kolców dendrytycznych korykalnych oraz hipokampalnych neuronów pierwotnych. Ponadto, wykazano potencjalne zaangażowanie białka FAK w zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych neuronów korykalnych oraz hipokampalnych w warunkach pozbawionych CORT, a także tych wywołanych CORT.

Summary

Synaptic plasticity, a form of neuroplasticity, underlies the proper functioning of the brain. Because the brain's predominant chemical synapses reside on dendritic spines, synaptic plasticity can be studied by analyzing spine morphology and/or density. Even slight deviations from typical dendritic spine morphology can lead to dysfunction at the level of single cells and entire neuronal networks. Therefore, understanding how various biological factors influence dendritic spine morphology, and thus synaptic plasticity, is crucial.

One factor that affects dendritic spine morphology is chronically elevated corticosterone (CORT). Chronically elevated CORT results in a reduction in the number of spines on cortical and hippocampal neurons and in modifications of their structure. However, it remains unknown whether CORT is a direct driver of spine morphological changes and, if so, to what extent and which specific structural parameters are altered in cortical and hippocampal neurons by prolonged elevated CORT. Moreover, the signaling pathways through which CORT affects dendritic spine structure have not been fully elucidated. One protein whose activity is linked to spine reorganization and may be indirectly modulated by CORT is focal adhesion kinase (FAK). Despite indications suggesting potential involvement of FAK in CORT-induced morphological changes of dendritic spines in cortical and hippocampal neurons, definitive data confirming this hypothesis are still lacking.

In light of the above, the primary aim of this doctoral thesis was to test the hypothesis that prolonged elevation of CORT induces morphological changes in dendritic spines of cortical and hippocampal neurons, and then to characterize the observed changes. The second goal was to test the hypothesis that FAK is involved in CORT-induced morphological changes of dendritic spines in cortical and hippocampal neurons.

To achieve these aims, mouse primary cortical and hippocampal cultures were incubated with chronically elevated CORT; their dendritic spines were then visualized and imaged using confocal microscopy and analyzed with respect to selected structural parameters. Additionally, using pharmacological tools such as a FAK activator and inhibitor, as well as molecular biology methods such as the real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR), we examined the role of FAK in CORT-induced changes in dendritic spine morphology.

In the first stage, we experimentally identified a CORT concentration that triggers a glucocorticoid-signaling response without affecting the viability of primary cells or the overall neuronal morphology.

In the next stage, we demonstrated that chronic elevation of CORT differentially influences dendritic spine morphology in primary hippocampal versus cortical neurons. For cortical neuron spines, we observed an increasing trend, while hippocampal neuron spines showed a decrease in their mean length. Additionally, in primary cells from both regions, we noted a reduction in spine head width. Furthermore, we showed that manipulating FAK activity can mimic or counteract the effects of CORT. In primary cortical neurons, applying an inhibitor of FAK phosphorylation caused changes in spine morphology similar to those seen with prolonged CORT exposure. These results were not observed in primary hippocampal cells. Conversely, activating FAK counteracted changes in spine length and head width in cortical cultures but not in hippocampal cultures, where FAK activation only reversed the CORT-induced decrease in average head width and had no effect on the decline in average spine length. We also observed time-dependent changes in the mRNA levels of the gene encoding FAK in cortical cells, but no such changes occurred in hippocampal cells. Finally, we found no effect of chronic CORT elevation on total and phosphorylated FAK protein levels in either cortical or hippocampal cells.

In summary, this doctoral dissertation provides new insights into how chronically elevated CORT shapes the morphology of dendritic spines in cortical and hippocampal primary neurons. It also indicates a potential role for FAK in spine morphological changes observed both under CORT-deprived conditions and in response to CORT.

1. Wstęp

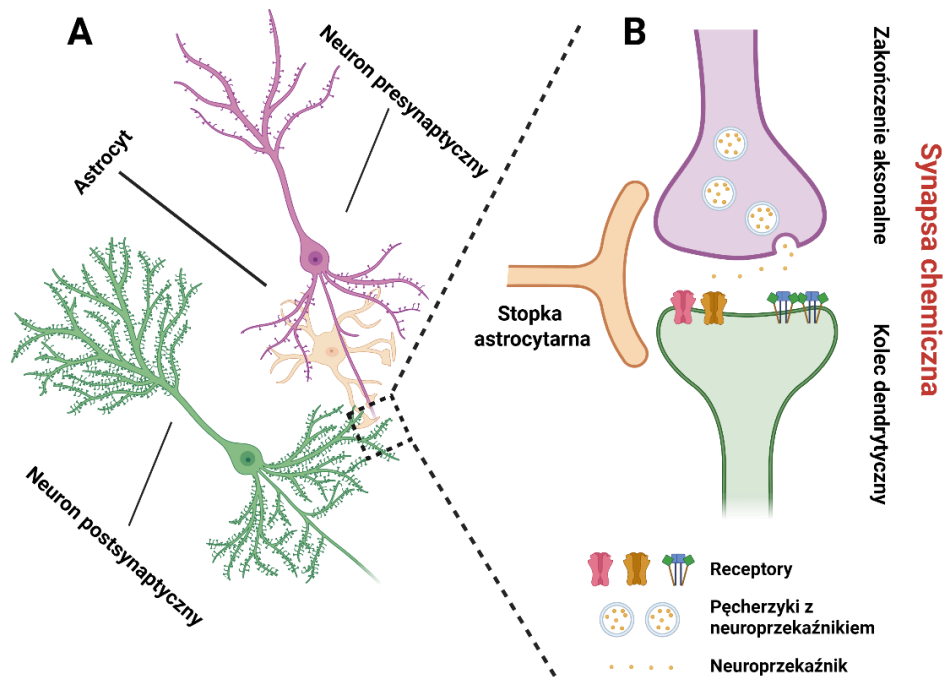
Układ nerwowy (w tym przede wszystkim mózgowie), posiada zdolność funkcjonalnej oraz strukturalnej modyfikacji, którą określa się terminem neuroplastyczność. Zjawisko neuroplastyczności jest związane z rozwojem układu nerwowego, normalnym funkcjonowaniem już rozwiniętego układu nerwowego, który dostosowuje się do zmieniającego się środowiska, a także z odpowiedzią układu nerwowego na uszkodzenie, a nawet starzenie się organizmu. Poprawne działanie procesów neuroplastyczności jest więc kluczowe z perspektywy właściwego funkcjonowania układu nerwowego, w tym, mózgowia. Zależnie od przyjętych kryteriów, wyróżnić można wiele rodzajów neuroplastyczności, wśród których, szczególne znaczenie w ostatnich latach zyskała plastyczność synaptyczna.

1.1 Kolce dendrytyczne

1.1.1 Plastyczność synaptyczna a kolce dendrytyczne – operacjonalizacja

Synapsa, miejsce komunikacji pomiędzy komórkami nerwowymi, jest krytycznym elementem sieci neuronalnej. To za pośrednictwem synapsy dochodzi do transferu sygnału z jednej komórki nerwowej do kolejnej. Co więcej, to synapsa jest elementem sieci neuronalnej, który podlega reorganizacji, dając podstawy unikalnym właściwościom mózgowia, takim jak uczenie się oraz pamięć (Citri & Malenka, 2008). Typowym przykładem synapsy posiadającej wyżej wymienione cechy, jest tzw. synapsa chemiczna, którą charakteryzuje transmisja sygnału oparta o neuroprzekaźniki (wśród których wyróżnić można neuroprzekaźniki pobudzające oraz hamujące) oraz obecność części pre oraz postsynaptycznej (Rycina 1.1). Część presynaptyczna składa się z zakończenia aksonalnego, które w przypadku pobudzającego typu synapsy chemicznej (dominującej w mózgowiu), dochodzi do części postsynaptycznej, która składa się z kolca dendrytycznego (Yuste & Bonhoeffer, 2004a; Citri & Malenka, 2008).

Kolce dendrytyczne to błonowe, wysoce ruchliwe wypustki, będące częścią dendrytów wybranych populacji komórek nerwowych. Kolce dendrytyczne nie tylko mogą dynamicznie zmieniać swój kształt, ale także znikać i pojawiać się ponownie (Holtmaat i in., 2005a). W związku z ruchliwością kolców, a także z faktem, że większość synaps pobudzających znajduje się na kolcach; reorganizacja synapsy chemicznej, a tym samym plastyczność synaptyczna, może być definiowana poprzez zmiany w strukturze bądź w ilości kolców dendrytycznych. Tak zdefiniowana plastyczność synaptyczna, może być zatem mierzona poprzez analizę morfologii kolców dendrytycznych oraz/lub analizę ich gęstości (Yuste & Bonhoeffer, 2001; Matsuzaki i in., 2004).



Rycina 1.1: Uproszczony schemat synapsy chemicznej. (A) Połączenie pomiędzy neuronami oraz towarzyszący im astrocyt. (B) Schemat synapsy chemicznej, tworzonej przez zakończenie aksonalne neuronu presynaptycznego, kolec dendrytyczny neuronu postsynaptycznego oraz stopkę astrocytarną. Rycinę wykonano wykorzystując BioRender.com

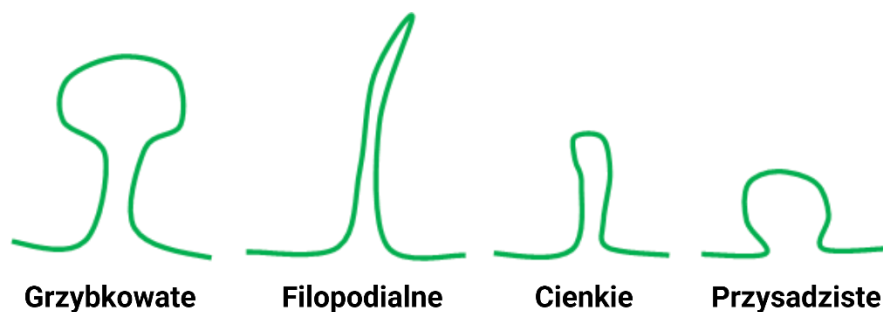
1.1.2 Podstawowe aspekty struktury kolców dendrytycznych

W związku z licznym występowaniem kolców dendrytycznych na neuronach piramidowych kory czołowej oraz hipokampa (neurony piramidowe to neurony glutaminergiczne, których ciało ma piramidowy kształt, z którego odchodzi pojedynczy, rozgałęziający się dendryt apikalny oraz wiele dendrytów podstawnych), wiele informacji na temat struktury oraz właściwości biologicznych kolców dendrytycznych, uzyskano badając właśnie te populacje neuronów (Arellano, 2007; Benavides-Piccione i in., 2025).

W toku wielu lat badań, zaobserwowano, że pomiędzy różnymi kolcami dendrytycznymi, występuje wysoka rozbieżność rozmiarów i kształtów jakie przyjmują. Jednakże, pomimo różnic, odnaleziono cechy (morfologiczne) wspólne dla większości z nich. I tak, przeciętny kolec wyróżnia występowanie części, którą można określić jako głowa kolca oraz części, która konstytuuje jego szyję, łączącą głowę kolca z dendrytem, z którego ten wyrasta. Za sprawą mikroskopii elektronowej, udało się ustalić, że średnica przeciętnej głowy kolca dendrytycznego, mieści się w zakresie od 0.5 μm do 1.5 μm , przeciętna długość kolca dendrytycznego wynosi do 3 μm , a przeciętna średnica jego szyi, przyjmuje wartości mniejsze niż 0.5 μm (Yuste, 2010).

Ze względu na wspomnianą powyżej, dużą rozbieżność kształtów i rozmiarów jakie przyjmują kolce dendrytyczne, powstały różne sposoby ich kategoryzowania. W jednej z najpopularniejszych klasyfikacji, wyróżniono 4 podstawowe typy kolców dendrytycznych: kolce grzybkowate (ang. *mushroom spines*), filopodialne (ang. *filopodia spines*), cienkie (ang. *thin spines*) oraz przysadziste (ang. *stubby spines*) (Peters & Kaiserman-Abramof, 1970) (Rycina 1.2). W toku badań, udało się skorelować wyróżnione typy kolców, z cechami funkcjonalnymi, które te przedstawiają. I tak, kolce dendrytyczne o kształcie grzybkowatym, uważane są za dojrzałe i najbardziej funkcjonalne. Tworzą one stabilne połączenia synaptyczne, utrzymujące się nawet przez kilka miesięcy i zawierają gęstość postsynaptyczną (ang. *postsynaptic density*, PSD)(Harris & Weinberg, 2012; Berry & Nedivi, 2017). Kolce filopodialne to długie i cienkie wypustki, bez wyraźnej głowy, które najrzadziej tworzą funkcjonalne synapsy (Berry & Nedivi, 2017; Sanchez-Arias i in., 2020). Z kolei kolce cienkie, mają ledwo widoczną głowę, są bardziej dynamiczne niż kolce grzybkowate i mogą przekształcić się w formę grzybkowatą po zastosowaniu stymulacji (Bourne & Harris, 2007a). Kolce cienkie wraz z kolcami filopodialnymi, są uważane za prekursorów dojrzałych form (Berry & Nedivi, 2017). Przysadziste kolce dendrytyczne mogą być specjalnym rodzajem kolców grzybkowatych o krótkiej szyi, widocznej przy wykorzystaniu mikroskopii wysokorozdzielczej (Tønnesen i in., 2014).

Pomimo długiego czasu stosowania różnych sposobów kategoryzacji kolców dendrytycznych, najnowsze badania wskazują różnorodność kształtów i rozmiarów kolców, jako część kontinuum, w ramach którego nie ma wyraźnych kategorii (Ofer i in., 2022). W związku z brakiem niearbitralnych kryteriów porządkowania kolców dendrytycznych w określone klasy, w coraz większej ilości badań stosuje się podejście oparte o pomiar i porównanie określonych, charakterystycznych cech morfologicznych kolców dendrytycznych, m.in. długości kolców dendrytycznych i/lub szerokości ich głów, z pominięciem kategoryzacji (Bączyńska i in., 2021; Bijata i in., 2022). Jednocześnie, w świetle dotychczasowych badań, nie ulega wątpliwości, że struktura kolców dendrytycznych jest skorelowana z ich funkcją (Cornejo i in., 2022). Dlatego, badanie i zrozumienie zjawiska zmian morfologicznych kolców dendrytycznych, wydaje się być nieodzowne w zrozumieniu biologii komórki nerwowej.



Rycina 1.2: Klasyczne kategorie morfologiczne kolców dendrytycznych. Kategorie te zostały zaproponowane przez Petersa oraz Kaisermana-Abramofa. Do dnia dzisiejszego, jest to najbardziej popularny sposób kategoryzowania kolców dendrytycznych.

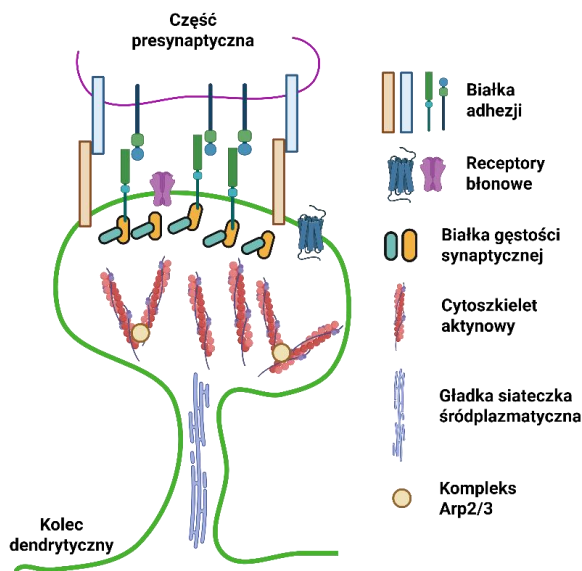
1.1.3 Podstawowe aspekty molekularnej struktury kolców dendrytycznych

Zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych są możliwe dzięki dominującym w ich budowie, włóknom aktynowym (Honkura i in., 2008; Frost i in., 2010). Kolce dendrytyczne zawierają dwa rodzaje włókien aktynowych: stabilne i dynamiczne, różniące się przede wszystkim morfologią i współczynnikiem obrotu. Dynamiczną pulę włókien aktynowych charakteryzuje wysoka plastyczność, ze względu na stale zachodzące procesy polimeryzacji na ich końcu kolczastym (ang. *barbed end*) oraz depolimeryzacji na końcu ostrym (ang. *pointed end*) (Honkura i in., 2008; Nakahata & Yasuda, 2018).

Tak więc, struktura kolców dendrytycznych jest bezpośrednio regulowana poprzez cytoszkielecik aktynowy, który z kolei, podlega reorganizacji za sprawą działania określonych białek wiążących aktynę, wpływających na wspomniane powyżej procesy polimeryzacji oraz depolimeryzacji (Bosch i in., 2014). Wśród dotychczas poznanych białek, wchodzących w bezpośrednią interakcję z włóknami aktynowymi i w efekcie modyfikującymi ich strukturę (a co za tym idzie, potencjalnie modyfikującymi strukturę kolców dendrytycznych), wyróżnić można m.in. kofilinę (ang. *Cofilin*), profilinę (ang. *Profilin*) czy α -aktyninę 2 (ang. *α -actinin-2*) (Ackermann & Matus, 2003; Bosch i in., 2014; Hodges i in., 2014).

Poza białkami związanymi z cytoszkielecikem aktynowym, kolce dendrytyczne zawierają również inne białka komórkowe (Rycina 1.3). W związku z tym, że kolce są postsynaptyczną częścią synaps, w ich wnętrzu, w pobliżu błony komórkowej, może znajdować się tzw. gęstość postsynaptyczna, będąca obszarem składającym się z m.in. receptorów dla neurotransmiterów, białek adhezji komórkowej, a także białek sygnałowych, których obecność jest kluczowa dla prawidłowej transmisji sygnału w szczelinie synaptycznej i później, wewnątrz komórki postsynaptycznej (M. Sheng & Kim, 2011; Harris & Weinberg, 2012). Co więcej, w kolcach dendrytycznych, zależnie od ich morfologii, mogą znajdować się również organelle komórkowe, takie jak aparat Golgiego oraz gładka siateczka śródplazmatyczna (ang. *smooth*

endoplasmic reticulum), umożliwiające lokalną syntezę białek, która jest wymagana w dynamicznych procesach plastyczności strukturalnej i kluczowa z perspektywy realizowanych przez kolce funkcji (Pierce i in., 2001; Govind i in., 2021).



Rycina 1.3: Uproszczony schemat, przedstawiający molekularną budowę kolca dendrytycznego. Schemat przedstawia wybrane elementy kolca dendrytycznego, takie jak m.in. włókna aktynowe będące podstawą plastyczności strukturalnej kolców dendrytycznych oraz gładką siateczkę śródplazmatyczną, która znajduje się w wysoce aktywnych kolcach dendrytycznych Rycinę utworzono wykorzystując BioRender.com

1.1.4 Funkcje kolców dendrytycznych

Biorąc pod uwagę fakt, że właściwie każdy kolce dendrytyczny jest miejscem tworzenia synapsy, funkcje jakie pełnią kolce dendrytyczne, są ściśle związane z szeroko pojętą transmisją sygnału synaptycznego.

Z perspektywy systemowej, obejmującej działanie sieci neuronalnej, najbardziej podstawową funkcją kolców dendrytycznych, wydaje się być maksymalizacja ilości możliwych połączeń synaptycznych, która jest postulowana m.in. za sprawą obserwacji specyficznego, heliakalnego rozmieszczenia kolców dendrytycznych na dendrytach części populacji komórek nerwowych (Chklovskii i in., 2002; O'Brien & Unwin, 2006; Yuste, 2011a). Tego typu rozmieszczenie kolców, umożliwia utworzenie połączeń synaptycznych z jak największą liczbą docierających zakończeń aksonalnych (Chklovskii, 2004; Yuste, 2011a). Kolejna podstawowa funkcja jaką kolce dendrytyczne realizują w aspekcie systemowym, na poziomie sieci neuronalnej, związana jest z faktem, że struktura kolców jest różnorodna. Tym samym, każde poszczególne połączenie synaptyczne utworzone na kolcu

dendrytycznym, w odmienny sposób wpływa na potencjały synaptyczne, a co za tym idzie, na neuron postsynaptyczny. To z kolei umożliwia funkcjonalne rozróżnienie wybranych połączeń synaptycznych i neuronalnych (X. Chen i in., 2011; Yuste, 2011a). Co więcej, dzięki dynamicznym zmianom morfologicznym jakim podlegają kolce dendrytyczne, może dochodzić do sytuacji, w której, pod wpływem różnych czynników, dojście presynaptyczne do określonego kolca dendrytycznego, ulega wzmocnieniu bądź osłabieniu (np. za sprawą modyfikacji morfologicznej, obejmującej długość bądź szerokość szyi kolca dendrytycznego)(Tønnesen i in., 2014).

Funkcje, jakie kolce dendrytyczne pełnią z punktu widzenia sieci neuronalnej, są najprawdopodobniej ściśle związane z rolą jaką kolce dendrytyczne odgrywają w działaniu pojedynczej komórki. I tak, wydaje się, że kluczowa funkcja jaką pełnią kolce dendrytyczne z perspektywy pojedynczego neuronu, dotyczy przestrzennego ograniczenia (kompartmentacji) sygnału biochemicznego oraz elektrycznego (Grunditz i in., 2008; Cornejo i in., 2022). W przypadku sygnału biochemicznego, kompartmentacja sygnału wapniowego, która zachodzi wewnątrz pojedynczego kolca dendrytycznego, może zapewniać plastyczność specyficzną dla danego, ściśle określonego połączenia synaptycznego, tym samym, może realizować funkcję opisaną powyżej, dotyczącą sieci neuronalnej, związaną z regulacją siły określonego połączenia pomiędzy neuronami (Grunditz i in., 2008; Tønnesen i in., 2014). Niepożądane modyfikacje struktury kolców, wywołane różnymi czynnikami i prowadzące do nieprawidłowości w realizacji opisanych funkcji, mogą mieć związek z zaburzeniami neuropsychiatrycznymi (Penzes i in., 2011; Forrest i in., 2018). W związku z tym, poznanie mechanizmów zmian morfologicznych kolców, może być kluczowe z perspektywy poszukiwania nowych terapii różnych schorzeń.

1.1.5 Obecnie znane mechanizmy molekularne, leżące u podłoża zmian morfologicznych kolców dendrytycznych

Poznanie szlaków sygnałowych mediujących owe zmiany, szczególnie utrudniają, duża dynamika zachodzących procesów oraz fakt istnienia wielu różnych czynników, które wywołują zmiany strukturalne kolców, działając za pośrednictwem różnych efektorów molekularnych.

Jednym z najlepiej scharakteryzowanych procesów, któremu towarzyszą zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych, jest tzw. długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (ang. *long-term potentiation*, LTP), polegające na wzmocnieniu określonego połączenia synaptycznego, które wyraża się poprzez m.in. zwiększone wydzielanie neurotransmitera z danego zakończenia presynaptycznego (Sun i in., 2021; Harris, 2025). Obserwacja, że wraz z LTP dochodzi do zmian morfologicznych kolców dendrytycznych, doprowadziła do wprowadzenia terminu strukturalnego długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (ang.

structural long-term potentiation, sLTP)(Nakahata & Yasuda, 2018). Badania nad molekularnym podłożem sLTP, umożliwiły scharakteryzowanie podstawowych szlaków sygnałowych, zaangażowanych w zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych.

Uważa się, że kluczową rolę w sLTP odgrywa, związany z receptorami N-metylo-D-asparaginowymi (ang. *N-methyl-D-aspartic acid*, NMDA) oraz kanałami wapniowymi bramkowanymi napięciem (ang. *voltage-gated calcium channels*), napływ jonów wapnia (Ca^{2+}) do komórki, który skutkuje aktywacją białka CaMKII (ang. *Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II*) i jego transfosforylacją na treoninie-286 (Barria i in., 1997; S.-J. R. Lee i in., 2009; Chang i in., 2017). Aktywacja białka CaMKII poprzedza następującą po niej aktywację białek z rodziny małych GTPaz, w tym białka RhoA (ang. *Ras Homolog Family Member A*) oraz Cdc42 (ang. *Cell Division Cycle 42*)(Harvey i in., 2008; Murakoshi i in., 2011; Hedrick & Yasuda, 2017). RhoA oraz Cdc42 wchodzi w interakcję i aktywują kinazy PAK (ang. *p21-activated kinase*) oraz ROCK (ang. *Rho Associated Coiled-Coil Containing Protein Kinase*) (Murakoshi i in., 2011). Zarówno kinaza PAK jak i ROCK, aktywują kinazę LIM (ang. *LIM Domain Kinase*), której działanie skutkuje fosforylacją kofiliny, białka, które poprzez bezpośrednią interakcję z cytoszkieletem aktynowym, wpływa na jego reorganizację (Arber i in., 1998).

Zdecydowanie mniej wiadomo o tym jakie mechanizmy biochemiczne są zaangażowane w zmiany strukturalne kolców dendrytycznych, wywołane innymi czynnikami niż LTP, w tym m.in. plastycznością homeostatyczną, obserwowaną na skutek dłuższego działania wybranych bodźców (Turrigiano, 2012). Dotychczasowe dane wskazują, że również w przypadkach innych niż LTP, ważną rolę mogą odgrywać jony Ca^{2+} oraz białka z rodziny małych GTPaz, w tym np. białka RhoA (Ibata i in., 2008; H. Zhang i in., 2021).

1.1.6 Wpływ wybranych czynników na strukturę kolców dendrytycznych

Prawidłowe działanie procesów plastycznych kolców dendrytycznych, leży u podłoża procesów uczenia się oraz pamięci. Jednocześnie, zmiany w morfologii oraz ilości kolców dendrytycznych, zostały powiązane z szeregiem czynników zaburzających funkcję mózgowia, w tym, czynników odpowiedzialnych za rozwój chorób neuropsychiatrycznych (Kasai i in., 2010; Forrest i in., 2018). Jak dotychczas, z plastycznością kolców dendrytycznych udało się skorelować m.in. zaburzenia depresyjne (Yao i in., 2025). W badaniach *post mortem* mózgow osób z rozpoznaniem depresji, zaobserwowano zmniejszona liczbę synaps w obszarze kory czołowej, co sugeruje ubytek kolców dendrytycznych (H. J. Kang i in., 2012). Zjawiskiem, które również wykazuje istotny wpływ na strukturę kolców dendrytycznych, a także pozostaje w ścisłym związku z zaburzeniami depresyjnymi, jest chroniczny stres

(Bączyńska i in., 2024; Nestler & Russo, 2024). Badania z wykorzystaniem modeli chronicznego stresu, z których część służy jako zwierzęce modele depresji, dostarczyły danych wskazujących na ubytek liczby i zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych neuronów piramidowych kory przedczołowej oraz m.in. obszaru CA1 hipokampa (Radley i in., 2006, 2009; Naskar i in., 2022). Zarówno zaburzenia depresyjne jak i ekspozycja na chroniczny stres, są powiązane z rozregulowanym działaniem glikokortykoidów – kortyzolu u ludzi, kortykosteronu (CORT) u zwierząt (Pujo i in., 2023; Shoji i in., 2024a). W badaniach, w których myszom przewlekłe podawano podwyższone dawki CORT, wykazano zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych, analogiczne do efektów uzyskanych w wyniku ekspozycji na chroniczny stres (Liston & Gan, 2011; Anderson i in., 2016a; Moda-Sava i in., 2019).

1.1.7 Pierwotne komórki kortykalne oraz hipokampalne jako model badania zmian morfologicznych kolców dendrytycznych

W przypadku badań dotyczących plastyczności strukturalnej kolców dendrytycznych, wywołanej różnymi czynnikami endogennymi, zwykle wykorzystuje się modele zwierzęce. Jednak w związku z wysokim skomplikowaniem mózgowia, a co za tym idzie, istnieniem wielu zmiennych zakłócających, czasem uniemożliwiających selektywne badanie wybranych zjawisk, w ostatnich latach, na znaczeniu zyskują modele *in vitro*. Biorąc pod uwagę specyfikę komórek mózgowia – a przede wszystkim neuronów, optymalnym pozostaje wykorzystanie adherentnych hodowli pierwotnych (Kaech & Banker, 2006; Moutin i in., 2020).

Hodowle pierwotne neuronów, w przeciwieństwie do dostępnych neuronalnych linii komórkowych, pozwalają uzyskać fenotyp komórkowy charakterystyczny dla tego obserwowanego *in vivo*, włącznie z rozwojem połączeń synaptycznych pomiędzy neuronami i pojawieniem się kolców dendrytycznych (Bamji i in., 2006; Arikath i in., 2008). Najlepiej poznane hodowle neuronów pierwotnych, dotyczą komórek pozyskanych z kortykalnego oraz hipokampalnego obszaru mózgowia (Beaudoin i in., 2012). Biorąc pod uwagę dostępność informacji na temat warunków rozwoju neuronów pierwotnych tych obszarów, a także fakt, że charakteryzuje je wysoka ilość kolców dendrytycznych, w badaniach dotyczących mechanizmów wpływu różnych czynników na kolce dendrytyczne, zwykle wykorzystuje się właśnie kortykalne oraz hipokampalne hodowle pierwotne (Kaech & Banker, 2006; Y. Shi i in., 2009; Beaudoin i in., 2012). Co więcej, jak pokazują badania, w pierwotnych neuronach kortykalnych oraz hipokampalnych, obserwuje się ekspresję szeregu białek, które są obecne w tych typach neuronów również *in vivo*, co tym bardziej podkreśla zasadność wykorzystania tych komórek pierwotnych (Y. Shi i in., 2009; Tanokashira i in., 2012).

Hodowle neuronów pierwotnych, dają możliwość badania wybranych zjawisk w izolowanym, dobrze zdefiniowanym układzie. Dodatkowo, umożliwiają łatwiejszą manipulację eksperymentalną oraz pozwalają na obserwowanie zachodzących procesów w czasie rzeczywistym (Kaech & Banker, 2006; Beaudoin i in., 2012; Moutin i in., 2020). Ostatecznie, w połączeniu z płytkami wielodołkowymi, umożliwiają zastosowanie wielu różnorodnych manipulacji eksperymentalnych, na niemal tym samym układzie komórkowym (Daub i in., 2009).

1.2 Kortykosteron (CORT)

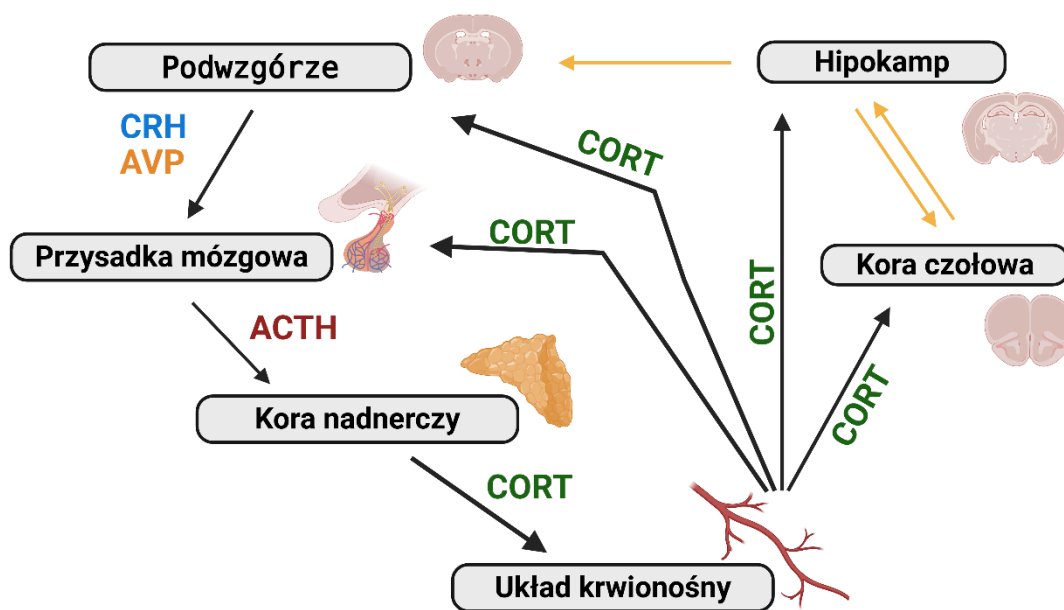
1.2.1 CORT – ogólna charakterystyka

Glikokortykoidy to klasa lipofilnych hormonów steroidowych, wytwarzanych i wydzielanych przez komórki warstwy pasmowatej (ang. *zona fasciculata*) kory nadnerczy (Midzak & Papadopoulos, 2016). Glikokortykoidy produkowane są w wyniku serii reakcji enzymatycznych, dla których prekursorem jest cholesterol (Payne & Hales, 2004). W przypadku większości ssaków, w tym ludzi, dominujący glikokortykoid to kortyzol. W przypadku przedstawicieli części innych gatunków, a także różnych rzędów ssaków (np. gryzoni), głównym glikokortykoidem jest CORT (Midzak & Papadopoulos, 2016; Lightman i in., 2020). Produkcja oraz wydzielanie CORT, stymulowane jest przez hormon adrenokortykotropowy (ang. *adrenocorticotropic hormone*, ACTH), dostarczany do układu krwionośnego i tym samym kory nadnerczy, przez komórki przedniego płata przysadki mózgowej (Rycina 1.4). Komórki przedniego płata przysadki mózgowej, są z kolei aktywowane przez komórki jądra przykomorowego podwzgórza, a konkretniej, wydzielane przez nie hormony – kortykoliberynę (ang. *corticotropin-releasing factor*, CRF) oraz wazopresynę (ang. *arginine vasopressin*, AVP). Wyżej opisany system biologiczny, składający się z komórek podwzgórza, przysadki mózgowej oraz kory nadnerczy, którego aktywność związana jest z produkcją oraz z wydzielaniem CORT, określany jest jako oś podwzgórze-przysadka-nadnercza (ang. *hypothalamic-pituitary-adrenal axis*, HPA)(Ulrich-Lai & Herman, 2009; J. A. Sheng i in., 2021).

Jak pokazały badania, w niezaburzonych warunkach fizjologicznych, wydzielanie CORT ma charakter dobowy. Co więcej, w ramach cyklu dobowego obserwuje się również krótsze, pulsacyjne, co około 60 minutowe skoki produkcyjne CORT, które określa się jako tzw. rytm ultradobowy (Windle i in., 1998; Lightman i in., 2008). W przypadku cyklu dobowego, wzrost poziomu CORT notuje się wespół z rozpoczęciem się fazy aktywnej (np. u szczurów, jest to faza ciemna, u ludzi natomiast, faza jasna), wraz z jego sukcesywnym spadkiem aż do rozpoczęcia się fazy spoczynku (Lightman i in., 2020). Dostępność CORT w komórkach różnych tkanek organizmu, jest w dużej mierze zdeterminowana przez poprawność

działania osi HPA (Lightman i in., 2008). Istnieją także inne zmienne wpływające na tkankową oraz komórkową dostępność CORT, takie jak m.in. obecność we krwi globuliny i albuminy wiążących CORT, a także, w przypadku wewnątrzkomórkowej dostępności CORT, obecność w cytoplazmie komórek, enzymu mającego dwie izoformy, określanego jako dehydrogenaza 11 β -hydroksysteroidowa (Gagliardi i in., 2010; Henley & Lightman, 2011; Wyrwoll i in., 2011). Jedną z izoform tego enzymu, znaną jako dehydrogenaza 11 β -hydroksysteroidowa typu I, występuje m.in. w komórkach mózgowia i promuje przemianę nieaktywnej formy - dehydrokortykosteronu, w formę aktywną, w CORT (Wyrwoll i in., 2011; Joëls i in., 2012).

Jak wskazują powyżej opisane mechanizmy regulacji wydzielania CORT, jednym z organów organizmów zwierzęcych, który jest szczególnie istotny dla prawidłowej gospodarki CORT, a którego komórki, jak z kolei sugerują dotychczasowe eksperymenty, są również szczególnie wrażliwe na jego działanie, jest mózgowie (Ulrich-Lai & Herman, 2009; Agasse i in., 2020). CORT, ze względu na swój mały rozmiar oraz lipofilny charakter, pasywnie przekracza barierę krew-mózg, zachowując pulsacyjny charakter oddziaływania (Droste i in., 2008).



Rycina 1.4: Uproszczony schemat wydzielania i dystrybucji CORT. Schemat przedstawia struktury mózgowia oraz organy uczestniczące w procesie uwolnienia CORT do układu krwionośnego. Schemat przedstawia również część struktur mózgowia, do których trafia CORT i które posiadają receptory dla CORT (czarne strzałki) oraz połączenie pomiędzy strukturami dotkniętymi CORT (żółte strzałki).

1.2.2 Receptory za pośrednictwem których działa CORT

Receptory za pośrednictwem których działa CORT to receptor mineralokortykoidowy (MR) oraz glikokortykoidowy (GR) (Arriza i in., 1987; Munck & Brinck-Johnsen, 1968). Zarówno MR jak i GR, w swojej dominującej formie, należą do nadrodziny receptorów jądrowych i są czynnikami transkrypcyjnymi aktywowanymi ligandem (Germain i in., 2006). Wiązanie CORT do MR bądź GR, skutkuje translokacją receptora z cytoplazmy do jądra komórkowego, gdzie wpływa on na inicjację procesu transkrypcji, poprzez przyłączenie do określonych części kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA), które charakteryzuje obecność specyficznej sekwencji nukleotydowej, określanej jako „glikokortykoidowe elementy regulatorowe” (ang. *glucocorticoid regulatory elements*, GREs). W przypadku mniej typowej formy działania, MR i GR operują poprzez przyłączenie do innego czynnika transkrypcyjnego, który wchodzi w bezpośrednią interakcję ze specyficznymi miejscami DNA, również ostatecznie wpływając na proces transkrypcji genów (Luisi i in., 1991; H.-W. Lim i in., 2015). Co więcej, dotychczas uzyskane dane eksperymentalne, wskazują na istnienie także membranowej formy MR i GR (Buttgereit & Scheffold, 2002; Samarasinghe i in., 2011).

MR w porównaniu do GR, charakteryzuje około 10 razy wyższe powinowactwo do CORT. W związku z tym, ze względu na wysokie powinowactwo receptora MR do CORT, a także obecność izoformy dehydrogenazy 11 β -hydroksysteroidowej typu I, a nie typu II, w przypadku komórek mózgowia, receptory MR są okupowane przez CORT, nawet w okresach, mniejszego wydzielania CORT (Reul & Kloet, 1985a; Joëls i in., 2012). Natomiast w okresie fazy aktywnej, którą charakteryzują co około 60 minutowe pulsy wydzielania CORT, skutkujące okresowo wyższym stężeniem CORT we krwi oraz narządach docelowych, okupowane przez ligand są również receptory GR (Joëls i in., 2012). MR oraz GR, zarówno w stanie wolnym, jak i związanym z ligandem, funkcjonują w kompleksach białkowych, których prawidłowa konfiguracja jest wymagana do zajścia procesów takich jak m.in. dojrzewanie receptora, oraz jego translokacja z części cytoplazmatycznej komórki do jądra. Jednym z białek istotnych dla zajścia wspomnianego procesu dojrzewania receptora, który ostatecznie skutkuje jego konformacją o wysokim powinowactwie do ligandu (CORT), jest białko FKBP52 (ang. *Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP4*) (Riggs i in., 2003). Inne białko, określane jako FKBP51 (ang. *Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP5*), wykazuje antagonistyczne funkcje wobec funkcji białka FKBP52, a jego rola jako białka chaperonowego, polega na hamowaniu dostępności receptora GR dla CORT (Wochnik i in., 2005; Noddings i in., 2023).

Receptory dla CORT, szczególnie licznie występują w mózgowiu. Ich obecność zaobserwowano zarówno w neuronach, jak i komórkach glejowych (Viho i in., 2022). Pomimo wysokiego poziomu obu receptorów w mózgowiu, MR i GR nie są jednorodnie rozdystrybuowane. Poziom MR jest wysoki we wszystkich regionach hipokampa, natomiast GR, szczególnie licznie występuje w strukturach takich jak obszar CA1 hipokampa, zakręt zębaty hipokampa, środkowe jądro ciała migdałowatego, a także wybrane obszary kory czołowej, takie jak m.in. przyśrodkowa kora przedczołowa (Ostrander i in., 2003; Oyamada i in., 2008; W. W. Taylor i in., 2021; Wiktorowska i in., 2021).

1.2.3 Charakterystyka działania CORT

Biorąc pod uwagę istnienie membranowej formy receptorów dla CORT, a także istnienie ich klasycznej, jądrowej formy, można wyróżnić dwa tryby działania CORT - szybkie, niezwiązane z wpływem na proces transkrypcji oraz opóźnione, genomowe, związane ze zmianami w ekspresji genów.

Podstawowy, a także najlepiej poznany mechanizm molekularny za pośrednictwem, którego CORT, poprzez wiązanie z MR oraz/bądź GR, wykazuje swój wpływ na komórki określonych tkanek, w tym komórki mózgowia, polega na regulacji procesu transkrypcji genów. Owa regulacja, najczęściej polega na bezpośrednim kontakcie homodimeru receptorów MR bądź GR, z GRE, co skutkuje inicjacją procesu tworzenia kompleksu transkrypcyjnego. Jak natomiast wskazują badania, monomeryczna forma obu receptorów, również może wpływać na proces transkrypcji genów. Wpływ ten, w przypadku formy monomerycznej, może polegać na jej interakcji z innymi czynnikami transkrypcyjnymi (Luisi i in., 1991; H.-W. Lim i in., 2015). Efekty genomowego działania CORT, widoczne są po dłuższym czasie od momentu przyłączenia CORT do receptorów i mogą utrzymywać się nawet do kilku godzin.

Nieklasyczne, niegenomowe działanie CORT, związane jest z istnieniem membranowej formy receptorów, najprawdopodobniej będącej efektem m.in. alternatywnego składania czy modyfikacji posttranslacyjnych (Oakley & Cidlowski, 2013). Niegenomowe działanie CORT, może być również związane z potencjalnym wpływem CORT na receptory związane z białkiem G, a także z wpływem CORT na funkcjonowanie mitochondriów (Nuñez i in., 2020; Kokkinopoulou & Moutsatsou, 2021; Ping i in., 2021). Niegenomowe działanie CORT, rozpoczyna się niemal zaraz po zadziałaniu CORT na receptory, a początkowe efekty działania CORT są obserwowane nawet po 20 minutach (Takahashi i in., 2002).

1.2.4 Funkcje CORT

W związku z ogólnoustrojowym działaniem, CORT wpływa na wiele aspektów funkcjonowania organizmu zwierzęcego. Natomiast bardziej specyficzne efekty działania CORT, zależą przede wszystkim

od organu poddanego działaniu CORT i wpływu wybranego receptora dla CORT – MR bądź GR, na ekspresję określonych genów, kodujących białka uczestniczące w procesach komórkowych, charakterystycznych dla danego organu. Z perspektywy dotyczącej całego organizmu, wśród najbardziej uniwersalnych funkcji jakie realizuje CORT, wyróżnić można wpływ CORT na procesy związane z redystrybucją energii (Patel i in., 2014; Kuo i in., 2015a).

I tak, ze względu na inicjację procesu glikoneogenezy w komórkach wątroby oraz ograniczenie wychwytywania glukozy przez mięśnie szkieletowe, jednym z klasycznych efektów działania CORT jest zwiększony poziom glukozy we krwi (Kuo i in., 2015b). Inicjacja procesu glikoneogenezy jest kluczowa z punktu widzenia mobilizacji energii, wymaganej np. w reakcji „walcz lub uciekaj”, pojawiającej się na skutek np. bodźca stresowego, toteż wydzielanie CORT jest skutkiem m.in. reakcji stresowej (Kuo i in., 2015b; Xu i in., 2025).

Biorąc pod uwagę funkcje CORT z perspektywy pojedynczego organu - mózgowia, efekty wywołane przez CORT w dużej mierze zależą od lokalizacji receptorów dla CORT. Ze względu na wpływ CORT na transkrypcję szeregu genów mózgowia – zależnie od poziomu i czasu stymulacji, CORT reguluje transkrypcję nawet około 10% genów – poza podstawową funkcją związaną z zaangażowaniem CORT w procesy związane z redystrybucją energii, CORT zaangażowany jest również w m.in. procesy plastyczności synaptycznej (Mifsud i in., 2021a). W jednym z badań, szczytowe poziomy CORT we krwi, pojawiające się w ramach dobowych oscylacji, były istotne dla formowania się nowych kolców dendrytycznych w neuronach kory czołowej, związanych z uczeniem się schematu ruchowego, podczas gdy okresy zmniejszonego poziomu CORT, pomiędzy najwyższymi, szczytowymi poziomami CORT, okazały się krytyczne dla utrzymania nowo uformowanych kolców dendrytycznych. Jak wskazują dane, dla formowania kolców dendrytycznych, krytyczne było zaangażowanie receptora GR i niegenomowe działanie CORT. W przypadku utrzymania nowo powstałych kolców dendrytycznych, zaangażowane były receptory MR i ich wpływ na transkrypcję genów, czyli działanie genomowe (Liston i in., 2013).

Chociaż rola CORT, ze względu na adaptacyjną funkcję jaką odgrywa, wydaje się być nieodzowna w regulacji funkcjonowania mózgowia, ma ona również swoją negatywną stronę.

1.2.5 Wpływ zaburzonej transmisji zależnej od CORT na neurony mózgowia i kolce dendrytyczne

W przypadku ekspozycji na chroniczny stres bądź z uwagi na starszy wiek, a także, np. w przypadku choroby Cushinga, dochodzi do zaburzenia dobowych i ultradobowych oscylacji wydzielania CORT. W efekcie, dochodzi do długotrwanie utrzymującego się wysokiego poziomu CORT we krwi, a tym samym,

także w mózgowiu (Yaneva i in., 2004; Sarabdjitsingh i in., 2010; Hood & Amir, 2017; Geer i in., 2024). Wpływ długotrwałe podniesionego poziomu CORT, wywiera szereg niekorzystnych zmian w komórkach mózgowia, które są tak szeroko zakrojone, że towarzyszą im, zwiększona podatność na choroby neuropsychiatryczne, a także, zaburzone funkcjonowanie poznawcze, w zakresie m.in. pamięci roboczej (Kvarta i in., 2015; Shoji i in., 2024b).

Przeprowadzono wiele eksperymentów w celu szczegółowego określenia wpływu długotrwałe podniesionego poziomu CORT na komórki mózgowia. Jak dotychczas, dowiedziono, że szczególnie wrażliwe na długotrwałe działanie podwyższonego poziomu CORT, są komórki znajdujące się w korze czołowej oraz w rejonie hipokampa. Jedne z najbardziej jednoznacznych efektów długotrwałego działania podniesionego poziomu CORT, są obserwowane w przypadku morfologii neuronów korykalnych oraz hipokampalnych, w tym, plastyczności synaptycznej. Chroniczne podania CORT bądź ekspozycja na długotrwały stres, skutkuje skróceniem dendrytów należących do neuronów obszaru CA1 hipokampa oraz kory przedczołowej (Wellman, 2001; Gourley i in., 2013a; Anderson i in., 2016b; Mingardi i in., 2021a). Analogiczne efekty obserwowane są w przypadku działania CORT na kolce dendrytyczne neuronów korykalnych oraz hipokampalnych. Chroniczne działanie CORT oraz/bądź chroniczny stres, któremu towarzyszy podwyższony poziom CORT, skutkują zmniejszeniem liczby kolców dendrytycznych (Gourley i in., 2013a; Anderson i in., 2016b). Jak pokazuje część badań, chroniczne działanie CORT, wpływa również na strukturę kolców dendrytycznych. W jednym z nich, chroniczne podwyższony poziom CORT, utrzymywany w medium komórkowym przez 2 tygodnie, skutkowało wzrostem liczby cienkich kolców dendrytycznych i spadkiem liczby dojrzałych, grzybkowatych kolców dendrytycznych, w pierwotnych neuronach hipokampalnych (Tanokashira i in., 2012). W innym, chroniczne podwyższony poziom CORT we krwi szczurów przez okres 2 i 3 tygodni, skutkowało całkowitym ubytkiem kolców dendrytycznych w korze przedczołowej. W tym, spadkiem liczby cienkich kolców dendrytycznych po 2 tygodniach i spadkiem liczby cienkich oraz grzybkowatych kolców dendrytycznych po 3 tygodniach podwyższonego poziomu CORT we krwi (Anderson i in., 2016b).

Pomimo intensywnie prowadzonych badań dotyczących wpływu CORT na plastyczność kolców dendrytycznych, wciąż pozostaje wiele niewiadomych, w tym m.in. nie wiadomo jakie konkretne zmiany morfologiczne zachodzą pod wpływem CORT. Większość dotychczasowych badań, w dużej mierze ze względu na problemy metodyczne związane z wizualizacją, obrazowaniem i analizą kolców dendrytycznych, skupiała się jedynie na oszacowaniu wpływu CORT na liczbę kolców dendrytycznych w ogóle, bądź na liczbę kolców określonego rodzaju, z pominięciem wpływu CORT na określone

parametry morfologiczne, takie jak np. szerokość głowy kolca czy ich przeciętną długość (Tanokashira i in., 2012; Gourley i in., 2013a; Anderson i in., 2016b). Tak więc, przyjęcie arbitralnych kryteriów klasyfikacji kolców, uniemożliwia oszacowanie rozmiaru zachodzących zmian strukturalnych, w odniesieniu do konkretnych parametrów morfologicznych, tym samym, uniemożliwia powiązanie obserwowanych zmian morfologicznych z funkcją kolców dendrytycznych (Pchitskaya & Bezprozvanny, 2020). Dodatkowo, wiąże się ono z szeregiem problemów, w tym przede wszystkim, z możliwą utratą informacji na temat zmian wewnątrz danej kategorii. Co więcej, podejście oparte o kategoryzację kolców dendrytycznych, utrudnia identyfikację mechanizmu, za pośrednictwem którego CORT wpływa na morfologię kolców dendrytycznych.

1.2.6 Molekularny mechanizm wpływu CORT na morfologię kolców dendrytycznych

W świetle powyżej opisanych badań, wpływ długotrwale podwyższonego poziomu CORT, na zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych neuronów korykalnych oraz hipokampalnych, wydaje się bezsprzeczny. Jednocześnie, mechanizmy molekularne mediujące owe zmiany, są słabo scharakteryzowane. W jednym z badań, w którym zaobserwowano spadek liczby grzybkowatych kolców dendrytycznych wywołany CORT; wykazano również wpływ CORT na wzrost współczynnika obrotu oraz spadek stabilności filamentowych włókien aktynowych pierwotnych neuronów hipokampalnych. Dodatkowo, wykazano, że za spadek stabilności filamentowych włókien aktynowych i obserwowane efekty w morfologii kolców dendrytycznych, odpowiedzialny był spadek w poziomie białka Caldesmon, które wiąże się do włókien aktynowych i stabilizuje ich strukturę (Tanokashira i in., 2012). W innym badaniu, inkubacja żywego skrawka hipokampalnego z analogiem CORT i agonistą receptora GR – deksametazonem (DEX), wpłynęła na poziom fosforylowanej kofiliny, białka regulującego polimeryzację i depolimeryzację włókien aktynowych (Jafari i in., 2012). Wciąż jednak niewiele wiadomo za pośrednictwem jakich szlaków sygnałowych, dochodzi do wpływu CORT na aktywność białek wiążących aktynę, a tym samym, na współczynnik obrotu i stabilność włókien aktynowych.

W poszukiwaniu mediatorów wpływu chronicznie podwyższonego poziomu CORT na morfologię kolców dendrytycznych, szczególną uwagę zwracają efekty jakie ten wywiera na szeroko rozumianą aktywność neuronalną oraz czynniki neurotroficzne, w tym czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego (ang. *Brain-Derived Neurotrophic Factor*, BDNF). Zarówno stopień pobudzenia neuronalnego, jak i sygnalizacja związana z odpowiedzią na czynniki neurotroficzne, silnie korelują z morfologią kolców dendrytycznych, co czyni je istotnymi zmiennymi potencjalnie uczestniczącymi w efektach działania CORT (Kellner i in., 2014; Harward i in., 2016; Hobbiss i in., 2018). Podwyższony

poziom CORT lub DEX, prowadzą do redukcji poziomu wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} w neuronach (S. Chen i in., 2011; Suwanjang i in., 2013). Co więcej, długotrwała inkubacja korykalnych neuronów pierwotnych z wykorzystaniem DEX, powoduje zmniejszony napływ jonów Ca^{2+} do części postsynaptycznej, stymulowany BDNF (Kumamaru i in., 2008). Ostatecznie, chronicznie podwyższony poziom CORT, skutkuje spadkiem poziomu receptora dla BDNF – TrkB (ang. *Tropomyosin receptor kinase B*), w pierwotnych neuronach korykalnych (Pandya i in., 2014a).

Białkami integrującymi sygnał zależny zarówno od jonów Ca^{2+} jak i czynników neurotroficznych, w tym BDNF, są integryny (Lin i in., 2008; Carlstrom i in., 2011). Kinaza płytek przylegania (ang. *Focal Adhesion Kinase*, FAK), jedno z białek adaptorowych związanych z integrynami, które odpowiada na sygnał pochodzący od BDNF oraz TrkB, moduluje morfologię kolców dendrytycznych (Y. Shi i in., 2009; Myers & Gomez, 2011a; Matsuda i in., 2012).

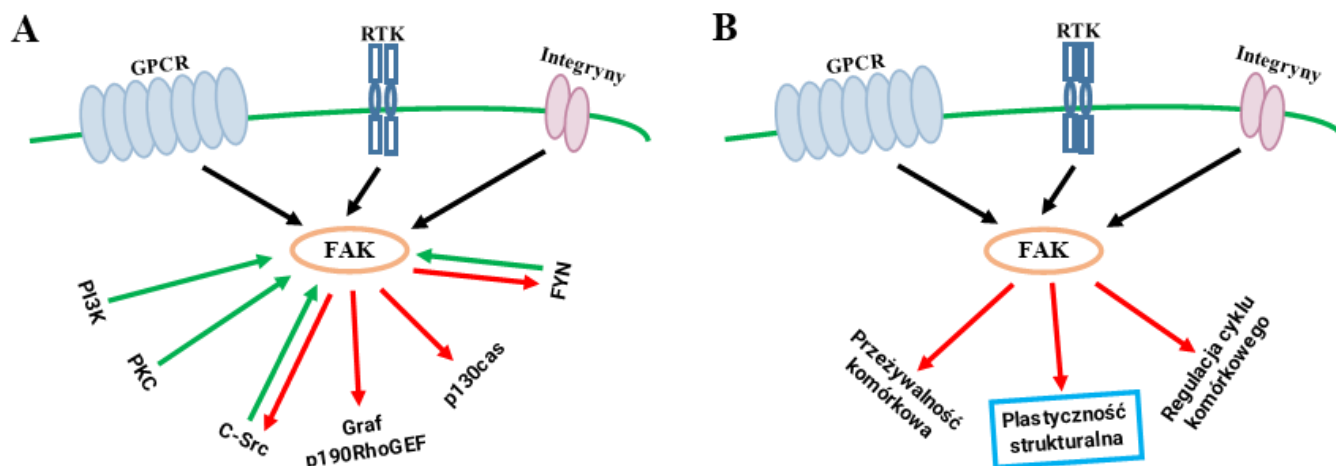
1.3 Kinaza płytek przylegania (FAK)

1.3.1 FAK – ogólna charakterystyka

FAK to białko będące niereceptorową (cytoplazmatyczną) kinazą tyrozynową. Białko FAK znane jest przede wszystkim ze swojego zaangażowania w procesy związane z adhezją komórek do macierzy zewnątrzkomórkowej, a także, w procesy związane z ruchliwością komórek (Zachary, 1997; Mitra i in., 2005). Nieprzypadkowo, największy poziom białka FAK w komórkach, odnotowuje się w płytkach przylegania (ang. *focal adhesion*), czyli kompleksie wielu białek zorganizowanych wokół transbłonowych receptorów – integryn, które są kluczowe z perspektywy interakcji komórki z macierzą zewnątrzkomórkową (Baker i in., 1994; Mitra i in., 2005).

Gen kodujący białko FAK, nosi nazwę *PTK2*. W przypadku myszy, składa się on z 34 eksonów kodujących (Armendáriz i in., 2014a). Produktem opisanego genu jest białko FAK, w którego strukturze znajdują się 3 różne domeny. W pobliżu N-końca znajduje się domena FERM (ang. *Band four-point-one, ezrin, radixin, moesin homology*), odpowiedzialna za lokalizację białka na powierzchni pomiędzy błoną lipidową komórki oraz cytoszkieletem aktynowym, będąc tym samym powierzchnią styku dla tychże. Jak wskazują badania, w przypadku białka FAK, domena FERM odpowiada również za lokalizację białka FAK do jądra komórki, a także za interakcję kinazy FAK z receptorami dla czynników wzrostu i co najważniejsze, auto inhibicję białka FAK (Lietha i in., 2007; S.-T. Lim i in., 2012; Armendáriz i in., 2014b; X. Tan i in., 2023). W centralnej części białka, znajduje się domena katalityczna kinazy tyrozynowej, odpowiedzialna za kinazową aktywność białka FAK (Le Coq i in., 2022). Ostatecznie, w

poblizu C-końca, znajduje się domena FAT (ang. *focal-adhesion targeting*), będąca sekwencją odpowiedzialną za naprowadzanie białka FAK do kompleksu płytek przylegania. Dodatkowo, w poblizu C-końca, znajdują się dwie sekwencje bogate w prolinę, które wraz z domeną FAT, tworzą obszar określany jako FRNK (ang. *FAK-related non-kinase*). Co ciekawe, FRNK może być produktem alternatywnego składowania genów i funkcjonować autonomicznie, w niektórych przypadkach będąc antagonistą wobec białka FAK (Schaller i in., 1993; Scheswohl i in., 2008; Koshman i in., 2010). Jak wskazują dotychczas przeprowadzone badania, aktywacja kanonicznej formy białka FAK (kanoniczna forma określana jest jako FAK⁰) zachodzi ‘in trans’, w efekcie wzajemnej fosforylacji dimerów białka, co skutkuje formą kinazy FAK z fosforylowaną tyrozyną w miejscu 397 (Schaller i in., 1994b; Mitra i in., 2005). Autofosforylacja białka FAK, skutkująca jego aktywacją, wiąże się ze zwiększonym powinowactwem kinazy FAK do domeny SH2 takich białek jak kinaza SRC bądź FYN (Rycina 1.5).



Rycina 1.5: Uproszczony schemat, przedstawiający FAK jako białko adaptorowe. (A) Białko FAK wpływa i jest pod wpływem szeregu różnych białek, co do których wiadomo, że są zaangażowane w procesy takie jak: **(B)** przeżywalność komórkowa, regulacja cyklu komórkowego, a także plastyczność strukturalna neuronów i kolców dendrytycznych. GPCR – receptory sprzężone z białkiem G, RTK – receptory kinazy tyrozynowe

1.3.2 FAK w neuronach

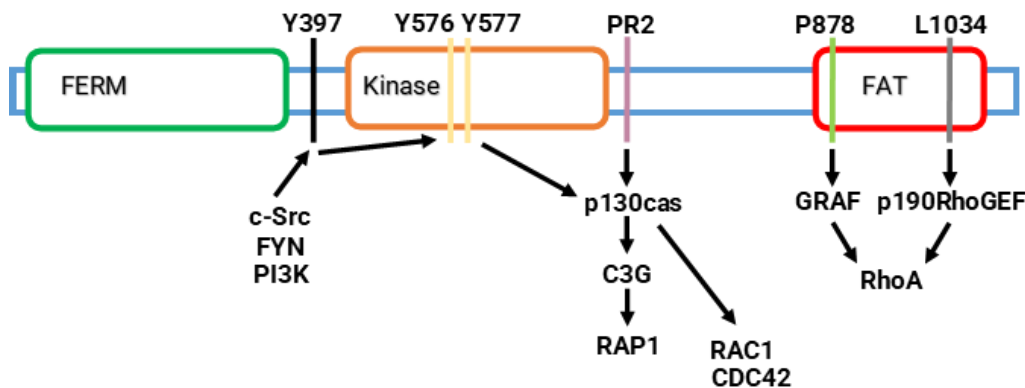
Białko FAK, którego obecność odnotowano w komórkach takich organów jak m.in. serce czy nerki, znajduje się również w komórkach mózgowia – neuronach i astrocytach. Przede wszystkim tych zlokalizowanych w korze mózgowej oraz hipokampie (S. G. N. Grant i in., 1995; Peng i in., 2008; Hu i in., 2017). Lokalizacja FAK w neuronach, nie jest ograniczona do ciała komórkowego i jądra, ale występuje również w aksonach i dendrytach (S. G. N. Grant i in., 1995). W przypadku komórek mózgowia, odnotowano występowanie wielu izoform białka FAK, będących efektem alternatywnego

składania genu *PTK2* (Burgaya & Girault, 1996). W najczęściej występującej w mózgowiu izoformie białka FAK, której pozbawione są komórki innych organów, w pobliżu domeny FAT występują trzy dodatkowe aminokwasy – prolina, tryptofan oraz arginina (motyw PWR), a także motywy 6 oraz 7, położone wokół tyrozyny 397 (Burgaya i in., 1995; Burgaya & Girault, 1996; Corsi i in., 2006; Armendáriz i in., 2014b).

Dominująca w mózgowiu izoforma kinazy FAK, występująca głównie w neuronach, zawierająca wyżej wymienione motywy, określana jest jako FAK^{+,6,7} (Burgaya i in., 1997; Toutant i in., 2002). Obecność motywu 7 jest wystarczająca do zajścia autofosforylacji ‘in cis’. W przypadku której, nie ma potrzeby interakcji z innymi częściami kinazy i dimeryzacji (która jest wymagana w przypadku kanonicznej formy FAK i która zachodzi w płytkach przylegania) (Toutant i in., 2000; Armendáriz i in., 2014b). Co więcej, obecność motywów 6 i 7 uniemożliwia zahamowanie autofosforylacji za pośrednictwem domeny FERM, jak ma to miejsce w przypadku kanonicznej formy białka FAK (Toutant i in., 2002; Kanchanawong i in., 2010). Dominacja formy FAK^{+,6,7} w neuronach, jest prawdopodobnie związana z faktem uczestnictwa tej formy, w dynamicznych procesach strukturalnych, takich jak m.in. kierowanie wzrostem neurytów (Woo i in., 2009; Armendáriz i in., 2014b).

Autofosforylacja białka FAK, skutkująca jego aktywacją, wiąże się ze zwiększonym powinowactwem kinazy FAK do wielu różnych białek, w tym p130cas (ang. *Breast cancer anti-estrogen resistance protein 1*), Grb2 (ang. *Growth factor receptor-bound protein 2*), GRAF (ang. *GTPase regulator associated with focal adhesion kinase*). Co więcej, białko FAK wydaje się integrować sygnał pochodzący od czynników neurotroficznych działających na kompleks integrzyn (Schlaepfer i in., 1998; Schlaepfer & Hunter, 1998). Dodatkowo, wykazano zwiększony poziom fosforylacji miejsc tyrozynowych białka FAK zależny od jonów Ca²⁺, który pojawił się na skutek depolaryzacji w neuronach hipokampalnych (Siciliano i in., 1996).

Tak duża ilość potencjalnych interakcji aktywowanego białka FAK i wynikające z tego powstawanie kompleksów multi-molekularnych, sugeruje rolę kinazy FAK jako białka adaptorowego, będącego miejscem integracji sygnału z wielu źródeł, w tym również z tych, których znaczenie w plastyczności strukturalnej kolców dendrytycznych wykazano wiele razy (Rycina 1.6).



Rycina 1.6. Uproszczonego schematu budowy białka FAK oraz wskazanie jego potencjalnych interakcji. Białko FAK wchodzi w interakcję z takimi białkami jak m.in. p130cas i p190RhoGEF. Zarówno p130cas, jak i p190RhoGEF są białkami zaangażowanymi w zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych m.in. poprzez ich wpływ na aktywność takich białek jak RhoA oraz RAC1. Y – tyrozyna, P – Prolina, L – Leucyna

1.3.3 FAK a kolce dendrytyczne

Udało się wyróżnić szereg procesów związanych z funkcjonowaniem komórek układu nerwowego, w które zaangażowane jest białko FAK. Początkowo, badania skupiające się na roli białka FAK w mózgowiu, dotyczyły jego znaczenia w embrionalnym rozwoju neuronalnym (Petridou i in., 2013). Z czasem, udało się wskazać konkretne zjawiska, w których rola białka FAK jest nieodzowna. Liczne badania wskazują na kluczowe zaangażowanie kinazy FAK, w procesy związane z modulacją morfologii komórek nerwowych, m.in. morfologii neurytów (Kleene i in., 2010; Chacón, Navarro, Cuesto, del Pino, i in., 2012). W przypadku kortykalnych neuronów pierwotnych, zakłócenie aktywności kinazy FAK, przez zwiększoną ekspresję niekatalitycznej domeny FRNK, skutkowało opóźnioną neurytogenezą (Gupton & Gertler, 2010). Zaś w przypadku neuronów hipokampalnych, nokaut (ang. *knock-out*) genu kodującego białko FAK, powodował wzrost ilości rozgałęzień aksonalnych (Rico i in., 2004).

Lokalizacja białka FAK w dendrytach, a także interakcja z białkami uczestniczącymi w regulacji morfologii kolców dendrytycznych, sugeruje zaangażowanie kinazy FAK również w procesy plastyczności synaptycznej. Jedno z pierwszych badań dotyczących tego zagadnienia, dostarczyło pośrednich dowodów na potencjalną rolę białka FAK w regulacji morfologii kolców dendrytycznych. Wykazano w nim, że białko FAK odgrywa istotną rolę w powstawaniu LTP, które zwykle, związane jest ze strukturalnym wzrostem kolców dendrytycznych (Y. C. Yang i in., 2003a; Nakahata & Yasuda, 2018). W kolejnym badaniu, w którym wykorzystano hipokampalne neurony pierwotne, już w sposób bezpośredni potwierdzono udział kinazy FAK w regulacji struktury kolców dendrytycznych. Autorzy badania wykazali, że nokaut genu *PTK2* w pierwotnych neuronach hipokampalnych, skutkowało

zwiększoną liczbą filopodialnych kolców dendrytycznych i spadkiem liczby dojrzałych kolców grzybkowatych (Y. Shi i in., 2009). Ostatecznie, białko FAK okazało się konieczne w zależnym od receptora EphB2 (ang. *Ephrin type-B receptor 2*) i białka RhoA, skróceniu kolców dendrytycznych (Moeller i in., 2006a).

1.4 Przesłanki do hipotez badawczych o wpływie kortykosteronu na morfologię kolców dendrytycznych oraz udziale kinazy płytek przylegania w mechanizmie regulowania morfologii kolców dendrytycznych przez kortykosteron – synteza

Większość synaps w mózgowiu jest pobudzająca, a jedną ze składowych synaps pobudzających są kolce dendrytyczne. Kolce dendrytyczne to błonowe wypustki, które mogą dynamicznie zmieniać swój kształt, a także znikać i pojawiać się ponownie. Tym samym, to właśnie kolce dendrytyczne są podstawą zachodzących procesów reorganizacji synaps, a więc również i plastyczności synaptycznej (Yuste & Bonhoeffer, 2004b; Citri & Malenka, 2008).

Struktura kolców dendrytycznych jest ściśle powiązana z ich funkcją. Odmienna morfologia poszczególnych kolców dendrytycznych, skutkuje różnorodnym wpływem na potencjały postsynaptyczne. Struktura kolców dendrytycznych jest więc kluczowa z perspektywy funkcjonowania neuronu postsynaptycznego i całych sieci neuronalnych (Yuste, 2011b). Dlatego, nawet niewielkie odstępstwo od typowej morfologii kolców dendrytycznych, może prowadzić do zaburzeń działania na poziomie pojedynczej komórki oraz całej sieci neuronalnej (Penzes i in., 2011; Forrest i in., 2018; Moda-Sava i in., 2019).

Jednym z czynników, które wpływają na morfologię kolców dendrytycznych, jest chronicznie podwyższony poziom CORT. Chronicznie podwyższony poziom CORT, skutkuje redukcją liczby kolców dendrytycznych w obszarze kory przedczołowej oraz hipokampa (Gourley i in., 2013a; Anderson i in., 2016b). Ponadto, chronicznie podwyższony poziom CORT, skutkuje dominacją niedojrzałych, cienkich kolców dendrytycznych w pierwotnych neuronach hipokampalnych (Tanokashira i in., 2012). Mimo obserwacji zachodzących zmian w obszarze morfologii kolców dendrytycznych; z powodu stosowania podejścia opartego na kategoryzacji kolców, wciąż nie wiadomo w jakim stopniu i jakie konkretnie parametry struktury kolców ulegają zmianie w neuronach kortykalnych oraz hipokampalnych (Tanokashira i in., 2012; Gourley i in., 2013a; Anderson i in., 2016b). Ponadto, ze względu na znikomą liczbę badań łączących hodowle pierwotne z CORT, dostępnych jest niewiele danych na temat wpływu CORT na kolce dendrytyczne kortykalnych oraz hipokampalnych neuronów pierwotnych. Wiedza na

temat wpływu CORT na morfologię kolców dendrytycznych korykalnych i hipokampalnych neuronów pierwotnych i poznanie ewentualnych różnic w zakresie tego wpływu, pozwoliła by na stworzenie systemów eksperymentalnych, użytecznych w badaniach mechanizmów dysfunkcji mózgowia wywołanych CORT.

Ścieżki sygnałowe za pośrednictwem których CORT wpływa na strukturę kolców dendrytycznych, również nie zostały w pełni poznane. Jedno z białek, którego aktywność jest związana z reorganizacją aktywny cytoszkieletu i jednocześnie może być pośrednio modulowana przez CORT jest FAK (Koukouritaki i in., 1999; Chacón, Navarro, Cuesto, Del Pino, i in., 2012; Soleimani i in., 2022). FAK to kinaza tyrozynowa, która pełni rolę białka adaptorowego, integrującego sygnał z różnych receptorów, w tym integrzyn, czy receptorowych kinaz tyrozynowych, będących receptorami dla czynników wzrostu (Schlaepfer & Hunter, 1998; Sieg i in., 2000a; Mitra i in., 2005). Wysoki poziom białka FAK zaobserwowano w neuronach znajdujących się w obszarze kory oraz hipokampa, czyli w neuronach, które wykazują szczególną wrażliwość na zaburzenie gospodarki CORT (S. G. N. Grant i in., 1995). Jednocześnie, wykazano, że białko FAK uczestniczy w zmianach morfologicznych kolców dendrytycznych komórek hipokampalnych. W jednym z badań, nokaut genu *PTK2* (kodującego białko FAK) w pierwotnych neuronach hipokampalnych, skutkowałam wzrostem przeciętnej długości kolców dendrytycznych i spadkiem przeciętnej szerokości ich głowy, który odwracała nadekspresja konstytutywnie aktywnej formy białka FAK (FAK^{Y397E}). W tym samym badaniu, nadekspresja zmutowanych form białka FAK (FAK^{L1034S}, FAK^{P878A}), w miejscach, które są wymagane do wiązania kinazy FAK z białkami GRAF oraz p190RhoGEF (ang. *Rho guanine nucleotide exchange factor 28*), regulującymi aktywność m.in. białka RhoA, nie doprowadziła do przywrócenia właściwej morfologii kolców, sugerując potencjalną rolę białka FAK, w regulacji szlaku sygnałowego związanego z białkiem RhoA, w kontekście kontroli morfologii kolców dendrytycznych (Y. Shi i in., 2009). Białko RhoA, uczestniczy w zmianach morfologicznych kolców dendrytycznych indukowanych również przez CORT (Y. Chen i in., 2016).

Tak więc, białko FAK, występujące w neuronach korykalnych i hipokampalnych, wchodzące w interakcję z białkami regulowanymi przez CORT, które są powiązane ze zmianami morfologicznymi kolców dendrytycznych, samo również zaangażowane w plastyczność strukturalną kolców dendrytycznych, jest dobrze usytuowane by uczestniczyć w procesach zmian strukturalnych kolców dendrytycznych, wywołanych przez długotrwale podwyższony poziom CORT.

2. Cele pracy i hipotezy badawcze

Ze względu na znikomą liczbę badań łączących hodowle pierwotne z CORT, niewiele jest danych na temat wpływu CORT na kolce dendrytyczne korykalnych oraz hipokampalnych neuronów pierwotnych. Ponadto, z powodu stosowania podejścia opartego na kategoryzacji kolców, zwykle ograniczonego do wieloczynnikowych modeli zwierzęcych, wciąż nie wiadomo w jakim stopniu i jakie konkretnie parametry struktury kolców ulegają zmianie w neuronach korykalnych oraz hipokampalnych, wrażliwych na długotrwałe działanie podniesionego poziomu CORT.

Z uwagi na powyższe, pierwszym celem niniejszej pracy było:

1. Zbadanie wpływu długotrwałe podwyższonego poziomu CORT na morfologię kolców dendrytycznych, mysich, pierwotnych neuronów korykalnych oraz hipokampalnych

Realizacja pierwszego celu badawczego, była oparta na realizacji celów szczegółowych, obejmujących:

- a) Doświadczalne określenie stężenia CORT, która nie wpływa na żywotność oraz ogólne aspekty morfologii komórek, takie jak np. całkowita długość dendrytów oraz liczba dendrytów, pierwotnych neuronów korykalnych i hipokampalnych.
- b) Doświadczalne ustalenie stężenia CORT, która nie wpływa na żywotność oraz ogólne aspekty morfologii komórek, natomiast wywołuje zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych, korykalnych i hipokampalnych neuronów pierwotnych.
- c) Scharakteryzowanie zmian morfologicznych kolców dendrytycznych, w zakresie określonych parametrów struktury kolca, takich jak m.in. przeciętna szerokość głowy oraz długość kolca dendrytycznego, wywołanych przez wcześniej wyselekcjonowane stężenie CORT, w pierwotnych komórkach korykalnych i hipokampalnych

Pomimo przesłanek wskazujących na potencjalne zaangażowanie FAK w zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych korykalnych i hipokampalnych komórek pierwotnych, wywołane długotrwałe podniesionym poziomem CORT, nadal brakuje jednoznacznych danych eksperymentalnych potwierdzających to przypuszczenie.

Z uwagi na powyższe, drugim celem niniejszej pracy było:

2. Zbadanie roli białka FAK w zmianach morfologicznych kolców dendrytycznych, mysich, pierwotnych neuronów korykalnych i hipokampalnych, wywołanych przez długotrwałe podwyższony poziom CORT

Realizacja drugiego celu badawczego, była oparta na realizacji celów szczegółowych, obejmujących:

- a) Określenie wpływu modulacji aktywności białka FAK, na zmiany poszczególnych parametrów morfologicznych kolców dendrytycznych, wywołane stymulacją pierwotnych neuronów korykalnych i hipokampalnych, przez wcześniej wyselekcjonowane stężenie CORT.
- b) Zbadanie wpływu wyselekcjonowanego stężenia CORT oraz różnych czasów inkubacji z CORT, na ekspresję genu *PTK2* kodującego białko FAK, w pierwotnych neuronach korykalnych oraz hipokampalnych
- c) Zbadanie wpływu wybranego stężenia CORT oraz różnych czasów inkubacji z CORT, na całkowity poziom białka FAK oraz na poziom jego fosforylowanej formy (397T), w pierwotnych neuronach korykalnych oraz hipokampalnych

3. Materiały i metody

3.1 Składy roztworów stosowanych w eksperymentach

Wykorzystywane w badaniach roztwory, nabywano od certyfikowanych dostawców odczynników laboratoryjnych jako gotowe do użycia, bądź przyrządzano stosując wodę oczyszczoną, którą pozyskiwano za sprawą procesów odwróconej osmozy i ultrafiltracji, przeprowadzanych w aparacie MILLIPORE Milli-Q Integral 10. Składy najczęściej stosowanych buforów, znajdują się w Tabeli 1.

Tabela 1. Nazwa, skład i numer katalogowy najczęściej wykorzystywanych roztworów

Nazwa	Skład	Firma, nr katalogowy
1x PBS	0.01 M bufor fosforanowy, 0.0027 M KCl, 0.137 M NaCl	Sigma-Aldrich, nr kat. P4417
HBSS	5.33 mM KCl, 0.441 mM KH ₂ PO ₄ , 4.166 mM NaHCO ₃ , 137.931 mM NaCl, 0.338 mM Na ₂ HPO ₄ , 5.555 mM D-glukoza	ThermoFisher Scientific, nr kat. 14175095
PFA w 1x PBS	40 g proszku PFA w 1 L 1x PBS, pH	-
Roztwór RIPA	25 mM Tris, HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS	ThermoFisher, nr kat. 89900

3.2 Hodowle komórek pierwotnych

3.2.1 Przygotowanie szkiełek nakrywkowych oraz płytek wielodołkowych

Hodowle pierwotnych neuronów korykalnych oraz hipokampalnych, zależnie od eksperymentu, prowadzono z wykorzystaniem okrągłych szkiełek nakrywkowych o średnicy 18 mm (FisherScientific, nr kat. 11817093), płytek 96-dołkowych (revvity, nr kat. 6055302), które ze względu na typ dna, podobnie jak szkiełka nakrywkowe, są przystosowane do wysokorozdzielczego obrazowania mikroskopowego oraz płytek 6-dołkowych (Bionovo, nr kat. B-0680), używanych w przypadku hodowli komórek przeznaczonych do izolacji całkowitego RNA bądź białka.

Szkiełka nakrywkowe wymagały odpowiedniego przygotowania, w tym celu, w pierwszym kroku, szkiełka płukano w 70% kwasie azotowym (POL-AURA, nr kat. 7697-37-2) przez 24 godziny. Następnie, szkiełka płukano w wodzie dejonizowanej przez 90 min, siedmiokrotnie zmieniając płyn. Kolejno, szkiełka sonikowano w wodzie dejonizowanej przez 30 min, po czym sterylizowano z wykorzystaniem autoklawu dentystycznego (Prestige medical UK 9L). Następnie, szkiełka jednokrotnie płukano w bezwodnym alkoholu etylowym (POL-AURA, nr kat. PA-16-6480111#500ML) i pozostawiano do wysuszenia. Ostatecznie, szkiełka umieszczano w szalce i pokrywano roztworem poli-D-lizyny (0.5 mg/1

ml) (Sigma-Aldrich, nr kat. P0899) rozpuszczonej w roztworze 1x PBS (Sigma-Aldrich, nr kat. P4417). Szalki ze szkiełkami pokrytymi roztworem poli-D-lizyny foliowano i na całą noc umieszczano w 4°C. Kolejnego dnia, roztwór poli-D-lizyny usuwano, a szkiełka trzykrotnie opłukiwano roztworem 1x PBS i wysuszone pozostawiano w jałowych warunkach, aż do momentu użycia. Szkiełka nakrywkowe z wysianymi komórkami, trzymano w płytce 12-dołkowej (Bionovo, nr kat. B-0681).

Dołki płytek 96-dołkowych oraz 6-dołkowych, pokrywano roztworem poli-D-lizyny (0.1 mg/1 ml) rozpuszczonej w 1x PBS, płytki foliowano i na całą noc umieszczano w 4°C. Kolejnego dnia, roztwór poli-D-lizyny usuwano, a dołki trzykrotnie opłukiwano roztworem 1x PBS. Płytki z wysuszonymi dołkami pozostawiano w jałowych warunkach, aż do momentu użycia.

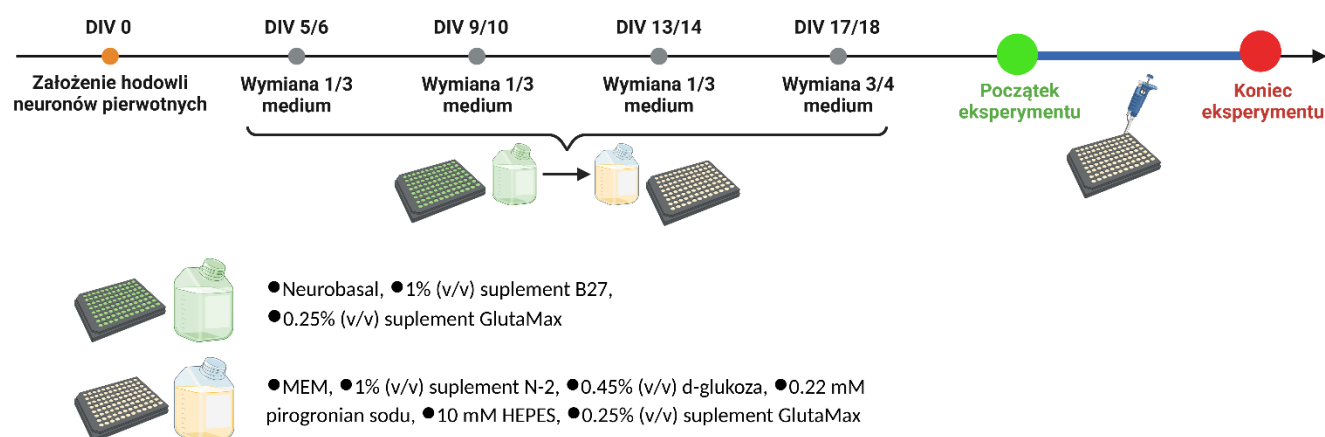
3.2.2 Zakładanie hodowli mysich, pierwotnych komórek korykalnych i hipokampalnych

Komórki wymagane do prowadzenia adherentnej hodowli pierwotnych neuronów korykalnych i hipokampalnych, izolowano z mysich płodów szczepu Albino Swiss, w 16 bądź 17 dniu rozwoju embrionalnego. Samicę uśmiercano poprzez dyslokację rdzenia kręgowego, po czym pobierano płody, które następnie umieszczano w szalce znajdującej się na lodzie i wypełnionej ochłodzonym roztworem HBSS, który pozbawiony jest jonów (ThermoFisher Scientific, nr kat. 14175095). Kolejno, wyciągano mózgowia, z których izolowano obszar korowy oraz hipokampy. Tkanę ze wszystkich płodów łączono i umieszczano w probówce wypełnionej ochłodzonym roztworem HBSS. Korę oraz hipokampy umieszczano w osobnych probówkach. Po wyizolowaniu struktur z mózgowia wszystkich płodów, HBSS ostrożnie usuwano z probówek, do których dodawano roztwór trypsyny w HBSS o stężeniu 2.5 mg/ml (MP Biomedicals nr kat. TRP0004.25). Probówki z fragmentami tkanek znajdującymi się w roztworze trypsyny, inkubowano w temperaturze 37°C, przez 15 minut. Następnie, po procedurze trawienia, usuwano roztwór trypsyny, a tkankę dwukrotnie płukano roztworem składającym się z roztworu HBSS i końskiego serum (ThermoFisher Scientific, nr kat. 16050122) o stężeniu 10% (v/v), z dodatkiem enzymu DNaza I (Roche nr. kat. 11284932001) o końcowym stężeniu 60 µg/ml (0,006 % w/v). Po dwukrotnym wypłukaniu fragmentów tkanki, ponownie dodawano roztwór składający się z roztworu HBSS, końskiego serum oraz enzymu DNaza I i mechanicznie rozbijano wcześniej strawioną tkankę, przy użyciu pipety i końcówki 1 ml (nerbe plus, nr kat. 06-693-5300), aż do momentu otrzymania jednorodnej zawiesiny. Otrzymane zawiesiny przenoszono do dwóch falkonów 15 ml, po czym wirowano (3 minuty, 200 × g) i zawieszano w pożywce wykorzystywanej do wysiania komórek, składającej się z pożywki Neurobasal (ThermoFisher, nr kat. 12348017), 1% (v/v) suplementu B-27 (ThermoFisher, nr kat. 17504044) i 0.25% (v/v) suplementu GlutaMax (ThermoFisher, nr kat. 35050061). Ostatecznie, liczbę wyizolowanych

komórek określano za pomocą automatycznego licznika komórek (Bio-Rad TC20), po czym komórki wysiewano na wcześniej przygotowane szkiełka nakrywkowe z gęstością 120 tys. komórek/szkiełko, płytki 96-dołkowe z gęstością 40 tys. komórek/dołek, oraz/bądź płytki 6-dołkowe, z gęstością 1 mln. komórek/dołek. Tak wysiane komórki pierwotne, hodowano w temperaturze 37°C i atmosferze zawierającej 5% CO₂.

3.2.3 Medium wykorzystywane w utrzymaniu hodowli pierwotnych komórek korykalnych i hipokampalnych oraz w procedurze eksperymentalnej

Pierwotne komórki korykalne oraz hipokampalne, wysiewano i przez pierwsze dni utrzymywano w medium składającym się z pożywki Neurobasal, suplementu B-27 i suplementu GlutaMax (zgodnie z opisem w 3.1.2). W celu zmniejszenia stężenia CORT w pożywce, w której hodowano komórki, a który jest składnikiem suplementu B-27, po wysianiu komórek pierwotnych, do momentu rozpoczęcia eksperymentów, pożywkę wymieniano czterokrotnie, na medium składające się z pożywki MEM (ThermoFisher, nr kat. 51200038), d-glukozy (Sigma-Aldrich, nr kat. G8769-100ML) o stężeniu 0.45% (v/v), 1% (v/v) suplementu N2 (ThermoFisher, nr kat. 17502048), suplementu GlutaMax o stężeniu 0.25% (v/v), pirogronian sodu (Sigma-Aldrich, nr kat. P2256-25G) o stężeniu 0.22 mM, a także 10 mM buforu HEPES (ThermoFisher, nr kat. 15630080). Pierwsze trzy wymiany obejmowały wymianę 1/3 części medium. Ostatnia, czwarta wymiana, obejmowała wymianę 3/4 części medium i miała miejsce na dzień przed rozpoczęciem fazy eksperymentów właściwych. Zależnie od prowadzonego eksperymentu, wymiana medium miała miejsce w następujących dniach hodowli (ang. *day in vitro*, DIV) - 5/6, 9/10, 13/14 oraz 17/18. Opisany powyżej schemat wymiany medium oraz podsumowanie składów mediów wykorzystywanych na etapie wysiewania i procedury eksperymentalnej, przedstawiono na rycinie 3.1.



Rycina 3.1: Schemat przebiegu wymiany medium oraz podsumowanie składu mediów wykorzystywanych na etapie wysiewania oraz procedury eksperymentalnej.

3.2.4 Utrwalenie pierwotnych komórek korykalnych i hipokampalnych

Pierwotne komórki korykalne oraz hipokampalne utrwalano, zależnie od przeprowadzanego eksperymentu, w 18, 21 bądź 22 dniu hodowli. Procedura utrwalania wyglądała tak samo, zarówno w przypadku komórek hodowanych na szkiełkach nakrywkowych w płytce 12-dołkowej, jak i komórek hodowanych z wykorzystaniem płytki 96-dołkowej. Z dołków płytek 12-dołkowych, gdzie znajdowały się szkiełka nakrywkowe z komórkami, oraz z dołków płytek 96-dołkowych, gdzie znajdowały się komórki, odbierano pożywkę i dodawano 4% (w przypadku komórek przeznaczonych do procedury barwienia fluorescencyjnego) bądź 1.5% (w przypadku komórek przeznaczonych do barwienia indokarbocyaniną), ciepły (37°C) roztwór PFA (ThermoFisher, nr kat. A11313.36) w 1x PBS, na 15 minut. Po upływie 15 minut, roztwór PFA odbierano, a dołki z komórkami dwukrotnie płukano roztworem 1x PBS i komórki ostatecznie pozostawiano w roztworze 1x PBS. Płytki z utrwalonymi komórkami przechowywano w temperaturze 4°C, gdzie znajdowały się aż do momentu użycia.

3.2.5 Substancje wykorzystywane w eksperymentach

W eksperymentach wykorzystywano CORT (Sigma-Aldrich, nr kat. 27840), inhibitor FAK – substancję FAK inhibitor 14 (Y15) (TOCRIS, nr kat. 3414), aktywator FAK – substancję ZINC40099027 (ZN27)(MedChemExpress, nr kat. HY-134570) oraz dimetylosulfotlenek (DMSO) (Sigma-Aldrich, nr kat. 276855) służący jako rozpuszczalnik dla powyżej wymienionych związków. CORT, który używano w trzech stężeniach – 0.25 μM , 0.5 μM oraz 1 μM , rozpuszczano w DMSO, tak aby jego początkowe stężenie wynosiło 10000x więcej niż wymienione powyżej stężenia ostateczne, używane w eksperymentach. Następnie, początkowe stężenia kortykosteronu w DMSO, rozcieńczano 100x w pożywce MEM, a następnie 100x, w medium, w którym znajdowały się korykalne i hipokampalne komórki pierwotne. Ostatecznie, uzyskiwano oczekiwane stężenia CORT, a stężenie procentowe DMSO w medium, w którym znajdowały się komórki, nie przekraczało 0.1%. DMSO, którego używano do stymulacji komórek pierwotnych należących do grupy kontrolnej, przygotowywano w analogiczny sposób, na początku roztwór DMSO rozcieńczając 100x w pożywce MEM, a następnie 100x w medium, w którym znajdowały się komórki pierwotne.

W dalszych fazach prac badawczych, wykorzystywano wyłącznie CORT o stężeniu 0.25 μM . Używane w eksperymentach stężenia CORT, wybrano na podstawie dostępnych danych literaturowych (Bassil i in., 2023; Rodrigues i in., 2025; Tanokashira i in., 2012), kierując się kryteriami znanego wpływu CORT na morfologię neuronów, a także stężeniami CORT jakie obserwowane są w mózgach gryzoni poddanych procedurze stresu (Tanokashira i in., 2012).

FAK inhibitor 14 używano w stężeniu 3 μM , a FAK aktywator – ZINC40099027, w stężeniu 0.1 μM . Wszystkie te substancje rozpuszczano w DMSO, a schemat rozpuszczania wyglądał analogicznie do schematu rozpuszczania CORT, co umożliwiło zachowanie stężenia DMSO w medium, w którym znajdowały się komórki, na poziomie nie przekraczającym 0.1%. Stężenia obu substancji wymienionych powyżej, wybrano na podstawie dostępnej literatury przedmiotu (Shih i in., 2014; Q. Wang i in., 2019; Tu i in., 2010).

Medium, w którym znajdowały się komórki, wraz z nowo dodanym roztworem (roztworem CORT bądź roztworami pozostałych wykorzystywanych związków), mieszano poprzez kilkukrotne pipetowanie w górę i w dół.

3.3 Analiza morfologiczna neuronów korykalnych oraz hipokampalnych

3.3.1 Transfekcja pierwotnych neuronów korykalnych i hipokampalnych

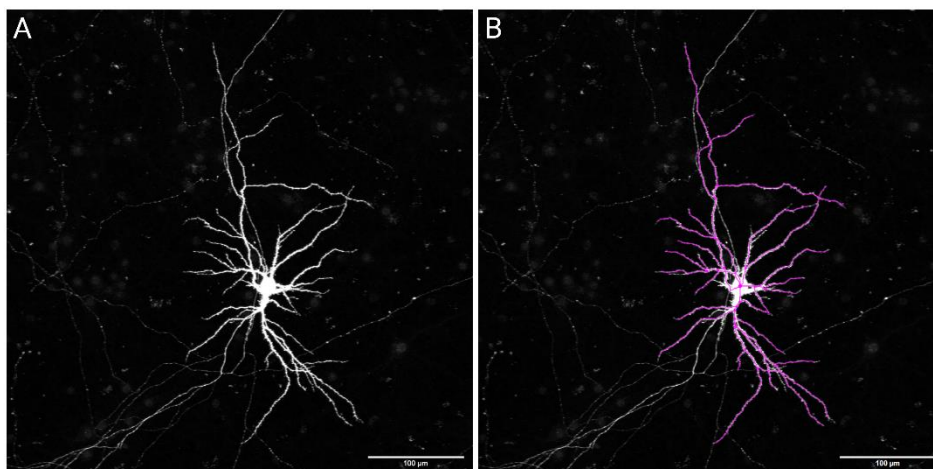
W 17 bądź 18 dniu hodowli, pierwotne neurony korykalne oraz hipokampalne, transfekowano plazmidem pCDH-hSYN-MCS-GFP-T2A, stosując metodę magnetofekcji, z wykorzystaniem odczynnika NeuroMag oraz płytki magnetycznej dołączonej do zestawu (OZBIOSCIENCES, nr kat. KC30800). Procedurze transfekcji poddawano pierwotne neurony korykalne i hipokampalne, hodowane zarówno na szkiełkach nakrywkowych, umieszczonych w płytce 12-dołkowej, jak i w dołkach płytek 96-dołkowych. Transfekcję przeprowadzano zgodnie z zaleceniami producenta. Odczynnik NeuroMag, mieszano z wyżej wymienionym plazmidem, w proporcji 1:0.5. Równolegle przygotowywano dwie probówki, w jednej z nich, znajdowało się 12 μl odczynnika NeuroMag, w drugiej, mieszano 6 μg plazmidu DNA z 600 μl pożywki MEM (ThermoFisher, nr kat. 51200038). Następnie, mieszaninę plazmidu DNA z pożywką MEM, przenoszono do probówki, w której znajdował się odczynnik NeuroMag, po czym mieszaninę plazmidu DNA z pożywką MEM i odczynnikiem NeuroMag, worteksowano przez 10 sekund i inkubowano przez 20 minut w temperaturze pokojowej. Podczas inkubacji mieszaniny, przygotowywano płytkę magnetyczną, którą umieszczano w inkubatorze, a także odbierano część medium z dołków płytek poddawanych procedurze transfekcji. Po upływie 20 minut, do dołków hodowlanych, dodawano 50 μl mieszaniny plazmidowego DNA i odczynnika NeuroMag. 12-dołkową lub 96-dołkową płytkę umieszczano na płytce magnetycznej na 20 minut w 37°C. Po tym czasie, wymieniano całkowitą ilość medium w dołkach, w których znajdowały się komórki poddane procedurze transfekcji. Medium wymieniano zgodnie z opisem w podrozdziale 3.1.3.

3.3.2 Obrazowanie pierwotnych neuronów korykalnych i hipokampalnych

Obrazy pierwotnych neuronów korowych i hipokampalnych, uzyskiwano przy użyciu mikroskopu konfokalnego Leica TCS SP8 X, wykorzystując obiektyw o powiększeniu 20x (HC PL APO CS2 20x/0.75 DRY). Do detekcji obrazu neuronów pierwotnych, zwizualizowanych za pośrednictwem nadeskresji białka zielonej fluorescencji (ang. *green fluorescent protein*, GFP), wykorzystywano wzbudzenie światłem lasera o długości fali 488 nm. Wykonywano zdjęcia o rozdzielczości 1024×1024 , z wartością zoom wynoszącą 1.20, tak, że rozmiar piksela wynosił $0.5 \mu\text{m} \times 0.5 \mu\text{m}$. Zbierano serie obrazów w płaszczyźnie Z, a odstęp pomiędzy pojedynczymi zdjęciami w serii, wynosił $1 \mu\text{m}$. Obrazowano wszystkie neurony wykazujące ekspresję GFP.

3.3.3 Analiza struktury pierwotnych neuronów korykalnych i hipokampalnych

Wizualizacja pierwotnych neuronów korykalnych oraz hipokampalnych, możliwa była ze względu na ekspresję białka GFP, którą uzyskano w skutecznie transfekowanych neuronach (opis w podrozdziale 3.2.1). Uzyskane zdjęcia wstępnie edytowano w programie Leica Application Suite X (LAS X). Zdjęcia edytowano poprzez zastosowanie algorytmu maksymalnej projekcji (ang. *max projection*), a otrzymane obrazy 2D, zapisywano w formacie .tiff. Następnie, zdjęcia zapisane w formacie .tiff, wczytywano w programie ImageJ i korzystając z narzędzia SNT, w sposób półautomatyczny, poprzez zaznaczanie ciała oraz dendrytów neuronów, z pominięciem ich aksonów, odwzorowywano strukturę komórek znajdujących się na wczytywanych obrazach, ostatecznie uzyskując pliki w formacie specyficznym dla narzędzia SNT, zawierające odwzorowanie struktury analizowanych komórek. W kolejnym kroku, w dalszym ciągu korzystając z narzędzia SNT, określano takie parametry morfometryczne neuronów, jak sumaryczna długość wszystkich dendrytów oraz liczba dendrytów. Poglądowe zdjęcie przedstawiające komórkę nerwową segmentowaną za pomocą narzędzia SNT, znajduje się na rycinie 3.2. Dane dotyczące zasad działania narzędzia SNT, można znaleźć w publikacjach Arshadi et al., 2021 oraz Ferreira et al., 2014. Półautomatyczna analiza była prowadzona w formacie ślepej próby – eksperymentator nie posiadał informacji do jakiej grupy eksperymentalnej przyporządkowane były analizowane obrazy.



Rycina 3.2: Sposób analizy morfologii neuronów pierwotnych. (A) Przykładowe, konfokalne zdjęcie komórki korowej (B) oraz zdjęcie przedstawiające odwzorowanie struktury tej samej komórki, za pośrednictwem narzędzia SNT umożliwiające uzyskanie informacji o określonych parametrach morfologicznych komórki.

3.3.4 Znakowanie pierwotnych komórek korykalnych i hipokampalnych lipofilną indokarbocyjaniną (Dil)

Kolce dendrytyczne pierwotnych neuronów korykalnych oraz hipokampalnych, wizualizowano wykorzystując metodę barwienia lipofilną indokarbocyjaniną (Sigma-Aldrich, nr kat. 42364). W zależności od wykonywanego eksperymentu, przeprowadzono albo wyłącznie znakowanie neuronów pierwotnych barwnikiem Dil, albo znakowanie barwnikiem Dil w połączeniu z barwieniem immunofluorescencyjnym, zaraz po zakończonej procedurze barwienia immunofluorescencyjnego. Kryształy Dil ($20 \mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$) umieszczano w 5 ml roztworu PBS i korzystając z myjki ultradźwiękowej (EMAG Emmi 20 HC), sonikowano przez 1 godzinę, aż do momentu uzyskania jednolitej zawiesiny. Następnie, uzyskaną zawiesinę rozcieńczano 10x w roztworze 1x PBS, po czym 10x rozcieńczony roztwór Dil w 1x PBS, zależnie od eksperymentu, dodawano w ilości 1200 μl , do dołków płytki 12-dołkowej, gdzie znajdowały się szkiełka z wcześniej utrwalonymi komórkami, bądź w ilości 120 μl , do dołków płytki 96-dołkowej. Komórki inkubowano z roztworem Dil w 37°C , przez 20 min. Kolejno, z dołków usuwano barwnik Dil, a dołki z komórkami przepłukiwano trzykrotnie roztworem 1x PBS. Płytki pozostawiano w temperaturze pokojowej na 24h, po czym umieszczano w 4°C , gdzie znajdowały się aż do momentu dalszego procedowania. W przypadku szkiełek nakrywkowych, po ostatnim płukaniu, na szkiełka podstawowe, nanoszono krople medium montującego ProLongTM Gold Antifade Mountant (ThermoFisher, nr kat. P36930), po czym szkiełka nakrywkowe z wybarwionymi komórkami, umieszczano na kropli medium montującego. Szkiełka nakrywkowe umieszczone na szkiełkach

podstawowych, przykrywano folią aluminiową i pozostawiano w temperaturze pokojowej na 30 min, aż do zastygnięcia. Po tym czasie, szkiełka podstawowe zawierające szkiełka nakrywkowe, umieszczano w plastikowym opakowaniu, które przechowywano w -20°C , aż do momentu użycia.

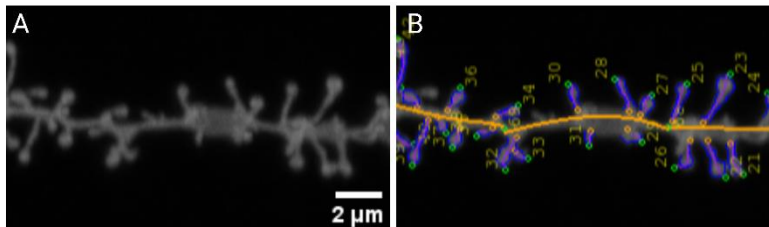
3.3.5 Obrazowanie kolców dendrytycznych pierwotnych neuronów korykalnych i hipokampalnych

Obrazowanie kolców dendrytycznych wykonywano mikroskopem konfokalnym Leica TCS SP8 X, wykorzystując obiektyw z immersją olejową o powiększeniu 100x (HC PL APO CS2 100x/1.40). W celu zobrazowania komórek znakowanych barwnikiem Dil, wykorzystywano wzbudzenie światłem lasera o długości fali 555 nm. Wykonywano zdjęcia o rozdzielczości 1024×1024 , dostosowując wartość zoom w taki sposób, aby rozmiar piksela wynosił $0.07 \mu\text{m} \times 0.07 \mu\text{m}$. Zbierano serie obrazów w płaszczyźnie Z. Obrazy w osi Z, wykonywano w odstępach $0.4 \mu\text{m}$. Do analizy morfologii kolców dendrytycznych, wybierano dendryty drugorzędowe i trzeciorzędowe, których długość wynosiła co najmniej $40 \mu\text{m}$. Wybór dendrytów drugorzędowych oraz trzeciorzędowych, podyktowany był potrzebą zredukowania możliwości wystąpienia różnic w strukturze oraz gęstości kolców dendrytycznych, będących efektem różnych rzędowości dendrytów.

3.3.6 Analiza struktury kolców dendrytycznych pierwotnych neuronów korykalnych i hipokampalnych

W początkowym etapie analizy, obrazy zawierające dendryty z kolcami dendrytycznymi, pierwotnych neuronów korykalnych oraz hipokampalnych, edytowano w programie LAS X, poprzez zastosowanie algorytmu maksymalnej projekcji. W ten sposób edytowane obrazy, zapisywano w formacie .tiff. W kolejnym kroku, obrazy dendrytów posiadających kolce dendrytyczne, w postaci maksymalnych projekcji, zapisane w formacie .tiff, wczytywano do programu SpineMagick (półautomatyczne oprogramowanie stworzone na zamówienie, patent nr WO/2013/021001), który posłużył do półautomatycznej analizy morfologii kolców dendrytycznych. Program SpineMagick umożliwia pomiar określonych parametrów struktury pojedynczych kolców dendrytycznych, takich jak: długość kolca, szerokość jego głowy czy stosunek szerokości głowy kolca do długości kolca. Co więcej, skrypt SpineMagick, umożliwia również określenie gęstości kolców dendrytycznych, poprzez wskazanie całkowitej liczby kolców dendrytycznych, znajdujących się na dendrycie o określonej długości. Poglądowe zdjęcie przedstawiające kolce dendrytyczne poddane segmentacji w programie SpineMagick, znajduje się na rycinie 3.3. Sposób pomiaru oraz definiowania określonych parametrów morfometrycznych kolców dendrytycznych, przez program SpineMagick, opisano w publikacji

Ruszczycki et al., 2012. Półautomatyczna analiza była prowadzona w formie ślepej próby – eksperymentator nie posiadał informacji do jakiej grupy eksperymentalnej przyporządkowane były analizowane obrazy.



Rycina 3.3: Sposób analizy morfologii kolców dendrytycznych neuronów pierwotnych. (A) Przykładowe, konfokalne zdjęcie kolców dendrytycznych komórki korowej (B) oraz zdjęcie tych samych kolców dendrytycznych, pozyskane z programu SpineMagick, przedstawiające segmentację kolców dendrytycznych.

3.4 Barwienia immunofluorescencyjne pierwotnych komórek korykalnych oraz hipokampalnych

3.4.1 Procedura barwienia immunofluorescencyjnego komórek korykalnych oraz hipokampalnych

Procedurze barwienia immunofluorescencyjnego poddawano pierwotne komórki korykalne i hipokampalne, utrwalone w 1.5% (w przypadku barwienia immunofluorescencyjnego połączonego z barwieniem Dil) bądź w 4% roztworze PFA w 1x PBS. Procedurze poddawano komórki hodowane w dołkach płytek 96-dołkowych. W pierwszym etapie procedury, komórki permabilizowano przez 20 minut w temperaturze pokojowej, używając 0.3% (v/v) roztworu Tween-20 w 1x PBS. W kolejnym kroku, komórki inkubowano przez 1 godzinę, w temperaturze pokojowej, w roztworze blokującym, którym był 10% (v/v) roztwór końskiego serum w 1x PBS z 0.3% (v/v) Tween-20. Po upływie 1 godziny, roztwór blokujący usuwano, a komórki inkubowano przez 24 godziny w 4°C, z odpowiednio rozcieńczonymi przeciwciałami pierwszorzędowymi, rozpuszczonymi w roztworze składającym się z 1% (v/v) końskiego serum oraz 0.3% (v/v) Tween-20 w 1x PBS. W przypadku barwień podwójnych bądź potrójnych, używano pierwszorzędowe przeciwciała, które wyprodukowano w różnych gatunkach zwierząt. W kolejnym dniu, po upływie 24 godzin, roztwór z przeciwciałami pierwszorzędowymi usuwano, a komórki trzykrotnie płukano roztworem 1x PBS. Następnie, komórki inkubowano z odpowiednio rozcieńczonymi przeciwciałami drugorzędowymi skoniugowanymi z fluoroforem (ThermoFisher, AlexaFluor), rozpuszczonymi w 1x PBS. Inkubacja z przeciwciałami drugorzędowymi trwała 2 godziny i odbywała się w temperaturze pokojowej. Po upływie 2 godzin, roztwór z przeciwciałami drugorzędowymi usuwano, a komórki trzykrotnie płukano roztworem 1x PBS. Po ostatnim płukaniu, wybarwione komórki

pozostawiano w 1x PBS, płytkę foliowano i pozostawiano w 4°C, aż do czasu obrazowania. Wykorzystane w eksperymentach przeciwciała pierwszorzędowe, przedstawiono w Tabeli 2.

Tabela 2. Przeciwciała pierwszorzędowe wykorzystywane w procedurze barwienia immunofluorescencyjnego, wraz z informacją o użytym rozcieńczeniu, a także firmie i numerze katalogowym

Przeciwciała pierwszorzędowe	Rozcieńczenie	Firma, nr katalogowy
Mysie monoklonalne przeciwciało anti-PSD95	1:250	abcam, ab2723
Mysie monoklonalne przeciwciało anti-NeuN	1:1000	abcam, ab104224
Królicze monoklonalne przeciwciało anti-S100B	1:500	ABclonal, A19108
Kurczakowe poliklonalne przeciwciało anti MAP2	1:5000	abcam, ab5392

3.4.2 Zbieranie obrazów mikroskopowych barwień immunofluorescencyjnych – PSD95

W celu zobrazowania białka PSD95, znajdującego się w dendrytach i kolcach dendrytycznych pierwotnych neuronów korykalnych oraz hipokampalnych, wykorzystano mikroskop konfokalny Leica TCS SP8 X oraz obiektyw z immersją olejową o powiększeniu 100x (HC PL APO CS2 100x/1.40). Aby zobrazować dendryty znakowane barwnikiem Dil, wykorzystywano wzbudzenie światłem lasera o długości fali 555 nm, zaś w przypadku uzyskania sygnału pochodzącego od przeciwciał użytych do barwienia PSD95, zastosowano wzbudzenie światłem lasera o długości 653 nm. Wykonywano zdjęcia o rozdzielczości 1024 x 1024, dostosowując wartość zoom w taki sposób, aby rozmiar piksela wynosił 0.07 μm x 0.07 μm . Zbierano serie obrazów w płaszczyźnie Z, a odstęp pomiędzy pojedynczymi zdjęciami w serii, wynosił 0.40 μm . Aby uniknąć nakładania się sygnałów pochodzących z różnych fluorochromów (ang. *crosstalk*), rozgraniczono spektra detektorów. Do analizy wybierano dendryty drugorzędowe i trzeciorzędowe.

3.4.3 Zbieranie obrazów mikroskopowych barwień immunofluorescencyjnych – pozostałe białka

W celu zobrazowania barwienia markerów komórek neuronalnych oraz glejowych, białek - NeuN, MAP2 oraz S100B, wykorzystano mikroskop fluorescencyjny Leica Thunder DMI8 oraz obiektyw o powiększeniu 10x (HC PL FLUOTAR 10x/0.32). Długości fal jakie wykorzystano w celu wzbudzenia poszczególnych fluorochromów, prezentują się następująco: dla wzbudzenia przeciwciał barwiących NeuN – 470 nm, MAP2 – 550 nm, S100B – 640 nm. Wykonywano zdjęcia o rozdzielczości 1048 x 1048. Stężenia przeciwciał pierwszorzędowych, a także rodzaj i stężenia przeciwciał drugorzędowych, dopasowano w taki sposób, aby uniknąć nakładania się sygnałów pochodzących z różnych fluorochromów.

3.4.4 Analiza gęstości oraz intensywności klastrów PSD95

Ilościową ocenę poziomu klastrów białka PSD-95, przeprowadzono analizując gęstość klastrów oraz mierząc ich średnią intensywność fluorescencji. Obie analizy przeprowadzono w zdefiniowanych regionach ROI (ang. *region of interest*), którymi były wybrane drugo i trzeciorzędowe dendryty, pierwotnych komórek korykalnych i hipokampalnych. Analizę przeprowadzono z wykorzystaniem programu Imagej. W pierwszym etapie, tworzono serię binarnych masek z obrazów zawierających dendryty znakowane barwnikiem Dil. Tak utworzone binarne maski, nakładano na obrazy zawierające sygnał fluorescencyjny, będący efektem barwienia białka PSD95. W ten sposób uzyskiwano 32-bitowe obrazy, każdy zawierający jedynie sygnał będący ekwiwalentem barwienia PSD95, znajdujący się w obrębie wybarwionych dendrytów. W dalszym kroku, z 32-bitowych obrazów, tworzono maksymalną projekcję, po czym, wykorzystując jeden z automatycznych algorytmów progowania (ang. *threshold*), ustalano dolny próg intensywności. Dla każdej serii zdjęć, wykorzystywano ten sam automatyczny algorytm progowania (algorytm moments). Kolejno, manualnie zaznaczano drugorzędowe oraz/lub trzeciorzędowe dendryty, z których poddawano analizie sygnał dla PSD95, wykorzystując narzędzie Analyze Particles. Dodatkowo, korzystając z funkcji „Segmented line”, manualnie wyznaczano długość analizowanych dendrytów, tak by można było ocenić gęstość klastrów PSD95, poprzez określenie ich liczby, przypadającej na 1 μm dendrytu. Wyznaczano średnią gęstość klastrów PSD95, a także ich średnią intensywność fluorescencji dla grupy DMSO oraz grupy traktowanej CORT.

3.5 Metodyka pracy z RNA

3.5.1 Izolacja i oznaczanie stężenia RNA

Całkowite RNA z pierwotnych komórek korykalnych oraz hipokampalnych, izolowano korzystając z zestawu Quick-RNATM Miniprep (ZymoResearch, nr kat. R1055). Wymieniony zestaw, umożliwia izolację całkowitego RNA z adherentnych hodowli komórkowych, a procedura izolacji opiera się na technologii kolumnowej. Procedurę izolacji całkowitego RNA, przeprowadzano zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta. W pierwszym etapie, korykalne oraz hipokampalne komórki pierwotne, hodowane na płytkach 6-dołkowych, przenoszono na lód, po czym z dołków, gdzie znajdowały się komórki, odciągano medium, a następnie, opróżnione z medium dołki, zalewano odczynnikami RNA Lysis buffer, dołączonym do zestawu. Używając jednorazowych skrobaczek, komórki pokryte buforem lizującym zdrapywano, po czym przenoszono do probówek dołączonych do zestawu. W kolejnych krokach, wykorzystując odpowiednie kolumny znajdujące się w zestawie, lizat kilkakrotnie wirowano aż

do momentu uzyskania RNA, które ostatecznie zawieszano w wodzie wolnej od RNAz. Stężenie oraz czystość uzyskanego materiału, określano metodą spektrofotometryczną, korzystając z urządzenia NanoPhotometer N80 (IMPLEN).

3.5.2 Reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją (RT-PCR) – synteza cDNA

Wyzolowane RNA przepisywano do cDNA w reakcji odwrotnej transkrypcji z PCR, wykorzystując zestaw High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystem, nr kat. 4368814). W celu syntezy kodujących sekwencji DNA (ang. *coding DNA*, cDNA), na matrycy RNA, użyto 1000 ng RNA z każdej wyizolowanej próbki. Zarówno przygotowywanie mieszaniny reakcyjnej jak i przeprowadzanie reakcji, odbywało się według zaleceń producenta. Składniki mieszaniny reakcyjnej i parametry reakcji odwrotnej transkrypcji, podano w Tabeli 3 i Tabeli 4:

Tabela 3. Składniki mieszaniny reakcji RT-PCR

Składniki mieszaniny reakcyjnej	Objętość (20 μ l)
10x bufor RT	2 μ l
25x miks dNTP (100 mM)	0.8 μ l
10x startery losowe (ang. <i>Random primers</i>)	2 μ l
Inhibitor RNAz	1 μ l
Odwrotna transkryptaza MultiScribe	1 μ l
RNA (1000 ng)	Zależnie od stężenia dla danej próbki
H ₂ O pozbawione nukleaz	Zależnie od stężenia RNA dla danej próbki

Tabela 4. Warunki reakcji RT-PCR

Warunki reakcji RT-PCR		
Krok	Czas	Temperatura
Wydłużanie starterów	10 minut	25°C
Synteza cDNA	120 minut	37°C
Deaktywacja odwrotnej transkryptazy	5 minut	85°C
	∞	4°C

3.5.3 Ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (qRT-PCR)

Ilościową reakcję PCR w czasie rzeczywistym, przeprowadzano zgodnie z protokołem producenta, wykorzystując TaqMan Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems, nr kat. 4369542) oraz gotowe do użycia, komercyjnie dostępne sondy TaqMan (Applied Biosystems), których spis znajduje się w tabeli 6. 50 ng matrycy cDNA oraz pozostałe składniki tworzące mieszaninę reakcyjną, w tym sondy, dodawano do dołków płytek MicroAmp Fast Optical 96-Well (Applied Biosystem, nr. kat. 4346906). Płytki oklejano folią ochronną MicroAmp Optical Adhesive Film (Applied Biosystem, nr. kat. 4311971) oraz krótko

wirowano. Wykonywano dwa techniczne replikaty. Reakcje qPCR przeprowadzono w urządzeniu QuantStudio 12k flex. Przyjmowano wartość progową sygnału (C_T , ang. *threshold cycle*), automatycznie wyznaczoną dla każdego dołka przez oprogramowanie QuantStudio 12K flex software. Względne różnice w ekspresji mRNA pomiędzy badanymi próbkami eksperymentalnymi, wykazywano przeprowadzając analizę opartą o metodę $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Uzyskane wyniki ekspresji mRNA danego genu, normalizowano względem genu referencyjnego *B2M* oraz grupy kontrolnej (DMSO) bądź, jak w przypadku eksperymentu z porównaniem komórek pierwotnych, względem komórek korykalnych. Składniki mieszaniny reakcyjnej, a także warunki reakcji qRT-PCR podano Tabeli 5 i 6. W niniejszej pracy, nazwy genów są wyrażone kursywą (Tabela 7).

Tabela 5. Składniki mieszaniny reakcji qRT-PCR

Składniki mieszaniny reakcyjnej	Objętość (10 μ l)
TaqMan Fast Advanced Master Mix	5 μ l
Sonda TaqMan	0.5 μ l
cDNA	1 μ l (50 ng)
H ₂ O pozbawione nukleaz	3.5 μ l

Tabela 6. Warunki reakcji qRT-PCR

Warunki reakcji PCR			
Krok	Temperatura	Czas	Ilość cykli
Inkubacja UNG	50°C	2 minuty	1
Aktywacja enzymu	95°C	20 sekund	1
Denaturacja	95°C	1 sekunda	40
Związanie/Wydłużenie	60°C	20 sekund	

Tabela 7. Wykaz genów, których ekspresja została zbadana w przeprowadzonych eksperymentach qRT-PCR, wraz z numerami katalogowymi wykorzystywanych sond TaqMan

Nazwa genu	Numer sondy TaqMan
<i>PTK2</i> (Protein Tyrosine Kinase 2)	Mm00433209 m1
<i>NR3C1</i> (Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 1)	Mm00433832 m1
<i>FKBP5</i> (FKBP Prolyl Isomerase 5)	Mm00487406 m1
<i>B2M</i> (Beta-2-Microglobulin)	Mm00437762 m1
<i>BCAR1</i> (BCAR1 Scaffold Protein, Cas Family Member)	Mm00487210 m1
<i>RAP1b</i> (Member of RAS Oncogene Family)	Mm05911819 s1
<i>ARHGEF28</i> (Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor 28)	Mm00442590 m1
<i>ARHGAP26</i> (Rho GTPase Activating Protein 26)	Mm00613309 m1
<i>ROCK2</i> (Rho Associated Coiled-Coil Containing Protein Kinase 2)	Mm01270843 m1
<i>SRC</i> (SRC Proto-Oncogene, Non-Receptor Tyrosine Kinase)	Mm00436785 m1
<i>RAC1</i> (RAS-related C3 botulinum substrate 1)	Mm01201657 g1
<i>RHOA</i> (Ras Homolog Family Member A)	Mm00834507 g1

MAPK (<i>Mitogen-Activated Protein Kinase 1</i>)	Mm00442479 ml
CDC42 (<i>Cell Division Cycle 42</i>)	Mm01194005 gl
mTOR (<i>Mechanistic Target of Rapamycin Kinase</i>)	Mm00444968 ml
FYN (<i>FYN Proto-Oncogene, Src Family Tyrosine Kinase</i>)	Mm00433373 ml
PTK2B (<i>Protein Tyrosine Kinase 2 Beta</i>)	Mm00552827 ml
BDNF (<i>Brain Derived Neurotrophic Factor</i>)	Mm04230607 sl
SATB2 (<i>Special AT-Rich Sequence-Binding Protein 2</i>)	Mm00507331 ml
PROX1 (<i>Prospero Homeobox 1</i>)	Mm00435969 ml

3.6 Procedury stosowane przy oznaczaniu poziomu białek

3.6.1 Izolacja białka z hodowli pierwotnych komórek korykalnych i hipokampalnych

Ekstrakty białkowe pozyskiwano z pierwotnych komórek korykalnych oraz hipokampalnych, w różnych dniach rozwoju hodowli, zależnie od potrzeb eksperymentalnych. Komórki pierwotne, przeznaczone na pozyskanie ekstraktów białkowych, hodowano w dołkach płytek 6-dołkowych. W celu pozyskania ekstraktów białkowych, z dołków płytek 6-dołkowych, gdzie znajdowały się korykalne bądź hipokampalne komórki pierwotne, usuwano medium hodowlane, następnie, dołki dwukrotnie płukano chłodnym (4°C) roztworem 1x PBS, po czym, do dołków dodawano 100 µl chłodnego (4°C) roztworu lizującego RIPA (ThermoFisher, nr kat. 89900) z dodatkiem inhibitorów proteaz (Sigma-Aldrich, nr kat. 11836153001) oraz fosfataz (ThermoFisher, nr kat. 78420). Komórki pierwotne pokryte chłodnym roztworem RIPA z dodatkiem inhibitorów proteaz oraz fosfataz, zeskrobywano przy użyciu jednorazowej skrobaczki (Corning, nr kat. 353086), ostatecznie uzyskując zawiesinę. Następnie, zawiesiny zawierające ekstrakty białkowe, wirowano (16000 × g) w temperaturze 4°C, przez 16 minut. Finalnie, supernatanty uzyskiwane po wirowaniu, przenoszono do nowych, schłodzonych probówek, umieszczonych na lodzie, które później przechowywano w temperaturze -80°C, aż do dalszego procedowania.

3.6.2 Oznaczenie stężenia białka

Całkowitą ilość białka w homogenatach określano kolorymetrycznie, metodą kwasu bicinchoninowego (BCA), wykorzystując zestaw BCA Protein Assay Kit (Bio-Rad, nr kat. 5000201). Zasada testu BCA, opiera się na redukcji jonów Cu^{2+} do Cu^+ , która zachodzi w środowisku alkalicznym, za sprawą wiązań peptydowych obecnych w białkach, i późniejszej detekcji jonów Cu^+ , poprzez ich reakcję z kwasem bicinchoninowym, co skutkuje utworzeniem stabilnego kompleksu, którego maksimum absorbancji jest osiągnięte przy długości fali 562 nm. Procedurę testu przeprowadzano zgodnie z instrukcją dostarczoną przez producenta. W celu pomiaru całkowitej ilości wyizolowanego białka, przygotowano kolejne rozcieńczenia albuminy surowicy bydlęcej (ang. *Bovine Serum Albumin*, *BSA*) w buforze do lizy,

służące jako standard, dla których pozyskiwano określone wartości absorbancji, korzystając z czytnika spektrofotometrycznego (BioTek Synergy Mx). Na podstawie uzyskanych wartości absorbancji, generowano krzywą wzorcową, będącą liniową funkcją zależności pomiędzy poszczególnymi rozcieńczeniami białka BSA, a odczytem absorbancji dla tychże. Ostatecznie, poprzez zastosowanie regresji liniowej, na podstawie wartości absorbancji uzyskanych dla badanych próbek, określano ilości białka w badanych próbkach.

3.6.3 Oznaczenie poziomu wybranych białek przy wykorzystaniu metody kapilarnej immunodetekcji i sprzętu SimpleJess

Oznaczenie poziomu wybranych białek sygnałowych w lizatach komórek korykalnych i hipokampalnych, przeprowadzono z wykorzystaniem platformy Jess (Protein Simple/bio-techne). Sprzęt Simple Jess umożliwia w pełni zautomatyzowane przeprowadzenie reakcji kapilarnej immunodetekcji. Metoda łączy rozdział białek w kapilarach poliakryloamidowych, ich immobilizację oraz detekcję chemiluminescencyjną bądź/ oraz fluorescencyjną. Do przeprowadzenia oznaczenia poziomu białka wykorzystano moduł pozwalający na separację białek w zakresie wielkości 12-230 kDa (bio-techne, nr kat. SM-W001). Dodatkowo, wykorzystano moduł umożliwiający detekcję całkowitej ilości białka w każdej kapilarze i późniejszą normalizację poziomu badanego białka, do całkowitego poziomu białka w kapilarach (bio-techne, nr kat. DM-PN02). Procedurę przeprowadzano zgodnie z protokołami producenta dostarczonymi do obu modułów.

W pierwszym etapie, białko poddawano denaturacji, inkubując z dostarczonym w zestawie ditiotreitem o stężeniu 200 mM, przez 5 minut, w temperaturze 95°C, korzystając z termocyklera T100 (Bio-Rad). Kolejno, zgodnie z zalecaniami producenta, wypełniano dostarczoną do zestawu płytkę, w odpowiednie miejsca pipetując roztwór zdenaturowanego białka (w stężeniu 0.4 mg/ml), wraz z odpowiednimi ilościami poszczególnych odczynników, w tym m.in. przeciwciał pierwszorzędowych oraz drugorzędowych, a także mieszaniny luminolu z peroksydazą. Następnie, przygotowaną płytkę przez 5 minut wirowano (2000 x g), po czym umieszczano w urządzeniu Simple Jess, wraz z kapilarami dostarczonymi w zestawie do separacji białek. Wykorzystywano standardowe dla sprzętu Simple Jess, warunki reakcji elektroforezy kapilarnej oraz immunodetekcji, które szerzej opisane, znajdują się w tabeli nr. 8.

Przeprowadzano jednoczesną detekcję dwóch białek w każdej kapilarze, a także, dla każdej kapilary określano całkowitą ilość białka. Jednoczesna detekcja była możliwa dzięki równoległemu zastosowaniu drugorzędowych przeciwciał znakowanych różnymi metodami: chemiluminescencyjnie oraz

fluorescencyjnie. W przypadku detekcji obu badanych białek, wykorzystywano drugorzędowe przeciwciała, przeznaczone do detekcji sygnału przy użyciu sprzętu Simple Jess. Nazwy, numery katalogowe oraz stężenia wykorzystywanych przeciwciał pierwszorzędowych i drugorzędowych, znajdują się w tabeli nr 9.

Detekcja sygnału odbywała się automatycznie, poprzez zastosowanie kamery CCD znajdującej się w urządzeniu Simple Jess, w formacie wysokiego zakresu dynamiki (ang. *High Dynamic Range*, HDR). Uzyskiwany sygnał przedstawiany jest w dedykowanym programie Compass for SW, zarówno graficznie w postaci elektroferogramu jak i liczbowo, w postaci pola powierzchni pod wykresem. Uzyskiwane wyniki poziomów badanych białek, normalizowano względem całkowitej ilości białka w danej kapilarze (automatyczna normalizacja na podstawie algorytmu wbudowanego w program Compass for SW) oraz względem grupy kontrolnej (DMSO).

Tabela 8. Przebieg oraz warunki reakcji elektroforezy kapilarnej oraz procedury immunodetekcji w sprzęcie Simple Jess

Rodzaj reakcji	Warunki reakcji (czas/napięcie)
Czas rozdziału białek (minuty) (ang. <i>Separation Time</i>)	25
Napięcie rozdziału białek (volty) (ang. <i>Separation Voltage</i>)	375
Czas reakcji z odczynnikiem do normalizacji (minuty) (ang. <i>Protein Normalization Time</i>)	25
Czas płukania odczynnikiem do płukania (minuty) (ang. <i>Antibody Diluent Time</i>)	5
Czas inkubacji z przeciwciałem pierwszorzędowym (minuty) (ang. <i>Primary Antibody Time</i>)	30
Czas inkubacji z przeciwciałem drugorzędowym (minuty) (ang. <i>Secondary Antibody Time</i>)	30

Tabela 9. Przeciwciała pierwszo- oraz drugorzędowe wykorzystywane w reakcji kapilarnej immunodetekcji poziomu białka

Przeciwciała pierwszorzędowe	Rozcieńczenie	Firma, nr katalogowy
Mysie monoklonalne przeciwciało anti-FAK	1:10	Scbt, sc-1688
Królicze poliklonalne przeciwciało anti- fosfo-FAK (Tyr397)	1:50	Cell Signalling, 3283
Przeciwciała drugorzędowe	Rozcieńczenie	Firma, nr katalogowy
Ośle anti-królicze przeciwciało NIR (ang. <i>Anti-Rabbit NIR Detection Module</i>)	1:20	bio-techno, DM-007
Kozie anti-mysie przeciwciało HRP (ang. <i>Anti-Mouse Detection Module</i>)	-	bio-techno, DM-002

3.7 Enzymatyczne testy kolorymetryczne

3.7.1 Pomiar poziomu CORT w medium hodowlanym

Pomiar poziomu kortykosteronu w medium wykorzystywanym do wysiewania komórek, a także w medium pobranym po ostatniej wymianie (zgodnie z opisem w podrozdziale 3.1.3), wykonywano korzystając z kompetytywnego typu testu immunoenzymatycznego (ELISA), pozwalającego na pomiar ilości CORT w medium hodowlanym, metodą kolorymetryczną (ThermoFisher, nr kat. EIACORT). Zasada działania kompetytywnego testu ELISA, mierzącego stężenie CORT, polega na rywalizacji dołączonego do zestawu CORT koniugowanego z peroksydazą, z CORT znajdującym się w badanej próbce, o przyłączenie do poliklonalnego przeciwciała przeciw CORT, którym opłaszczono dołki dołączonej do zestawu płytki. Im więcej w badanej próbce znajduje się CORT, tym mniej CORT koniugowanego z peroksydazą przyłączy się do przeciwciała, tym samym, w efekcie końcowym, mniejsza intensywność sygnału i wartość absorbancji.

Procedurę testu wykonano zgodnie z zaleceniami producenta, uwzględniając wszystkie kroki pozwalające na stwierdzenie, że uzyskany sygnał jest specyficzny i wskazuje na obecność CORT w badanych próbkach. Po wykonaniu ostatniego kroku procedury testu ELISA, w przeciągu 10 min od dodania „roztworu stopującego”, w określonych dołkach płytki 96-dołkowej, mierzono absorbancję przy użyciu fali światła o długości 450 nm, wykorzystując czytnik spektrofotometryczny (BioTek Synergy Mx). Analizę stężenia CORT w poszczególnych grupach, wykonano poprzez wygenerowanie krzywej standardowej za pomocą algorytmu czteroparametrowego, na podstawie odczytu absorbancji dla kolejnych rozcieńczeń CORT. Ostateczne stężenie CORT w badanych próbkach, przedstawiono w postaci stężenia nM/l.

3.7.2 Pomiar poziomu dehydrogenazy mleczanowej (LDH) w medium hodowlanym

W celu oszacowania potencjalnie toksycznego wpływu CORT na pierwotne komórki korykalne oraz hipokampalne, mierzono poziom aktywności LDH, wykorzystując komercyjnie dostępny test, pozwalający na pomiar aktywności LDH w medium komórkowym, metodą kolorymetryczną (Roche, nr kat. 04 744 926 001). Pomiar aktywności LDH opiera się na założeniu, że wraz z degeneracją bądź śmiercią komórek, dochodzi do zwiększonej przepuszczalności błony komórkowej i w efekcie, podwyższonego poziomu LDH w medium. Zwiększona aktywność LDH w medium, jest oceniana na podstawie detekcji soli farmazanowej, która powstaje na skutek przekształcenia mleczanu do pirogronianu, a następnie redukcji soli tetrazolowej do formazanu. Ilość soli farmazanowej, wykrywana

jest za sprawą absorpcji światła przez formazan i jest wprost proporcjonalna do aktywności LDH. Procedurę pomiaru poziomu aktywności LDH, przeprowadzono zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta. W pierwszym etapie, zbierano 50 μ l górnej warstwy medium komórkowego, tak by nie pobrać martwych komórek, w kolejnym etapie, do pobranego medium, które umieszczano w plastikowej płytce 96 dołkowej, dodawano 100 μ l mieszaniny reakcyjnej znajdującej się w zestawie. Medium wraz z mieszaniną reakcyjną inkubowano w temperaturze pokojowej, przez 15 minut. Ostatecznie, płytkę umieszczano w czytniku spektrofotometrycznym (BioTek Synergy Mx). Absorbancję mierzono przy długości fali 490 nm. Wyniki normalizowano względem grupy kontrolnej.

3.8 Analiza danych

3.8.1 Wizualizacja i statystyczna analiza danych

Każdy z eksperymentów powtórzono co najmniej trzy razy, a pojedyncze powtórzenie zdefiniowano jako niezależny biologiczny replikat (ciążarna mysz). Dane analizowano w formie randomizowanego układu blokowego (ang. *randomized block design*), wykorzystując jedno bądź dwuczynnikową analizę wariancji z powtarzaniem pomiarów (ang. *Repeated-Measures Analysis of Variance*, RM ANOVA), tam, gdzie porównywano więcej niż dwie średnie, bądź sparowany test t-studenta (ang. *Paired t-Test*) dla danych, gdzie porównywano dwie średnie. W przypadku porównania więcej niż dwóch średnich oraz nierównolicznych grup, które nie poddają się analizie z RM ANOVA, dane analizowano wykorzystując resztową estymację największej wiarygodności (ang. *Restricted Maximum Likelihood*, REML). W przypadku zastosowania RM ANOVY bądź REML i zaobserwowania istotności statystycznej dla efektów głównych bądź efektów interakcji, w celu dalszej analizy, wykorzystywano test *post hoc* Tukeya, bądź test *post hoc* Dunnetta. Nie usuwano obserwacji odstających. Zgodność danych z założeniami parametrycznych testów statystycznych, oceniano na podstawie histogramów i wykresów reszt (ang. *residual plot*). We wszystkich analizach za próg istotności przyjmowano $p < 0.05$ (test dwustronny). Szczegółowe informacje dotyczące zastosowanej analizy statystycznej, a także uzyskanych rezultatów w danym eksperymencie, znajdują się w opisie pod wykresami. Słupki na wykresach przedstawiają średnią arytmetyczną. Punkty, znajdujące się na słupkach określonych grup eksperymentalnych, przedstawiają wyniki dla pojedynczych, niezależnych biologicznych replikatów. Linie łączące pojedyncze punkty w ramach różnych grup eksperymentalnych, wskazują na dane pochodzące z tego samego biologicznego replikatu. Do wizualizacji oraz statystycznej analizy danych, wykorzystywano program GraphPad Prism

8 (Dotmatics, USA). Do dodatkowych obliczeń, wykorzystywano program Microsoft Excel (Microsoft, USA).

4. Wyniki

4.1 Charakterystyka hodowli mysich, pierwotnych komórek korykalnych oraz hipokampalnych, pochodzących z embrionów

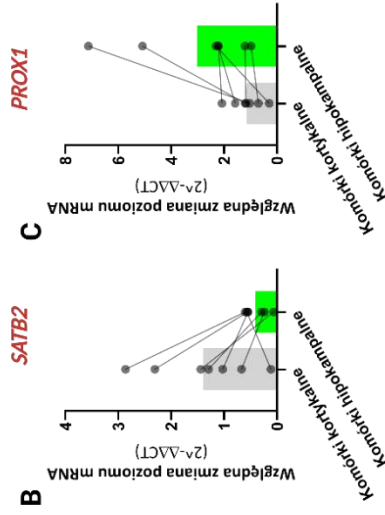
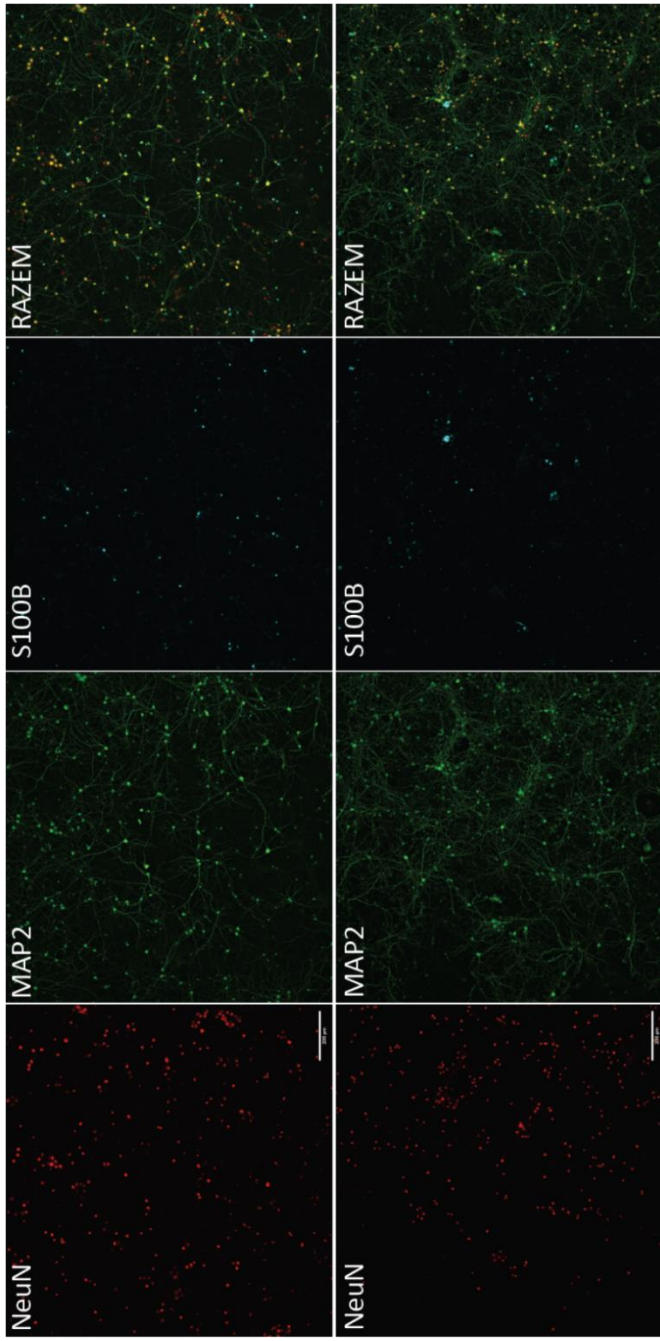
Mysie, embrionalne, pierwotne komórki korykalne i hipokampalne, są postrzegane jako dobry model do badania mechanizmów wpływu długotrwale podniesionego poziomu CORT, na modulowanie morfologii kolców dendrytycznych. W warunkach adherentnej hodowli *in vitro*, neurony pierwotne z obu tych struktur mózgowia, nie tylko rozwijają pobudzające połączenia synaptyczne ulokowane na kolcach dendrytycznych, ale również wykazują ekspresję szeregu białek związanych z odpowiedzią na CORT, a także z plastycznością synaptyczną (Kaech & Banker, 2006; Tanokashira i in., 2012).

W związku z wieloma protokołami izolacji oraz hodowli pierwotnych komórek mózgowia, w pierwszym etapie badań, wykorzystując barwienia immunofluorescencyjne, w 18 dniu rozwoju (18 DIV), scharakteryzowano mysie, korykalne oraz hipokampalne hodowle pierwotne, pod kątem ekspresji wybranych markerów, których obecność świadczy o właściwym przebiegu procesu izolacji oraz rozwoju hodowli. Analiza wykazała, że zarówno w przypadku korykalnych jak i hipokampalnych hodowli komórkowych, dochodzi do ekspresji białka NeuN (ang. *Hexaribonucleotide Binding Protein-3*), będącego markerem dojrzałych komórek nerwowych (Ryc 4.1 A) (Sarnat i in., 1998). Co więcej, w obu typach hodowli pierwotnych, zaobserwowano ekspresję białka MAP2 (ang. *Microtubule-associated protein 2*), również będącego markerem dojrzałych neuronów, lecz nie tylko (Ryc 4.1 A) (Soltani i in., 2005). MAP2 bowiem, pojawia się także w komórkach progenitorowych i neuronach, które jeszcze nie osiągnęły dojrzałości, co czyni go białkiem użytecznym w kontekście śledzenia poprawności rozwoju hodowli (Rosser i in., 1997). Ostatnim z białek, które użyto w celu podstawowej charakterystyki hodowli pierwotnych, było białko S100B (ang. *S100 calcium binding protein B*), będące przede wszystkim markerem dojrzałych astrocytów (Raponi i in., 2007). I w tym przypadku, zarówno pierwotne hodowle korykalne jak i hipokampalne, wykazywały ekspresję białka S100B (Ryc 4.1 A). Jednakże, liczba komórek S100B pozytywnych w obu hodowlach, była zdecydowanie niższa niż komórek wykazujących obecność NeuN oraz MAP2, co świadczy o uzyskaniu hodowli pierwotnych z dominującą liczbą neuronów.

W związku z trudnościami technicznymi, związanymi z izolacją określonych struktur z mózgowia embrionów, w celu potwierdzenia uzyskania komórek specyficznych dla obszaru kory i hipokampa, sprawdzono poziom mRNA genów *SATB2* oraz *PROX1*. Zgodnie z literaturą przedmiotu, wyższy poziom transkrypcji genu *SATB2* (ang. *Special AT-rich sequence-binding protein 2*) znajduje się w komórkach

obszaru kory nowej, w porównaniu do komórek hipokampa (Britanova i in., 2008; Digilio i in., 2015). Analiza wyników własnych, wskazuje wyższy poziom mRNA genu *SATB2*, w korykalnych komórkach pierwotnych, co potwierdza dane literaturowe, a także fakt poprawnej izolacji regionu kory (Ryc 4.1 B). Z kolei białko PROX1 (ang. *Prospero-homeobox-1*), znajduje się przede wszystkim w komórkach zakrętu zębatego hipokampa, gdzie jego poziom jest znacznie wyższy niż w przypadku komórek obszaru kory (Iwano i in., 2012; Digilio i in., 2015). Uzyskane wyniki potwierdzają obserwacje literaturowe. W pierwotnych neuronach hipokampalnych, wykazano wyższy poziom mRNA genu *PROX1*, w porównaniu do pierwotnych komórek korykalnych (Ryc 4.1 C).

Wyniki wskazują, że wykorzystywany protokół izolacji mysich, embrionalnych, korykalnych oraz hipokampalnych komórek pierwotnych, pozwala na pozyskanie hodowli, w których dominują komórki neuronalne. W hodowlach występuje również niewielka liczba komórek, wykazujących ekspresję białka S100B, będących najprawdopodobniej dojrzałymi astrocytami. Ponadto, część z hodowanych komórek neuronalnych, w toku rozwoju nabywa dojrzałego charakteru, czego dowodzi obecność komórek z ekspresją białka NeuN. Finalnie, hodowane komórki pierwotne wykazują ekspresję genów kodujących białka specyficzne dla danego obszaru mózgowia.



Rycina 4.1: Charakterystyka hodowli pierwotnych komórek kortykalnych i hipokampalnych, pochodzących z mysich embrionów. (A) Przykładowe zdjęcia, przedstawiające barwienie immunofluorescencyjne, dojrzałych (18 DIV), kortykalnych oraz hipokampalnych hodowli pierwotnych, na białko NeuN (czerwony), białko MAP2 (zielony) oraz białko S100B (niebieski). Skala 20 μm . **(B)** Wykres przedstawiający względne poziomy mRNA genu *SATB2*, w dojrzałych (18 DIV), pierwotnych komórkach kortykalnych oraz hipokampalnych. Czarna kółka przedstawiają wyniki poszczególnych biologicznych replikatów. **(C)** Wykres przedstawiający średnie, względne poziomy mRNA genu *PROX1*, w dojrzałych (18 DIV), pierwotnych komórkach kortykalnych oraz hipokampalnych. Czarna kółka przedstawiają wyniki poszczególnych biologicznych replikatów.

4.2 Analiza stężenia CORT w medium hodowlanym oraz odpowiedź pierwotnych hodowli korykalnych i hipokampalnych na ekspozycję CORT, w aspekcie przeżywalności oraz sygnalizacji glikokortykoidowej

W kolejnym etapie, sprawdzono efektywność zastosowanego protokołu wymiany medium, którego celem było obniżenie stężenia CORT, znajdującego się w suplemencie B27. Ponadto, doświadczalnie określono wpływ 72-godzinnej inkubacji hodowli pierwotnych z różnymi stężeniami CORT, na przeżywalność komórek korykalnych i hipokampalnych. Miało to na celu wybranie takiego stężenia CORT, które nie działa cytotoksycznie. W dalszym etapie badań, postanowiono zweryfikować wpływ różnych stężeń CORT (z którymi hodowle pierwotne inkubowano przez 72 godziny), na regulację ekspresji kluczowych genów należących do szlaku glikokortykoidowego. W przypadku niniejszej rozprawy były to geny *FKBP5* oraz *NR3C1*. Gen *FKBP5* koduje białko FKBP51, którego rola polega na ograniczaniu dostępności CORT dla GR (Stechschulte & Sanchez, 2011). Zaś gen *NR3C1*, koduje białko GR, będące receptorem dla CORT. Procedury eksperymentalne stosowane przy hodowli pierwotnych komórek korykalnych oraz hipokampalnych i schemat wymian medium hodowlanego przedstawiono na Rycinie 4.2 A.

Zastosowany schemat wymiany medium hodowlanego, doprowadził do znacznej redukcji wyjściowego stężenia CORT w medium hodowlanym (redukcja z średnio 21.76 do 0.191 nmol/l), po ostatniej, czwartej wymianie medium, która miała miejsce na dzień przed rozpoczęciem procedury eksperymentalnej (Ryc 4.2 B).

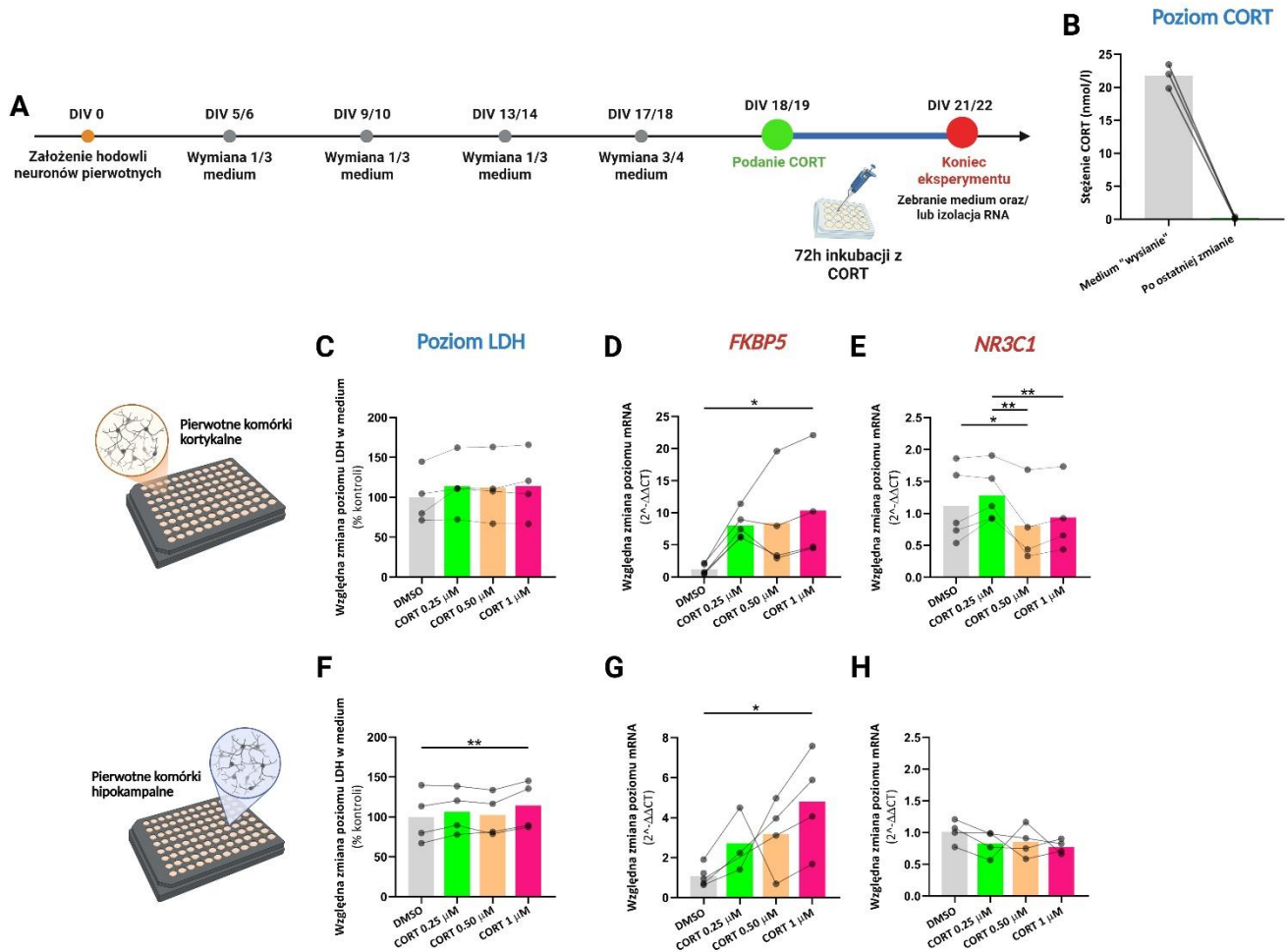
Przedstawiony schemat wymiany medium hodowlanego, prowadzący do znacznej redukcji poziomu CORT w medium hodowlanym, wykorzystano we wszystkich przeprowadzonych eksperymentach. Pierwszym z nich było oszacowanie wpływu różnych stężeń CORT, na przeżywalność korykalnych i hipokampalnych komórek pierwotnych, mierzone testem LDH. W przypadku komórek korykalnych, inkubacja hodowli z różnymi stężeniami CORT, nie wpłynęła na zmiany w poziomie LDH w medium hodowlanym (Ryc 4.2 C: Jednoczynnikowa RM ANOVA, $F_{(3,9)}=2.297$, $p=0.1463$). Jednakże, znaczące zmiany wykazano w przypadku hipokampalnych komórek pierwotnych (Ryc 4.2 F: Jednoczynnikowa RM ANOVA, $F_{(3,9)}=6.409$, $p=0.0130$). Inkubacja komórek hipokampalnych z najwyższym stężeniem CORT - 1 μM , powodowała wzrost poziomu LDH w medium, w porównaniu do grupy DMSO, co świadczy o prawdopodobnej dezintegracji błony komórkowej (test *post hoc* Dunnetta, $p=0.0070$ dla DMSO vs. CORT 1 μM). Natomiast różnic nie wykazano w przypadku grupy CORT 0.25 μM oraz grupy

CORT 0.50 μ M (test *post hoc* Dunnetta, $p=0.2112$ dla DMSO vs. CORT 0.25 μ M oraz $p=0.8194$ dla DMSO vs. CORT 0.50 μ M).

W kolejnych eksperymentach, analizowano wzorzec odpowiedzi korykalnych oraz hipokampalnych komórek pierwotnych, na działanie różnych stężeń CORT, w zakresie sygnalizacji glikokortykoidowej. W tym celu, zbadano względny poziom mRNA genów *FKBP5* oraz *NR3C1*. W przypadku genu *FKBP5* oraz komórek korykalnych, mimo ponad sześciokrotnego wzrostu poziomu mRNA, wywołanego inkubacją komórek pierwotnych z 0.25 μ M bądź 0.50 μ M CORT, nie wykazano istotnych statystycznie różnic w porównaniu do grupy DMSO (Ryc 4.2 D: REML, $F_{(3,10)}=5.180$, $p=0.0204$, test *post hoc* Tukeya, $p=0.0609$ dla DMSO vs. CORT 0.25 μ M oraz $p=0.0758$ dla DMSO vs. CORT 0.50 μ M). Obserwowane różnice znajdowały się jednak na granicy istotności statystycznej. Przeprowadzona analiza wykazała istotną różnicę między grupą DMSO, a grupą CORT 1 μ M (test *post hoc* Tukeya, $p=0.0226$ dla DMSO vs. CORT 1 μ M). Zgodnie z analizą, inkubacja komórek korykalnych z 1 μ M CORT, spowodowała ponad ośmiokrotny wzrost poziomu mRNA genu *FKBP5*, względem grupy kontrolnej (DMSO). Podobne efekty zaobserwowano w przypadku pierwotnych komórek hipokampalnych (Ryc 4.2 G: REML, $F_{(3,12)}=3.549$, $p=0.0479$). Ponad dwukrotna tendencja wzrostowa, którą wykazano dla grup CORT 0.25 μ M oraz CORT 0.50 μ M, nie wiązała się ze znaczącą statystycznie różnicą pomiędzy tymi grupami, a grupą DMSO (test *post hoc* Tukeya, $p=0.5799$ dla DMSO vs. CORT 0.25 μ M oraz $p=0.3105$ dla DMSO vs. CORT 0.50 μ M). Jedyna istotna różnica jaką zaobserwowano, dotyczyła grupy CORT 1 μ M i związana była z ponad czterokrotnym wzrostem mRNA genu *FKBP5* względem grupy kontrolnej (DMSO) (test *post hoc* Tukeya, $p=0.0317$ dla DMSO vs. CORT 1 μ M).

W przypadku genu *NR3C1*, analiza nie wykazała zmian jego ekspresji po inkubacji komórek korykalnych z 0.25 μ M CORT, w porównaniu do grupy DMSO (Ryc 4.2 E: REML, $F_{(3,10)}=11.04$, $p=0.0016$, test *post hoc* Tukeya, $p=0.4134$ dla DMSO vs. CORT 0.25 μ M). Jednakże, zaobserwowano spadek poziomu mRNA genu *NR3C1*, na skutek inkubacji komórek z 0.50 μ M CORT, ale nie 1 μ M CORT, w porównaniu do DMSO (test *post hoc* Tukeya, $p=0.0167$ dla DMSO vs. CORT 0.50 μ M oraz $p=0.1018$ dla DMSO vs. CORT 1 μ M). Dalsza analiza, wykazała statystycznie znamienne różnice, również pomiędzy grupą CORT 0.25 μ M, a grupami CORT 0.50 μ M i CORT 1 μ M. Inkubacja komórek korykalnych z 0.50 μ M i 1 μ M CORT doprowadziła do spadku poziomu mRNA genu *NR3C1* względem grupy CORT 0.25 μ M (test *post hoc* Tukeya, $p=0.0018$ dla CORT 0.25 μ M vs. CORT 0.50 μ M oraz $p=0.0098$ dla CORT 0.25 μ M vs. CORT 1 μ M). W przypadku pierwotnych komórek hipokampalnych,

nie zaobserwowano wpływu CORT na poziom mRNA genu *NR3C1* (Ryc 4.2 H: Jednoczynnikowa RM ANOVA, $F_{(3,9)}=1.050$, $p=0.4167$).



Rycina 4.2: Stężenie CORT w medium hodowlanym oraz odpowiedź pierwotnych komórek korykalnych i hipokampalnych, na różne stężenia CORT, w zakresie uwalniania LDH oraz ekspresji genów *FKBP5* i *NR3C1*.

(A) Schemat doświadczenia, obejmujący punkty czasowe wymienianego medium, a także rozpoczęcie i zakończenie procedury eksperymentalnej, wraz z informacją o materiale pobieranym do dalszych analiz. (B) Wykres przedstawiający średnie stężenie CORT w medium hodowlanym, w momencie wysiania komórek oraz po ostatniej wymianie medium. (C) Względna zmiana poziomu LDH w medium, po inkubacji pierwotnych komórek korykalnych oraz (F) hipokampalnych, z różnymi stężeniami CORT. (D) Względną zmianę poziomu mRNA genu *FKBP5* oraz (E) *NR3C1*, na skutek inkubacji pierwotnych komórek korykalnych z różnymi stężeniami CORT. (G) Względną zmianę poziomu mRNA genu *FKBP5* oraz (H) *NR3C1*, na skutek inkubacji pierwotnych komórek hipokampalnych z różnymi stężeniami CORT. Słupki na wykresach przedstawiają średnią. Czarne kółka przedstawiają wyniki dla poszczególnych biologicznych replikatów. Linie łączą dane pochodzące z tego samego biologicznego replikatu. Wyniki uzyskano z co najmniej trzech niezależnych biologicznych replikatów. Dane analizowane jednoczynnikową RM ANOVĄ bądź REML, W przypadku uzyskania istotności statystycznej w teście ANOVA lub REML, testem post hoc Tukeya. Na wykresach znajdują się istotności statystyczne z testu post hoc * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

4.3 Ocena wpływu inkubacji pierwotnych hodowli korykalnych i hipokampalnych z różnymi stężeniami CORT na ogólną morfologię neuronów

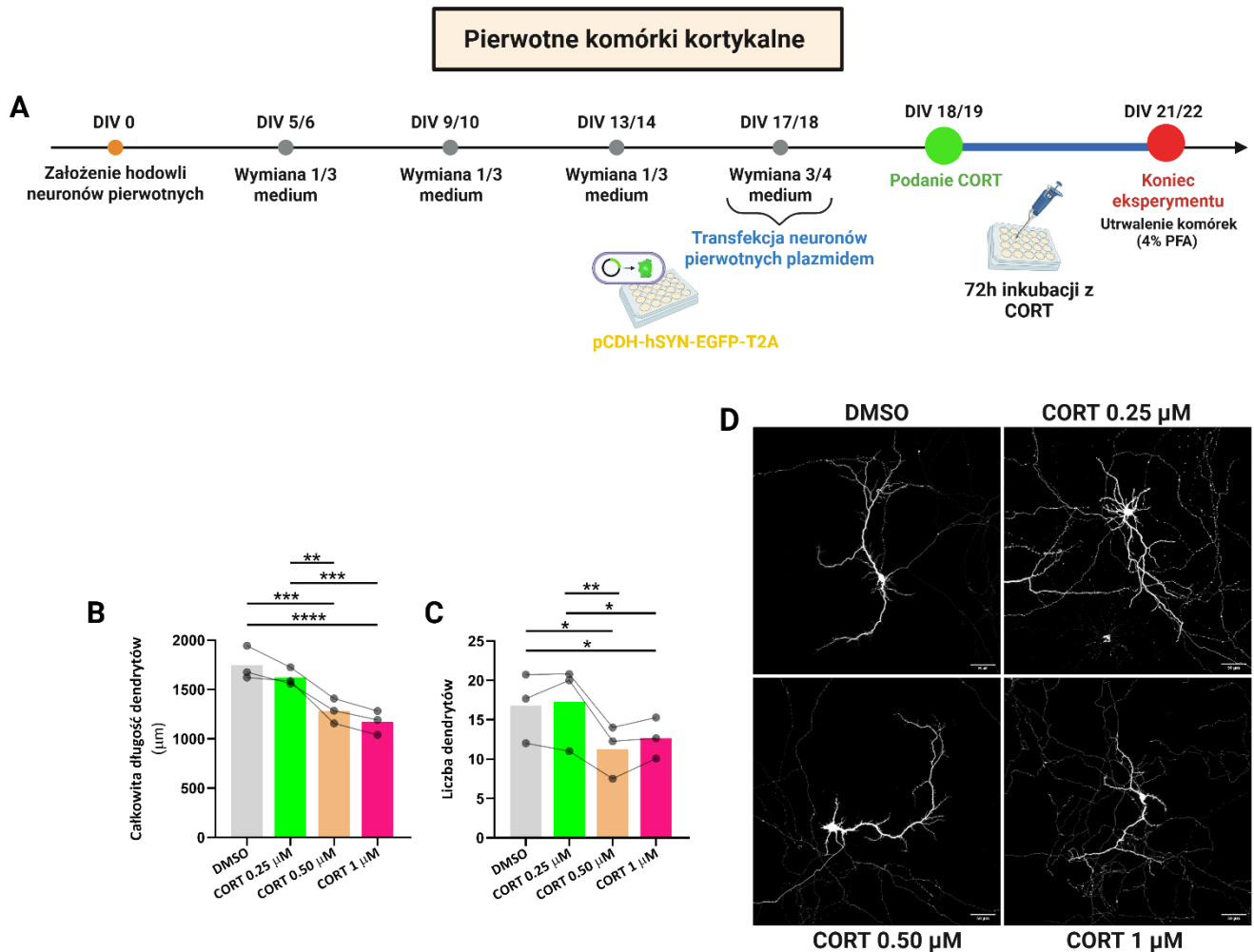
W celu scharakteryzowania wpływu CORT stosowanego w różnych stężeniach przez 72 godziny, na ogólną morfologię neuronów pierwotnych oraz w celu zidentyfikowania stężenia CORT, nie wpływającego na morfologię komórek, zbadano wpływ CORT na całkowitą długość dendrytów oraz liczbę dendrytów dojrzałych (DIV 18-21), pierwotnych neuronów korykalnych i hipokampalnych. Procedury eksperymentalne stosowane przy hodowli pierwotnych komórek korykalnych oraz hipokampalnych, znajdują się na przedstawionym schemacie (Rycina 4.3 A, 4.4 A).

4.3.1 Analiza korykalnych neuronów pierwotnych – ogólna morfologia neuronów

Stwierdzono brak różnic w całkowitej długości dendrytów, pomiędzy grupą DMSO, a grupą CORT 0.25 μM (Ryc 4.3 B: jednoczynnikowa RM ANOVA, $F_{(3,6)}=74.81$, $p<0.0001$, test *post hoc* Tukeya, $p=0.1143$ dla DMSO vs. CORT 0.25 μM). Jednakże, zaobserwowano spadek całkowitej długości dendrytów, w wyniku działania CORT w stężeniu 0.50 μM , w porównaniu do grupy DMSO (*post hoc* Tukeya, $p=0.0002$ dla DMSO vs. CORT 0.50 μM) oraz grupy CORT 0.25 μM (*post hoc* Tukeya, $p=0.0011$ dla CORT 0.50 μM vs. CORT 0.25 μM). Podobny spadek w zakresie całkowitej długości dendrytów, wykazano po zastosowaniu 1 μM CORT, zarówno w porównaniu do grupy DMSO (*post hoc* Tukeya, $p<0.0001$ dla DMSO vs. CORT 1 μM) jak i grupy CORT 0.25 μM (*post hoc* Tukeya, $p=0.0002$ dla CORT 1 μM vs. CORT 0.25 μM).

Analogicznie do parametru całkowitej długości dendrytów, inkubacja neuronów korykalnych z najniższym stężeniem CORT - 0.25 μM , nie doprowadziła do spadku liczby dendrytów (Ryc 4.3 C: jednoczynnikowa RM ANOVA, $F_{(3,6)}=12.92$, $p=0.0050$, test *post hoc* Tukeya, $p=0.9779$ dla DMSO vs. CORT 0.25 μM). Wykazano natomiast, spadek liczby dendrytów w grupie CORT 0.50 μM oraz CORT 1 μM , zarówno względem grupy DMSO (test *post hoc* Tukeya, $p=0.0129$ dla DMSO vs. CORT 0.50 μM oraz $p=0.0470$ dla DMSO vs. CORT 1 μM) jak i grupy CORT 0.25 μM (test *post hoc* Tukeya, $p=0.0088$ dla CORT 0.50 μM vs. CORT 0.25 μM oraz $p=0.0303$ dla CORT 1 μM vs. CORT 0.25 μM).

Powyższe dane wskazują, że inkubacja korykalnych neuronów pierwotnych z 0.25 μM CORT przez 72 godziny, w przeciwieństwie do 72-godzinnej inkubacji z wyższymi stężeniami CORT, nie powoduje spadku całkowitej długości dendrytów oraz liczby dendrytów.



Rycina 4.3: Zmiany morfologiczne korykalnych neuronów pierwotnych, wywołane na skutek inkubacji hodowli pierwotnych z różnymi stężeniami CORT przez 72 godziny.

(A) Schemat doświadczenia, zawierający informację o punkcie czasowym, w którym przeprowadzono procedurę transfekcji komórek pierwotnych, plazmidem z sekwencją kodującą białko fluorescencyjne, a także, informację o momencie rozpoczęcia i zakończenia procedury eksperymentalnej. (B) Rezultaty analizy całkowitej długości dendrytów oraz (C) liczby dendrytów, korykalnych neuronów pierwotnych, które były inkubowane z różnymi stężeniami CORT przez 72 godziny. (D) Reprezentatywne zdjęcia neuronów pierwotnych, których parametry morfologiczne w największym stopniu odzwierciedlają średnie obserwowane na wykresach. Słupki na wykresach przedstawiają średnią. Czarne kółka przedstawiają wyniki dla poszczególnych biologicznych replikatów. Linie łączą dane pochodzące z tego samego biologicznego replikatu. Wyniki uzyskano z co najmniej trzech niezależnych, biologicznych replikatów. Liczba przeanalizowanych neuronów na grupę – $N_{DMSO}=49$, $N_{CORT\ 0.25\ \mu M}=47$, $N_{CORT\ 0.50\ \mu M}=49$, $N_{CORT\ 1\ \mu M}=53$. Skala 50 μm . Dane analizowane jednoczynnikową RM ANOVA. W przypadku uzyskania istotności statystycznej w teście ANOVA, testem post hoc Tukeya. Na wykresach znajdują się istotności statystyczne z testu post hoc, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$

4.3.2 Analiza hipokampalnych neuronów pierwotnych – ogólna morfologia neuronów

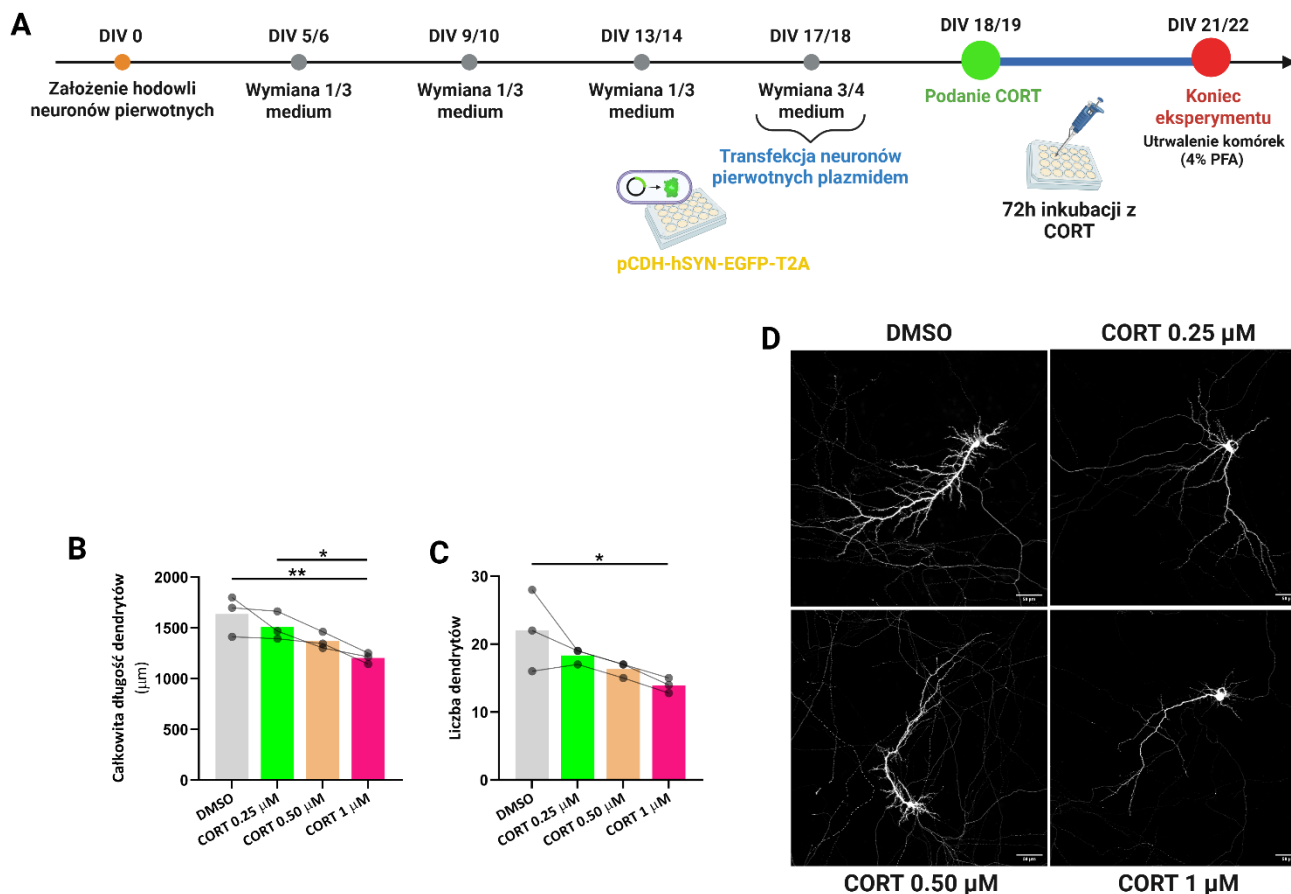
Inkubacja hipokampalnych neuronów pierwotnych z 0.25 μM CORT, nie doprowadziła do spadku przeciętnej, całkowitej długości dendrytów (Ryc 4.4 B: jednoczynnikowa RM ANOVA, $F_{(3,6)}=10.11$, $p=0.0092$, test *post hoc* Tukeya, $p=0.4699$ dla DMSO vs. CORT 0.25 μM). Podobnie, nie wykazano różnic

pomiędzy grupą DMSO, a grupą CORT 0.50 μM (test *post hoc* Tukeya, $p=0.0660$ dla DMSO vs. CORT 0.50 μM). Jedyne inkubacja z najwyższym zastosowanym stężeniem CORT - 1 μM , skutkowała spadkiem całkowitej długości dendrytów, zarówno względem grupy DMSO (test *post hoc* Tukeya, $p=0.0078$ dla DMSO vs. CORT 1 μM) jak i grupy CORT 0.25 μM (test *post hoc* Tukeya, $p=0.0385$, dla CORT 1 μM vs. CORT 0.25 μM).

Oceniając przeciętną liczbę dendrytów hipokampalnych neuronów pierwotnych, również nie wykazano różnic pomiędzy grupą kontrolną - DMSO, a grupami CORT 0.25 μM (Ryc 4.4 C: jednoczynnikowa RM ANOVA, $F_{(3,6)}=5.572$, $p=0.0361$, test *post hoc* Tukeya, $p=0.3604$ dla DMSO vs. CORT 0.25 μM) i 0.50 μM (test *post hoc* Tukeya, $p=0.1132$ dla DMSO vs. CORT 0.50 μM). Jedyne zaobserwowana różnica, dotyczyła spadku przeciętnej liczby dendrytów, w wyniku zastosowania 1 μM stężenia CORT, w porównaniu do grupy DMSO (test *post hoc* Tukeya, $p=0.0290$ dla DMSO vs. CORT 1 μM).

Podsumowując, podobnie jak w przypadku morfologii pierwotnych neuronów korykalnych, nie obserwowano spadku w zakresie całkowitej długości dendrytów oraz liczby dendrytów po inkubacji hipokampalnych neuronów pierwotnych z 0.25 μM CORT przez 72 godziny.

Pierwotne komórki hipokampalne



Rycina 4.4: Zmiany morfologiczne hipokampalnych neuronów pierwotnych, wywołane na skutek inkubacji hodowli pierwotnych z różnymi stężeniami CORT przez 72 godziny.

(A) Schemat doświadczenia, zawierający informację o punkcie czasowym, w którym przeprowadzono procedurę transfekcji komórek pierwotnych, plazmidem z sekwencją kodującą białko fluorescencyjne, a także, informację o momencie rozpoczęcia i zakończenia procedury eksperymentalnej. (B) Rezultaty analizy całkowitej długości dendrytów oraz (C) liczby dendrytów, hipokampalnych neuronów pierwotnych, które były inkubowane z różnymi stężeniami CORT przez 72 godziny. (D) Reprezentatywne zdjęcia neuronów pierwotnych, których parametry morfologiczne w największym stopniu odzwierciedlają średnie obserwowane na wykresach. Słupki na wykresach przedstawiają średnią. Czarne kółka przedstawiają przeciętne wyniki dla poszczególnych biologicznych replikatów. Linie łączą dane pochodzące z tego samego biologicznego replikatu. Wyniki uzyskano z co najmniej trzech niezależnych, biologicznych replikatów. Liczba przeanalizowanych neuronów na grupę – $N_{DMSO}=34$, $N_{CORT\ 0.25\ \mu M}=40$, $N_{CORT\ 0.50\ \mu M}=38$, $N_{CORT\ 1\ \mu M}=32$. Skala 50 μm . Dane analizowane jednoczynnikową RM ANOVA. W przypadku uzyskania istotności statystycznej w teście ANOVA, testem post hoc Tukeya. Na wykresach znajdują się istotności statystyczne z testu post hoc, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$

4.4 Indukowanie zmian morfologicznych kolców dendrytycznych, kortykalnych i hipokampalnych neuronów pierwotnych, poprzez inkubację z różnymi stężeniami CORT oraz charakterystyka wywołanych zmian

W celu zidentyfikowania stężenia CORT, które wywołuje zmiany strukturalne kolców dendrytycznych, pierwotnych neuronów kortykalnych oraz hipokampalnych, a także, w celu scharakteryzowania wywołanych zmian, zbadano wpływ różnych stężeń CORT, na wybrane parametry morfologii kolców dendrytycznych oraz na ich gęstość. Analizę przeprowadzono po 72-godzinnej inkubacji hodowli pierwotnych z różnymi stężeniami CORT. Procedury eksperymentalne stosowane przy hodowli pierwotnych komórek kortykalnych oraz hipokampalnych, znajdują się na schemacie przedstawionym na rycinach 4.5 A i 4.6 A.

4.4.1 Analiza kortykalnych neuronów pierwotnych – gęstość i morfologia kolców dendrytycznych

Wykazano ponad 15% spadek gęstości kolców dendrytycznych, po stymulacji hodowli kortykalnych, każdym z zastosowanych stężeń CORT (Ryc 4.5 B: jednoczynnikowa RM ANOVA, $F_{(3,6)}=6.162$, $p=0.0291$). Jednakże, istotną statystycznie różnicę pomiędzy poszczególnymi grupami eksperymentalnymi, osiągnięto jedynie za sprawą najwyższego stężenia CORT (1 μM), które spowodowało 32% spadek gęstości kolców dendrytycznych, względem grupy DMSO (test *post hoc* Tukeya, $p=0.0261$ dla DMSO vs. CORT 1 μM).

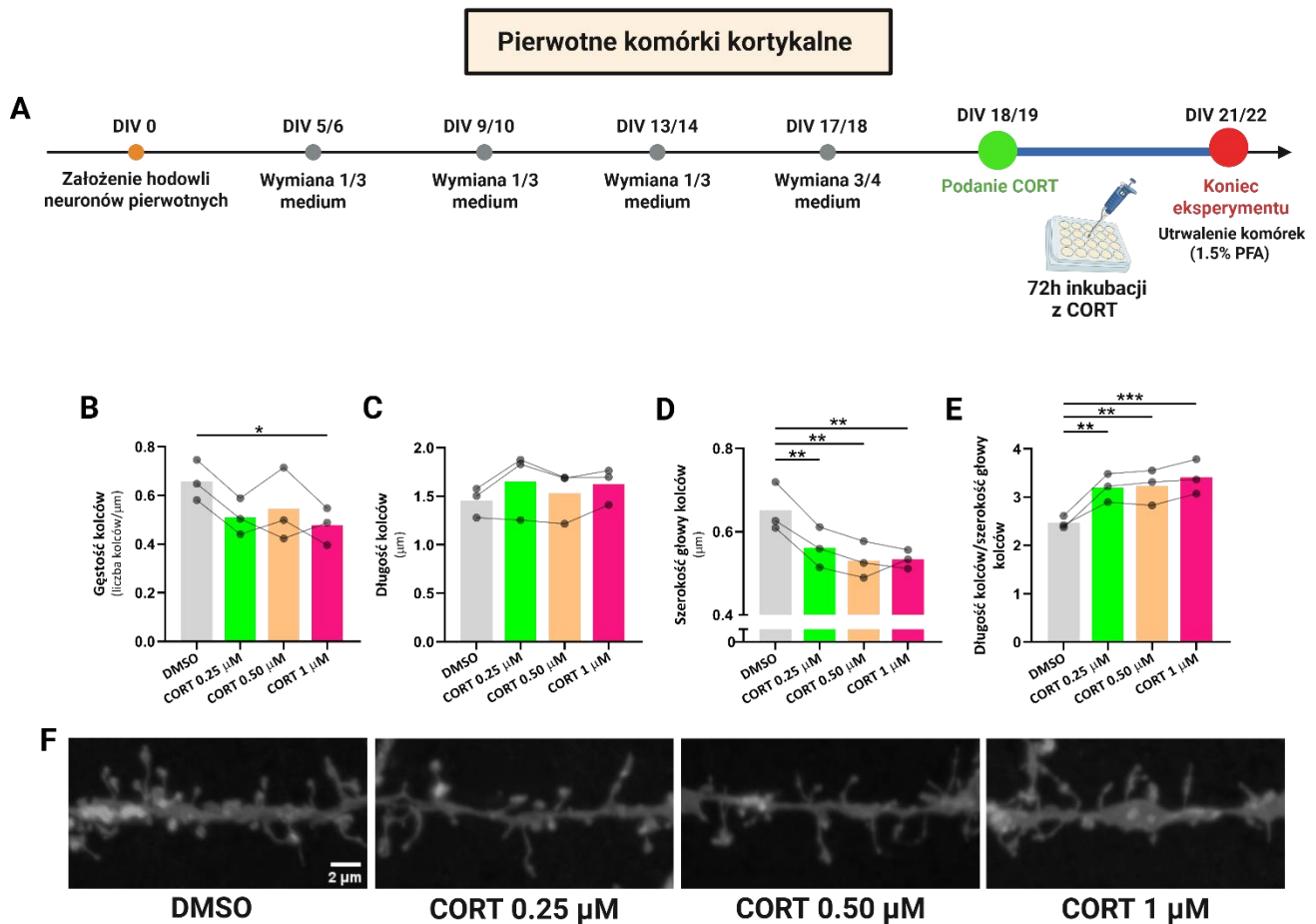
Kolejnym z analizowanych parametrów była długość kolców dendrytycznych. Mimo tendencji wzrostowej, zaobserwowanej na skutek oddziaływania 0.25 μM i 1 μM CORT, nie wykazano różnic pomiędzy grupą kontrolną, a grupami eksperymentalnymi, w zakresie tego parametru (Ryc 4.5 C: jednoczynnikowa RM ANOVA, $F_{(3,6)}=2.884$, $p=0.1248$).

Istotne statystycznie różnice wykazano w parametrze dotyczącym szerokości głów kolców (Ryc 4.5 D: jednoczynnikowa RM ANOVA, $F_{(3,6)}=19.85$, $p=0.0016$). Stymulacja każdym z wykorzystanych stężeń CORT, doprowadziła do spadku przeciętnej szerokości głów kolców, w porównaniu do grupy DMSO (test *post hoc* Tukeya, $p=0.0096$ dla DMSO vs. CORT 0.25 μM , $p=0.0021$ dla DMSO vs. CORT 0.50 μM oraz $p=0.0024$ dla DMSO vs. CORT 1 μM).

Ostatnim z analizowanych parametrów morfologii kolców dendrytycznych, był stosunek długości kolców do szerokości ich głów. Efekty zaobserwowano po inkubacji pierwotnych neuronów kortykalnych, z każdym z zastosowanych stężeń CORT (Ryc 4.5 E: jednoczynnikowa RM ANOVA, $F_{(3,6)}=25.96$, $p=0.0008$). Zarówno 0.25 μM CORT (test *post hoc* Tukeya, $p=0.0029$ dla DMSO vs. CORT

0.25 μM), 0.50 μM CORT (test *post hoc* Tukeya, $p=0.0024$ dla DMSO vs. CORT 0.50 μM) jak i 1 μM CORT (test *post hoc* Tukeya, $p=0.0008$ dla DMSO vs. CORT 1 μM), doprowadziły do wzrostu w stosunku długości kolców do szerokości ich głów, w porównaniu do grupy DMSO.

Powyższe rezultaty wskazują, że długotrwała inkubacja pierwotnych neuronów korykalnych, z wybranymi stężeniami CORT, wpływała na mierzone parametry morfologii kolców dendrytycznych. Efekty uzyskane po każdym z wykorzystywanych stężeń CORT były podobne, za wyjątkiem wpływu na gęstość kolców dendrytycznych. Parametru, w przypadku którego jedynie 1 μM stężenie CORT skutkowało znaczącymi statystycznie efektami. Zaobserwowane efekty, związane z morfologią kolców dendrytycznych i będące skutkiem 72-godzinnej inkubacji korykalnych neuronów pierwotnych z CORT, dotyczyły spadku szerokości głów kolców oraz wzrostu w stosunku długości kolców do szerokości ich głów. Obie zmiany sugerują spadek stabilności połączeń synaptycznych.



Rycina 4.5: Zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych korykalnych neuronów pierwotnych, wywołane przez różne stężenia CORT, w następstwie 72-godzinnej ekspozycji.

(A) Schemat doświadczenia, zawierający informację o momencie rozpoczęcia i zakończenia procedury eksperymentalnej, a także informację o sposobie utrwalenia hodowli pierwotnych. Rezultaty analizy ilościowej wybranych parametrów morfologii kolców dendrytycznych, w tym: (B) gęstości kolców (C) długości kolców (D) szerokości głowy kolców oraz (E) stosunku długości do szerokości głowy kolców, neuronów korykalnych, które były inkubowane z różnymi stężeniami CORT przez 72 godziny. (F) Reprezentatywne zdjęcia kolców dendrytycznych, których przeciętne parametry morfologiczne w największym stopniu odzwierciedlają średnie obserwowane na wykresach. Słupki na wykresach przedstawiają średnią. Czarne kółka przedstawiają przeciętne wyniki dla poszczególnych biologicznych replikatów. Linie łączą dane pochodzące z tego samego biologicznego replikatu. Wyniki uzyskano z co najmniej trzech niezależnych, biologicznych replikatów. Liczba przeanalizowanych dendrytów na grupę – $N_{\text{DMSO}}=38$, $N_{\text{CORT } 0.25 \mu\text{M}}=36$, $N_{\text{CORT } 0.50 \mu\text{M}}=33$, $N_{\text{CORT } 1 \mu\text{M}}=33$. Skala 2 μm . Dane analizowane jednoczynnikową RM ANOVA. W przypadku uzyskania istotności statystycznej w teście ANOVA, testem post hoc Tukeya. Na wykresach znajdują się istotności statystyczne z testu post hoc, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$

4.4.2 Analiza hipokampalnych neuronów pierwotnych – gęstość i morfologia kolców dendrytycznych

W przypadku kolców dendrytycznych hipokampalnych neuronów pierwotnych, analiza wykazała zmniejszenie gęstości kolców dendrytycznych, na skutek działania CORT (Ryc 4.6 B: jednoczynnikowa RM ANOVA, $F_{(3,6)}=4.970$, $p=0.0457$). Jednakże, nie zaobserwowano różnic pomiędzy grupą kontrolną, a grupami eksperymentalnymi, a także pomiędzy poszczególnymi grupami eksperymentalnymi, w bezpośrednich porównaniach grup (test *post hoc* Tukeya, $p>0.05$).

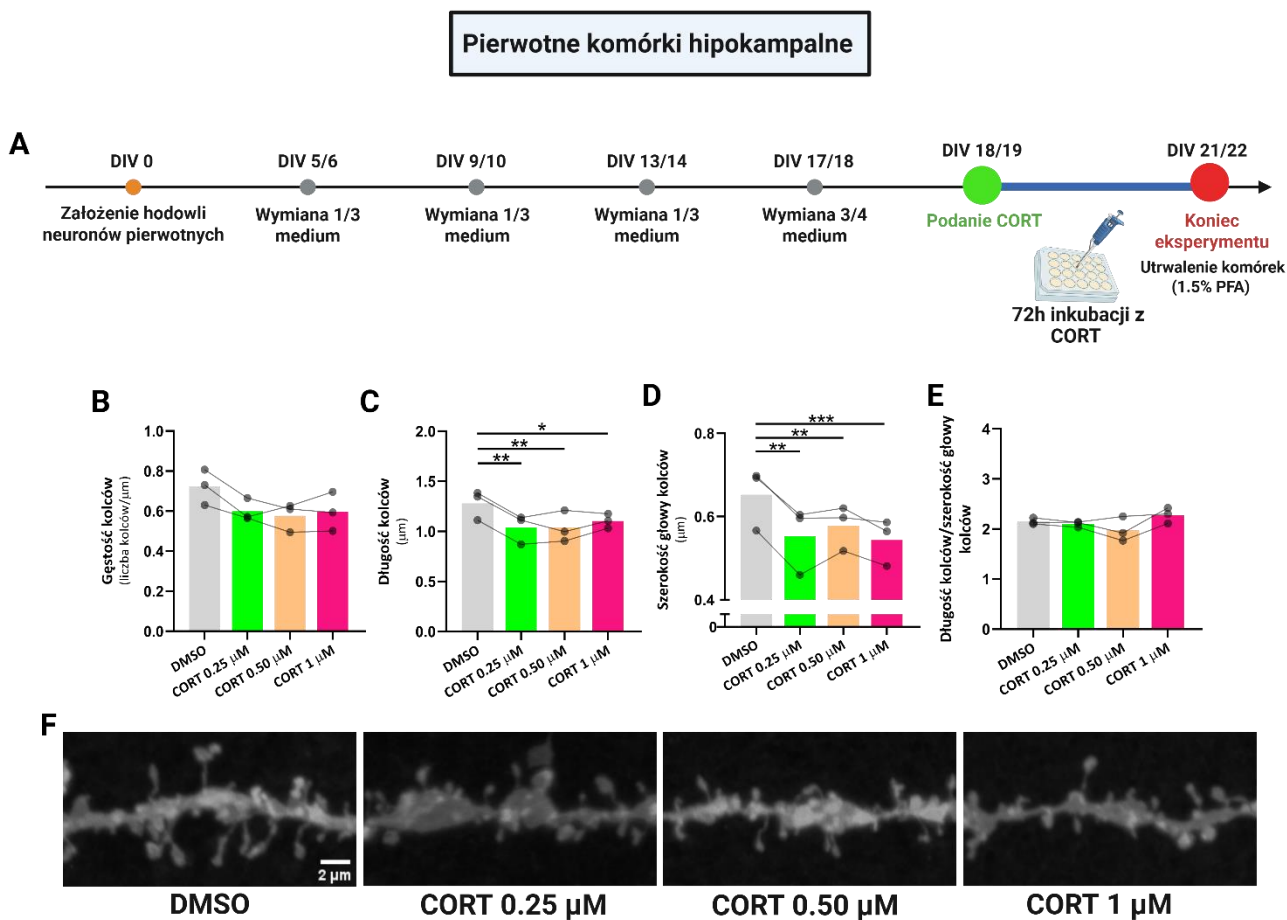
Inkubacja neuronów pierwotnych z wybranymi stężeniami CORT, doprowadziła do zmian w przeciętnej długości kolców dendrytycznych (Ryc 4.6 C: jednoczynnikowa RM ANOVA, $F_{(3,6)}=11.42$, $p=0.0068$). Zarówno najniższe wykorzystane stężenie CORT – 0.25 μM (test *post hoc* Tukeya, $p=0.0094$ dla DMSO vs. CORT 0.25 μM) jak i stężenia wyższe - 0.50 μM (test *post hoc* Tukeya, $p=0.0090$ dla DMSO vs. CORT 0.50 μM) oraz 1 μM (test *post hoc* Tukeya, $p=0.0391$ dla DMSO vs. CORT 1 μM), skutkowały spadkiem długości kolców dendrytycznych, względem grupy kontrolnej (DMSO).

Analogiczne efekty do tych związanych ze spadkiem długości kolców dendrytycznych, zaobserwowano w przypadku szerokości głów kolców (Ryc 4.6 D: jednoczynnikowa RM ANOVA, $F_{(3,6)}=24.77$, $p=0.0009$). Każde z zastosowanych stężeń CORT, doprowadziło do spadku szerokości głów kolców dendrytycznych, w porównaniu do grupy DMSO (test *post hoc* Tukeya, $p=0.0016$ dla DMSO vs. CORT 0.25 μM oraz $p=0.0073$ dla DMSO vs. CORT 0.50 μM). Jednakże, inaczej niż w przypadku przeciętnej długości kolców dendrytycznych, najsilniejszy efekt zaobserwowano po zastosowaniu najwyższego stężenia CORT – 1 μM (test *post hoc* Tukeya, $p=0.0010$ dla DMSO vs. CORT 1 μM).

Ostatecznie, żadne ze stężeń CORT nie wpłynęło na bezskalowy parametr, którym jest stosunek długości kolców do szerokości ich głów (Ryc 4.6 E: jednoczynnikowa RM ANOVA, $F_{(3,6)}=2.953$, $p=0.1201$).

Powyższe wyniki, wskazują, że tak jak w przypadku pierwotnych neuronów korykalnych, inkubacja komórek z CORT przez 72 godziny, wpływa na wybrane parametry morfologii kolców

dendrytycznych, pierwotnych neuronów hipokampalnych. Zaobserwowane rezultaty w zakresie długości kolców dendrytycznych, były inne niż w przypadku neuronów korykalnych. Inkubacja pierwotnych komórek hipokampalnych, z każdym ze stężeń CORT, skutkowała skróceniem, a nie wydłużeniem przeciętnej długości kolców dendrytycznych.



Rycina 4.6: Zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych hipokampalnych neuronów pierwotnych, wywołane przez różne stężenia CORT, w następstwie 72-godzinnej ekspozycji.

(A) Schemat doświadczenia, zawierający informację o momencie rozpoczęcia i zakończenia procedury eksperymentalnej, a także informację o sposobie utrwalenia hodowli pierwotnych. Rezultaty analizy ilościowej wybranych parametrów morfologii kolców dendrytycznych hipokampalnych neuronów pierwotnych, w tym: (B) gęstości kolców (C) długości kolców (D) szerokości głowy kolców oraz (E) stosunku długości do szerokości głowy kolców, które były inkubowane z różnymi stężeniami CORT przez 72 godziny. (F) Reprezentatywne zdjęcia kolców dendrytycznych, których przeciętne parametry morfologiczne w największym stopniu odzwierciedlają średnie obserwowane na wykresach. Słupki na wykresach przedstawiają średnią. Czarne kółka przedstawiają przeciętne wyniki dla poszczególnych biologicznych replikatów. Linie łączą dane pochodzące z tego samego biologicznego replikatu. Wyniki uzyskano z co najmniej trzech niezależnych, biologicznych replikatów. Liczba przeanalizowanych dendrytów na grupę – $N_{\text{DMSO}}=36$, $N_{\text{CORT } 0.25 \mu\text{M}}=39$, $N_{\text{CORT } 0.50 \mu\text{M}}=37$, $N_{\text{CORT } 1 \mu\text{M}}=38$. Skala 2 μm . Dane analizowane jednoczynnikową RM ANOVA. W przypadku uzyskania istotności statystycznej w teście ANOVA, testem post hoc Tukeya. Na wykresach znajdują się istotności statystyczne z testu post hoc, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$

4.5 Wpływ CORT na poziom białka PSD95 w dendrytach i kolcach dendrytycznych korykalnych i hipokampalnych neuronów pierwotnych

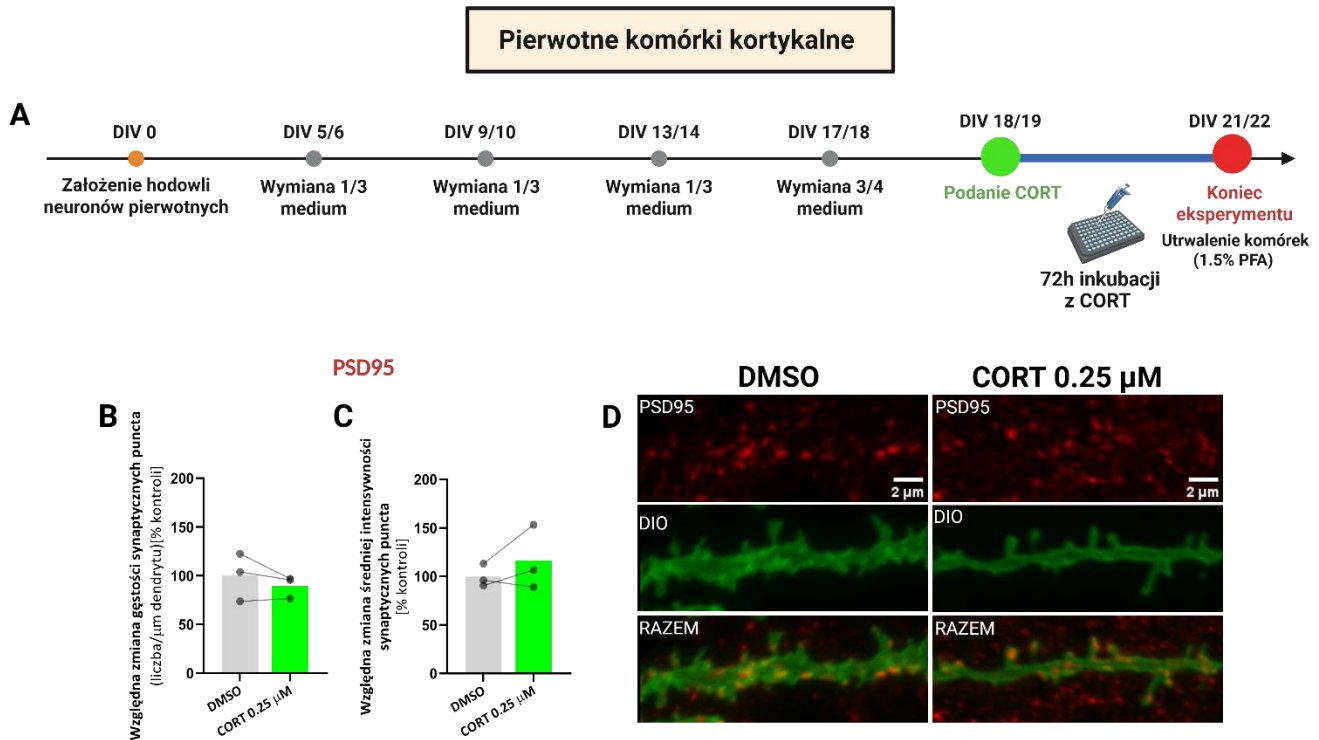
Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów, wykazano, że inkubacja hodowli pierwotnych z 0.25 μM CORT przez 72 godziny, nie wpływa negatywnie na przeżywalność komórek oraz nie powoduje zmian w ogólnej morfologii korykalnych oraz hipokampalnych neuronów pierwotnych. Jednocześnie, zaobserwowano, że 0.25 μM stężenie CORT, stosowane przez 72 godziny, wpływa na morfologię kolców dendrytycznych w sposób zbliżony, a momentami zbieżny z innymi, wyższymi stężeniami CORT. Tak więc, w związku z selektywnym wpływem 0.25 μM CORT na morfologię kolców dendrytycznych, a także z faktem, że 0.25 μM stężenie CORT, jest najbliższym stężeniem obserwowanych w mózgowiu w przypadku ekspozycji na nagły i chroniczny stres, w dalszych eksperymentach wykorzystywano wyłącznie 0.25 μM stężenie CORT, z którym inkubowano hodowle pierwotne przez 72 godziny (Tanokashira i in., 2012; Sze & Brunton, 2021).

W kolejnym eksperymencie, w związku z kluczową rolą kolców dendrytycznych w transmisji synaptycznej, sprawdzono w sposób pośredni, czy zmianom morfologicznym kolców dendrytycznych, towarzyszą zmiany w liczbie stabilnych synaps oraz potencjalnych nowych połączeń synaptycznych. Aby tego dokonać, zmierzono poziom białka PSD95, w dendrytach i kolcach dendrytycznych korykalnych oraz hipokampalnych neuronów pierwotnych. Poziom białko PSD95 pozytywnie koreluje z liczbą synaps, a jego pojawienie się może poprzedzać powstanie nowego połączenia synaptycznego (Prange & Murphy, 2001a; Nikonenko i in., 2008). Procedury eksperymentalne stosowane przy hodowli pierwotnych komórek korykalnych oraz hipokampalnych, znajdują się na schemacie przedstawionym na rycinach 4.7 A i 4.8 A.

4.5.1 Analiza korykalnych neuronów pierwotnych – analiza białka PSD95 w dendrytach i kolcach dendrytycznych

W przypadku korykalnych neuronów pierwotnych, nie zaobserwowano różnicy w gęstości punktów (ang. puncta) PSD95 w kolcach dendrytycznych i dendrytach, pomiędzy grupą DMSO, a grupą inkubowaną z 0.25 μM CORT (Ryc 4.7 B: sparowany test t-Studenta, $t=1.241$, $df=2$, $p=0.3405$). Podobnie, nie wykazano różnicy w średniej intensywności fluorescencji punktów PSD95 (Ryc 4.7 C: sparowany test t-Studenta, $t=1.197$, $df=2$, $p=0.3539$).

Pomimo obecności zmian w morfologii kolców dendrytycznych, wywołanych w następstwie 72-godzinnej inkubacji komórek pierwotnych z 0.25 μM CORT, nie wykazano zmian w poziomie białka PSD95 w kolcach dendrytycznych i dendrytach korykalnych neuronów pierwotnych.



Rycina 4.7: Gęstość i średnia intensywności fluorescencji punktów PSD95 w kolcach dendrytycznych i dendrytach korykalnych neuronów pierwotnych, inkubowanych z 0.25 μM CORT przez 72 godziny.

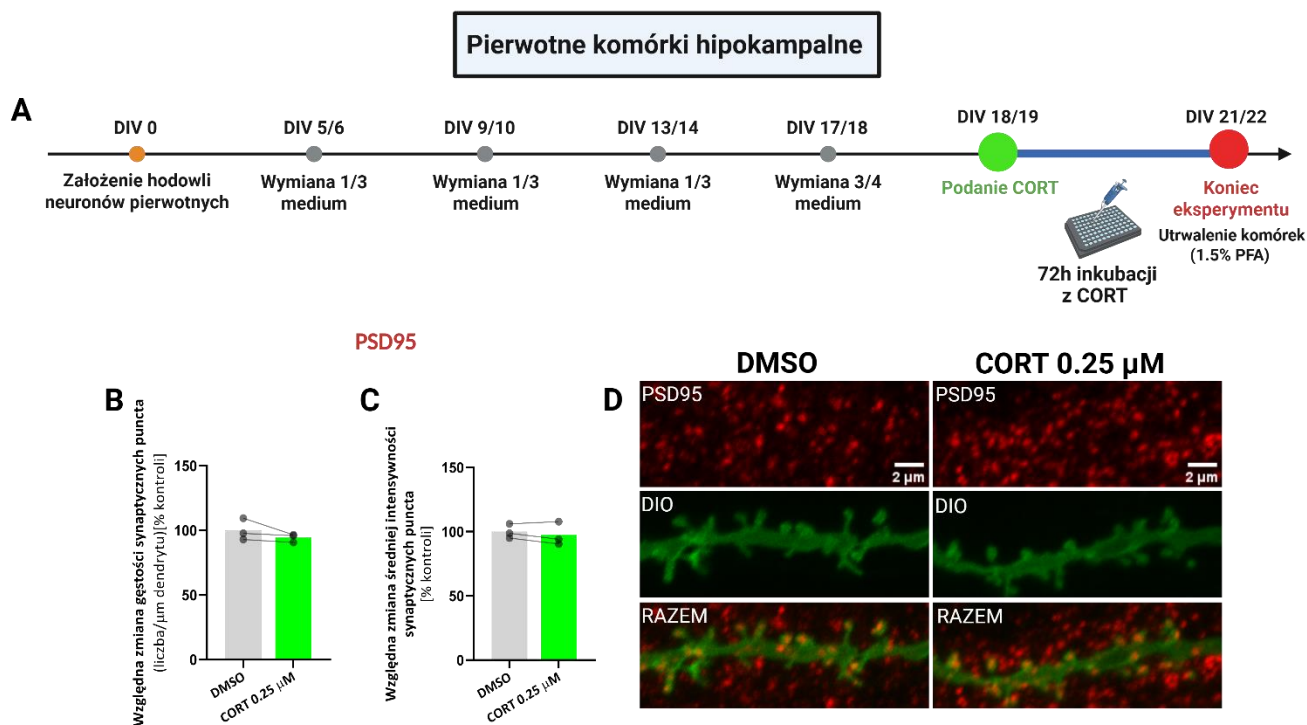
(A) Schemat doświadczenia, zawierający informację o momencie rozpoczęcia i zakończenia procedury eksperymentalnej, a także informację o sposobie utrwalenia hodowli pierwotnych. (B) Rezultaty analizy gęstości punktów PSD95, przedstawione jako % kontroli oraz (C) analizy średniej intensywności fluorescencji punktów PSD95, również wyrażone jako % kontroli, mierzone w dendrytach i kolcach dendrytycznych korykalnych neuronów pierwotnych. (D) Reprezentatywne zdjęcia, barwionych fluorescencyjnie punktów PSD95 (czerwony). Reprezentatywne obrazy zawierające kolce dendrytyczne i dendryty, w których określano poziom PSD95 (zielony) oraz kolokalizacja sygnału PSD95 z kolcami dendrytycznymi i dendrytem. Słupki na wykresach przedstawiają średnią. Czarne kółka przedstawiają przeciętne wyniki dla poszczególnych biologicznych replikatów. Linie łączą dane pochodzące z tego samego biologicznego replikatu. Wyniki uzyskano z co najmniej trzech niezależnych, biologicznych replikatów. Liczba przeanalizowanych dendrytów na grupę – $N_{\text{DMSO}}=31$, $N_{\text{CORT } 0.25 \mu\text{M}}=35$. Skala 2 μm . Dane analizowane testem t-Studenta dla prób zależnych.

4.5.2 Analiza hipokampalnych neuronów pierwotnych – analiza białka PSD95 w dendrytach i kolcach dendrytycznych

Analogicznie do wyników dotyczących korykalnych neuronów pierwotnych, również w przypadku pierwotnych komórek hipokampalnych, nie wykazano różnic w gęstości punktów PSD95 w kolcach dendrytycznych i dendrytach, pomiędzy grupą kontrolną (DMSO), a grupą CORT 0.25 μM (Ryc 4.8 B:

sparowany test t-Studenta, $t=1.538$, $df=2$, $p=0.2638$). Ponadto, efektów $0.25 \mu\text{M}$ CORT, nie zaobserwowano również w średniej intensywności fluorescencji punktów PSD95 (Ryc 4.8 C: sparowany test t-Studenta, $t=1.187$, $df=2$, $p=0.3573$).

Tak więc, także w przypadku pierwotnych neuronów hipokampalnych, mimo wcześniej obserwowanych zmian w strukturze kolców dendrytycznych, sugerujących potencjalne zmiany w liczbie bądź stabilności synaps, nie wykazano zmian w poziomie białka PSD95 w kolcach dendrytycznych i dendrytach neuronów pierwotnych, na skutek zastosowania $0.25 \mu\text{M}$ stężenia CORT przez 72 godziny.



Rycina 4.8: Gęstość i średnia intensywności fluorescencji punktów PSD95 w kolcach dendrytycznych i dendrytach hipokampalnych neuronów pierwotnych, inkubowanych z $0.25 \mu\text{M}$ CORT przez 72 godziny.

(A) Schemat doświadczenia, zawierający informację o momencie rozpoczęcia i zakończenia procedury eksperymentalnej, a także informację o sposobie utrwalenia hodowli pierwotnych. (B) Rezultaty analizy gęstości punktów PSD95, przedstawione jako % kontroli oraz (C) analizy średniej intensywności fluorescencji punktów PSD95, również wyrażone jako % kontroli, mierzone w dendrytach i kolcach dendrytycznych hipokampalnych neuronów pierwotnych. (D) Reprezentatywne zdjęcia, barwionych fluorescencyjnie punktów PSD95 (czerwony). Reprezentatywne obrazy zawierające kolce dendrytyczne i dendryty, w których określano poziom PSD95 (zielony) oraz kolokalizacja sygnału PSD95 z kolcami dendrytycznymi i dendrytem. Słupki na wykresach przedstawiają średnią. Czarne kółka przedstawiają przeciętne wyniki dla poszczególnych biologicznych replikatów. Linie łączą dane pochodzące z tego samego biologicznego replikatu. Wyniki uzyskano z co najmniej trzech niezależnych, biologicznych replikatów. Liczba przeanalizowanych dendrytów na grupę – $N_{\text{DMSO}}=38$, $N_{\text{CORT } 0.25 \mu\text{M}}=37$. Skala $2 \mu\text{m}$. Dane analizowane testem t-Studenta dla prób zależnych.

4.6 Ocena wpływu manipulacji aktywnością białka FAK na zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych kortykalnych i hipokampalnych neuronów pierwotnych, wywołane przez CORT

Aby zweryfikować udział białka FAK w zmianach morfologicznych kolców dendrytycznych pierwotnych neuronów kortykalnych i hipokampalnych, wywołanych przez długotrwałą inkubację z wysokim stężeniem CORT, wykorzystano inhibitor białka FAK – FAK inhibitor 14 (Y15) oraz aktywator białka FAK – ZINC40099027 (ZN27). Zarówno Y15 jak i ZN27, są cząsteczkami selektywnie działającymi na białko FAK. Y15 jest cząsteczką powodującą hamowanie autofosforylacji białka FAK, poprzez mechanizm niezwiązany z ATP. Y15 przyłącza się do specyficznego miejsca w domenie FERM i poprzez blokowanie dostępu do tyrozyny 397, uniemożliwia zajście procesu autofosforylacji (Golubovskaya i in., 2015; Hochwald i in., 2016; Wu i in., 2021). ZN27 z kolei, jest cząsteczką, która wiąże się do specyficznego dla białka FAK, fragmentu w domenie kinazowej, w pobliżu domeny FERM. Najprawdopodobniej, poprzez wiązanie w tym określonym miejscu, cząsteczka ZN27 uniemożliwia zajście procesu autohamowania, poprzez blokowanie możliwości przyjęcia przez białko konformacji zamkniętej, w której domena FERM przylega do domeny kinazowej i zasłania miejsce autofosforylacji. Tym sam, cząsteczka ZN27 stabilizuje białko FAK w konformacji otwartej i zwiększa prawdopodobieństwo zajścia autofosforylacji (Rashmi i in., 2021; Oncel i in., 2021; Q. Wang i in., 2023). W eksperymentach, w których badano udział białka FAK, wykorzystywano wyłącznie 0.25 μM stężenie CORT, z którym hodowle pierwotne inkubowano przez 72 godziny.

Komórki pierwotne hodowano oraz poddawano określonym procedurom eksperymentalnym, zgodnie ze schematem przedstawionym na rycinie 4.9 A i 4.10 A. Zarówno Y15, jak i ZN27, dodawano zaraz po dodaniu CORT.

4.6.1 Analiza kortykalnych neuronów pierwotnych – wpływ manipulacji aktywnością FAK na zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych, wywołane CORT

4.6.1.1 Zahamowanie aktywności białka FAK w hodowlach kortykalnych – Y15

Mimo tendencji spadkowej oscylującej w granicach kilkunastu procent, nie zaobserwowano wpływu 0.25 μM CORT, na gęstość kolców dendrytycznych pierwotnych neuronów kortykalnych. Podobnie, nie wykazano wpływu inhibitora Y15 na zmiany w zagęszczeniu kolców dendrytycznych. Ostatecznie, analiza gęstości kolców nie wykazała addytywnego efektu inhibitora Y15, dodanego do 0.25 μM CORT (Ryc 4.9 B: dwuczynnikowa RM ANOVA, traktowanie $F_{(1,3)}=4.663$, $p=0.1197$, modulator $F_{(1,3)}=5.773$, $p=0.0956$, traktowanie \times modulator $F_{(1,3)}=2.508$, $p=0.2114$).

Mimo zaobserwowanej tendencji wzrostowej w zakresie długości kolców dendrytycznych, nie wykazano znaczących zmian ani po inkubacji komórek z 0.25 μM CORT, ani w przypadku zastosowania inhibitora Y15. Co więcej, również połączenie inhibitora Y15 z 0.25 μM CORT, nie wpłynęło na długość kolców dendrytycznych (Ryc 4.9 C: dwuczynnikowa RM ANOVA, traktowanie $F_{(1,3)}=3.369$, $p=0.1638$, modulator $F_{(1,3)}=2.521$, $p=0.2105$, traktowanie \times modulator $F_{(1,3)}=0.3976$, $p=0.5731$).

Znaczące zmiany zaobserwowano w przypadku szerokości głów kolców (Ryc 4.9 D: dwuczynnikowa RM ANOVA, traktowanie $F_{(1,3)}=22.85$, $p=0.0174$, modulator $F_{(1,3)}=8.278$, $p=0.0637$, traktowanie \times modulator $F_{(1,3)}=11.36$ $p=0.0434$). Przeprowadzone eksperymenty potwierdziły wyniki uzyskane w poprzednich próbach, mianowicie, analiza wykazała spadek szerokości głów kolców dendrytycznych, w wyniku inkubacji komórek z 0.25 μM CORT, w porównaniu do grupy DMSO (test *post hoc* Tukeya, $p=0.0471$ dla DMSO vs. CORT 0.25 μM). Inkubacja neuronów pierwotnych z inhibitorem Y15, również skutkowała spadkiem szerokości głów kolców względem grupy DMSO, a wielkość efektu wynikająca z zastosowania inhibitora Y15, okazała się zbliżona do efektów 0.25 μM CORT (test *post hoc* Tukeya, $p=0.0343$ dla DMSO vs. DMSO+Y15). Jednoczesna inkubacja komórek pierwotnych z inhibitorem Y15 oraz 0.25 μM CORT, także doprowadziła do spadku przeciętnej szerokości głów kolców, w porównaniu do grupy DMSO (test *post hoc* Tukeya, $p=0.0316$ dla DMSO vs. CORT 0.25 μM +Y15). Wielkość efektu wspólnego oddziaływania inhibitora Y15 z 0.25 μM CORT na neurony pierwotne, nie różniła się od efektów uzyskanych po zastosowaniu każdego tego oddziaływania z osobna.

Ostatnim z analizowanych parametrów morfologii kolców dendrytycznych, był stosunek długości kolców do szerokości ich głów. Również w przypadku tego parametru, wykazano efekt oddziaływania eksperymentalnego (Ryc 4.9 E: dwuczynnikowa RM ANOVA, traktowanie $F_{(1,3)}=10.49$, $p=0.0479$, modulator $F_{(1,3)}=12.69$, $p=0.0378$, traktowanie \times modulator $F_{(1,3)}=11.62$ $p=0.0422$). Znaczący wzrost w stosunku długości kolców do szerokości ich głów, w porównaniu do grupy DMSO, uzyskano nie tylko po oddziaływaniu 0.25 μM CORT (test *post hoc* Tukeya, $p=0.0284$ dla DMSO vs. CORT 0.25 μM), ale także na skutek inkubacji komórek pierwotnych z inhibitorem Y15 (test *post hoc* Tukeya, $p=0.0181$ dla DMSO vs. DMSO+Y15) oraz za sprawą wspólnego podania inhibitora Y15 oraz 0.25 μM CORT (test *post hoc* Tukeya, $p=0.0119$ dla DMSO vs. CORT 0.25 μM +Y15). Jednak tak jak w przypadku szerokości głów kolców, bez efektu addytywnego wynikającego z wspólnego oddziaływania na neurony pierwotne.

Uzyskane dane, wskazują na tożsame wyniki pomiędzy grupą 0.25 μM CORT, a grupą z inhibitorem Y15 oraz grupą z inhibitorem Y15 oraz 0.25 μM CORT, w zakresie obserwowanych tendencji oraz

znaczących zmian morfologicznych, które obejmowały szerokość głów kolców oraz stosunek długości kolców do szerokości ich głów. Tak więc, zahamowanie aktywności białka FAK odtwarza zmiany morfologiczne obserwowane na skutek działania 0.25 μ M CORT.

4.6.1.2 Zwiększenie aktywności białka FAK w hodowlach kortykalnych – ZN27

Biorąc pod uwagę efekty zaobserwowane w eksperymentach, w których hamowano aktywność białka FAK, w kolejnym kroku, przeprowadzono badania mające na celu określenie wpływu aktywacji białka FAK, na zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych pierwotnych neuronów kortykalnych, wywołane 0.25 μ M CORT.

Analiza gęstości kolców dendrytycznych i tym razem wykazała brak efektów oddziaływania eksperymentalnego. Nie wykazano zmian w gęstości kolców na skutek działania 0.25 μ M CORT, chociaż obserwowane wyniki były na granicy istotności statystycznej. Również zastosowanie aktywatora ZN27 oraz wspólnych podań aktywatora ZN27 i 0.25 μ M CORT, nie wpłynęły na zagęszczenie kolców dendrytycznych (Ryc 4.9 G: dwuczynnikowa RM ANOVA, traktowanie $F_{(1,3)}=8.951$, $p=0.0580$, modulator $F_{(1,3)}=0.0028$, $p=0.9607$, traktowanie \times modulator $F_{(1,3)}=0.5639$, $p=0.5072$).

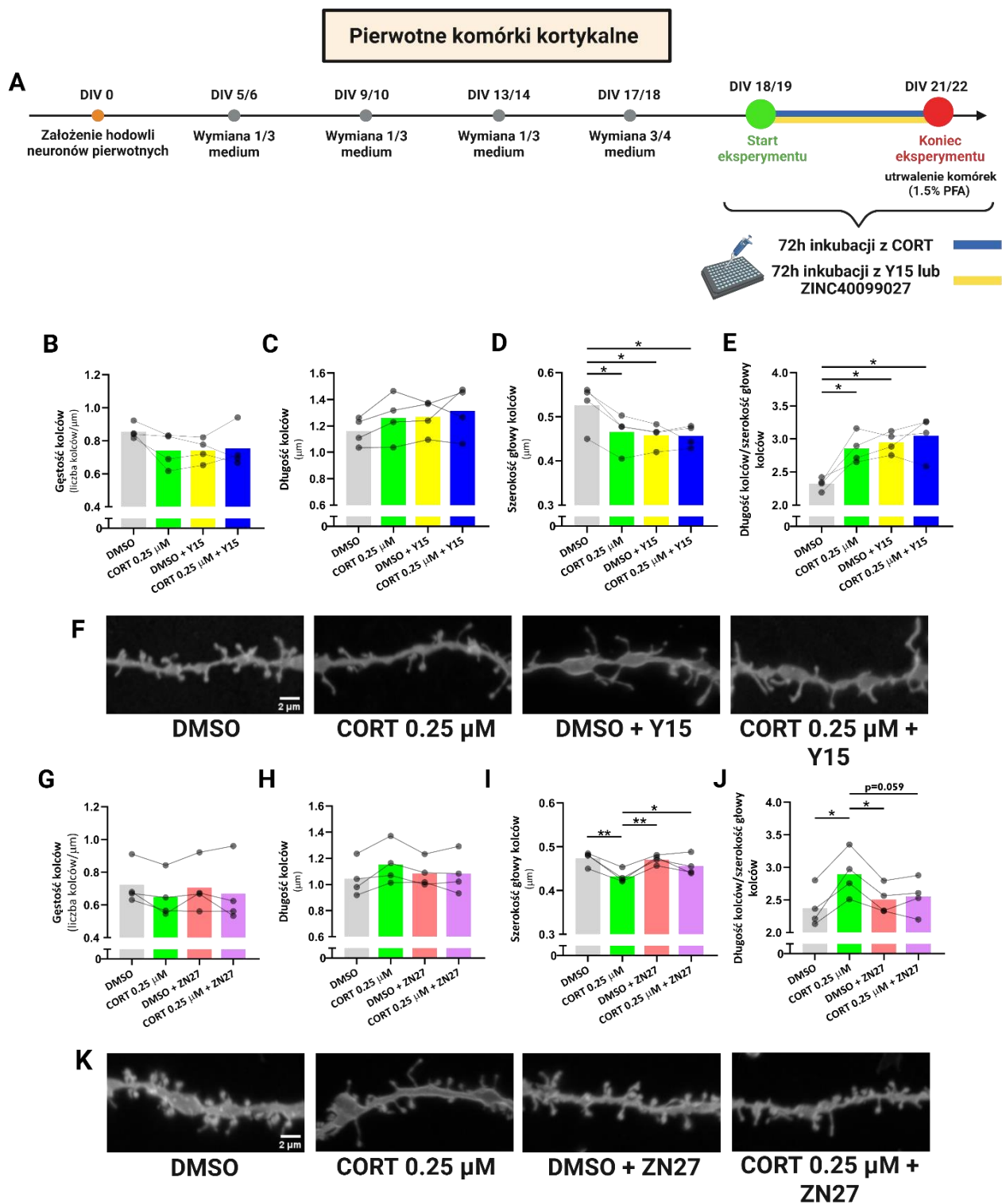
Brak wpływu oddziaływania eksperymentalnego, zaobserwowano także w przypadku długości kolców dendrytycznych. Jednakże, niewielka, 10% tendencja wzrostowa, którą zaobserwowano na skutek działania 0.25 μ M CORT, została niemal całkowicie zniwelowana za sprawą aktywatora ZN27 dodanego do 0.25 μ M CORT. Znaczącej różnicy i jakiegokolwiek tendencji, nie wykazano również za sprawą samego aktywatora ZN27 (Ryc 4.9 H: dwuczynnikowa RM ANOVA, traktowanie $F_{(1,3)}=5.532$, $p=0.1001$, modulator $F_{(1,3)}=0.9334$, $p=0.4053$, traktowanie \times modulator $F_{(1,3)}=6.492$, $p=0.0841$).

Tak jak w przypadku poprzednich eksperymentów, tak i tym razem wykazano spadek szerokości głów kolców, wywołany 0.25 μ M stężeniem CORT (Ryc 4.9 I: dwuczynnikowa RM ANOVA, traktowanie $F_{(1,3)}=14.39$, $p=0.0322$, modulator $F_{(1,3)}=20.94$, $p=0.0196$, traktowanie \times modulator $F_{(1,3)}=22.82$, $p=0.0174$). Różnicę, która pojawiła się na skutek oddziaływania 0.25 μ M CORT, wykazano zarówno względem grupy DMSO (test *post hoc* Tukeya, $p=0.0059$ dla DMSO vs. CORT 0.25 μ M), jak i grupy z aktywatorem ZN27 (test *post hoc* Tukeya, $p=0.0072$ dla CORT 0.25 μ M vs. DMSO+ZN27). Ponadto, zaobserwowano, że zwiększenie aktywacji białka FAK, za sprawą dodania aktywatora ZN27 do 0.25 μ M CORT, zapobiegło pojawieniu się spadku szerokości głów kolców. Bowiern wykazano znaczącą różnicę w szerokości głów kolców, pomiędzy grupą z samym 0.25 μ M CORT, a grupą, gdzie do 0.25 μ M CORT dodano ZN27 (test *post hoc* Tukeya, $p=0.0272$ dla CORT 0.25 μ M vs. CORT 0.25 μ M+ZN27).

Ostatecznie, nie wykazano wpływu samego aktywatora ZN27 na szerokość głów kolców (test *post hoc* Tukeya, $p=0.8857$ dla DMSO vs. DMSO+ZN27).

Ostatnim z weryfikowanych parametrów był stosunek długości kolców do szerokości ich głów (Ryc 4.9 J: dwuczynnikowa RM ANOVA, traktowanie $F_{(1,3)}=23.89$, $p=0.0164$, modulator $F_{(1,3)}=4.526$, $p=0.1233$, traktowanie \times modulator $F_{(1,3)}=19.36$, $p=0.0218$). Tak jak w poprzednich eksperymentach, inkubacja z $0.25 \mu\text{M}$ CORT, doprowadziła do znaczącego wzrostu w tym parametrze, względem grupy DMSO (test *post hoc* Tukeya, $p=0.0191$ dla DMSO vs. CORT $0.25 \mu\text{M}$), a w przypadku tego eksperymentu, również grupy ZN27 (test *post hoc* Tukeya, $p=0.0418$ dla CORT $0.25 \mu\text{M}$ vs. DMSO+ZN27). Obserwowane efekty działania $0.25 \mu\text{M}$ CORT znosiło jednoczesne podanie ZN27, utrzymując stosunek długości kolców do szerokości ich głów, na poziomie kontrolnej grupy DMSO (test *post hoc* Tukeya, $p=0.2710$ dla DMSO vs. CORT $0.25 \mu\text{M}$ +ZN27). Nie wykazano wpływu samego aktywatora ZN27 na analizowany parametr (test *post hoc* Tukeya, $p=0.4554$ dla DMSO vs. DMSO+ZN27).

Uzyskane wyniki wskazują, że podanie aktywatora białka FAK – substancji ZN27, przeciwdziała efektom $0.25 \mu\text{M}$ CORT, z którym inkubowano pierwotne hodowle kortykalne przez 72 godziny. Jednoczesne podanie ZN27 z CORT $0.25 \mu\text{M}$, znosiło wywołane CORT $0.25 \mu\text{M}$, obniżenie przeciętnej szerokości głów kolców oraz wzrost w stosunku długości kolców do szerokości ich głów.



Rycina 4.9: Wpływ manipulacji aktywnością białka FAK na zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych korykalnych neuronów pierwotnych, wywołane przez 72-godzinną inkubację z 0.25 μM CORT.

(A) Schemat doświadczenia, zawierający informację o momencie rozpoczęcia i zakończenia procedury eksperymentalnej, a także informację o sposobie utrwalenia hodowli pierwotnych. Rezultaty analizy wybranych parametrów morfologii kolców dendrytycznych kortykalnych neuronów pierwotnych, w tym: (B) gęstości kolców (C) długości kolców (D) szerokości głowy kolców i (E) stosunku długości kolców do szerokości głowy kolców, które były inkubowane z 0.25 μM CORT przez 72 godziny i/lub z inhibitorem fosforylacji białka FAK – Y15 oraz (G) gęstości kolców (H) długości kolców (I) szerokości głowy kolców i (J) stosunku długości kolców do szerokości głowy kolców neuronów pierwotnych, które były inkubowane z 0.25 μM CORT przez 72 godziny i/lub z aktywatorem białka FAK – ZN27. (F, K) Reprezentatywne zdjęcia kolców dendrytycznych, których przeciętne parametry morfologiczne w największym stopniu odzwierciedlają średnie obserwowane na wykresach. Słupki na wykresach przedstawiają średnią. Czarne kółka przedstawiają przeciętne wyniki dla poszczególnych biologicznych replikatów. Linie łączą dane pochodzące z tego samego biologicznego replikatu. Wyniki uzyskano z co najmniej trzech niezależnych, biologicznych replikatów. Liczba przeanalizowanych dendrytów na grupę – $N_{\text{DMSO}}=51$, $N_{\text{CORT } 0.25 \mu\text{M}}=55$, $N_{\text{DMSO}+\text{Y15}}=49$, $N_{\text{CORT } 0.25 \mu\text{M}+\text{Y15}}=47$ oraz $N_{\text{DMSO}}=50$, $N_{\text{CORT } 0.25 \mu\text{M}}=54$, $N_{\text{DMSO}+\text{ZN27}}=58$, $N_{\text{CORT } 0.25 \mu\text{M}+\text{ZN27}}=62$. Skala 2 μm . Dane analizowane dwuczynnikową RM ANOVA. W przypadku uzyskania istotności statystycznej w teście ANOVA, testem post hoc Tukeya. Na wykresach znajdują się istotności statystyczne z testu post hoc * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$

4.6.2 Analiza hipokampalnych neuronów pierwotnych - wpływ manipulacji aktywnością FAK na zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych, wywołane CORT

4.6.2.1 Zahamowanie aktywności białka FAK w hodowlach hipokampalnych – Y15

Analiza wykazała brak efektów oddziaływania eksperymentalnego na gęstość kolców dendrytycznych hipokampalnych neuronów pierwotnych, co potwierdza wcześniej uzyskiwane rezultaty (Ryc 4.10 B: dwuczynnikowa RM ANOVA, traktowanie $F_{(1,3)}=2.203$, $p=0.2344$, modulator $F_{(1,3)}=2.092$, $p=0.2439$, traktowanie \times modulator $F_{(1,3)}=3.318$, $p=0.1661$).

Jeżeli chodzi o parametr długości kolców dendrytycznych, zaobserwowano efekt 0.25 μM stężenia CORT, niezależnie od braku bądź obecności modulatora aktywności białka FAK – inhibitora Y15 (Ryc 4.10 C: dwuczynnikowa RM ANOVA, traktowanie $F_{(1,3)}=76.25$, $p=0.0032$, modulator $F_{(1,3)}=1.753$, $p=0.2773$, traktowanie \times modulator $F_{(1,3)}=0.6803$, $p=0.4699$). Tym samym, potwierdzono rezultaty uzyskane w poprzednich eksperymentach i wykazano spadek długości kolców dendrytycznych na skutek działania 0.25 μM CORT, względem grupy DMSO (test *post hoc* Tukeya, $p=0.0255$ dla DMSO vs. CORT 0.25 μM) oraz analogiczną różnicę pomiędzy grupą CORT 0.25 μM +Y15 a grupą DMSO+Y15 (test *post hoc* Tukeya, $p=0.0451$ dla DMSO+Y15 vs. CORT 0.25 μM +Y15).

Kolejny oceniany parametr to przeciętna szerokość głów kolców dendrytycznych. Potwierdzono wpływ oddziaływania 0.25 μM CORT na przeciętną szerokość głów kolców i wykazano brak wpływu inhibitora Y15 (Ryc 4.10 D: dwuczynnikowa RM ANOVA, traktowanie $F_{(1,3)}=76.96$, $p=0.0031$, modulator $F_{(1,3)}=0.1931$, $p=0.6901$, traktowanie \times modulator $F_{(1,3)}=6.128$, $p=0.0896$). Za sprawą bezpośredniego porównania poszczególnych grup, wykazano istotny spadek przeciętnej szerokości głów kolców dendrytycznych, będący efektem działania 0.25 μM CORT, w porównaniu do grupy DMSO (test *post hoc* Tukeya, $p=0.0160$ dla DMSO vs. CORT 0.25 μM). Mimo tendencji spadkowej i wielkości różnicy podobnej do tej obserwowanej pomiędzy grupą DMSO, a grupą CORT 0.25 μM , istotnego efektu

statystycznego nie wykazano w przypadku porównania grup DMSO+Y15 oraz grupy CORT 0.25 μ M+Y15 (test *post hoc* Tukeya, $p=0.0924$ dla DMSO+Y15 vs. CORT 0.25 μ M+Y15).

Ostatnim z analizowanych parametrów był stosunek długości kolców do szerokości ich głów. W tym przypadku, analiza wykazała wpływ 0.25 μ M CORT (Ryc 4.10 E: dwuczynnikowa RM ANOVA, traktowanie $F_{(1,3)}=28.84$, $p=0.0126$, modulator $F_{(1,3)}= 3.731$, $p=0.1489$, traktowanie \times modulator $F_{(1,3)}=0.0157$, $p=0.9079$). Porównania poszczególnych grup w ramach istotnego czynnika „traktowanie”, nie ujawniły istotnych zmian.

Jak wskazują uzyskane wyniki, w przypadku pierwotnych neuronów hipokampalnych, inaczej niż w przypadku komórek kortykalnych, nie wykazano wpływu manipulacji aktywnością białka FAK na zmiany w strukturze kolców dendrytycznych w ogóle, a także za sprawą inkubacji neuronów pierwotnych z 0.25 μ M CORT. Inhibitor autofosforylacji białka FAK – Y15, nie wpływał na żaden z badanych parametrów morfologii kolców oraz nie modyfikował wpływu inkubacji neuronów pierwotnych z 0.25 μ M CORT, który tak jak w przypadku poprzednich eksperymentów, spowodowała spadek przeciętnej długości i szerokości głów kolców dendrytycznych.

4.6.2.2 Zwiększenie aktywności białka FAK w hodowlach hipokampalnych – ZN27

W celu uzyskania całościowego obrazu potencjalnego wpływu modulacji aktywnością białka FAK na zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych pierwotnych neuronów hipokampalnych, wywołane CORT, zbadano również jakie efekty może wywierać aktywacja białka FAK.

Podobnie jak w przypadku eksperymentów z inhibitorem aktywności białka FAK, również i tym razem, analiza nie wykazała wpływu zastosowanego oddziaływania eksperymentalnego, na gęstość kolców dendrytycznych (Ryc 4.10 G: REML, traktowanie $F_{(1,5)}=0.2095$, $p=0.6664$, modulator $F_{(1,5)}=0.219$, $p=0.8881$, traktowanie \times modulator $F_{(1,1)}=5.760$, $p=0.2513$).

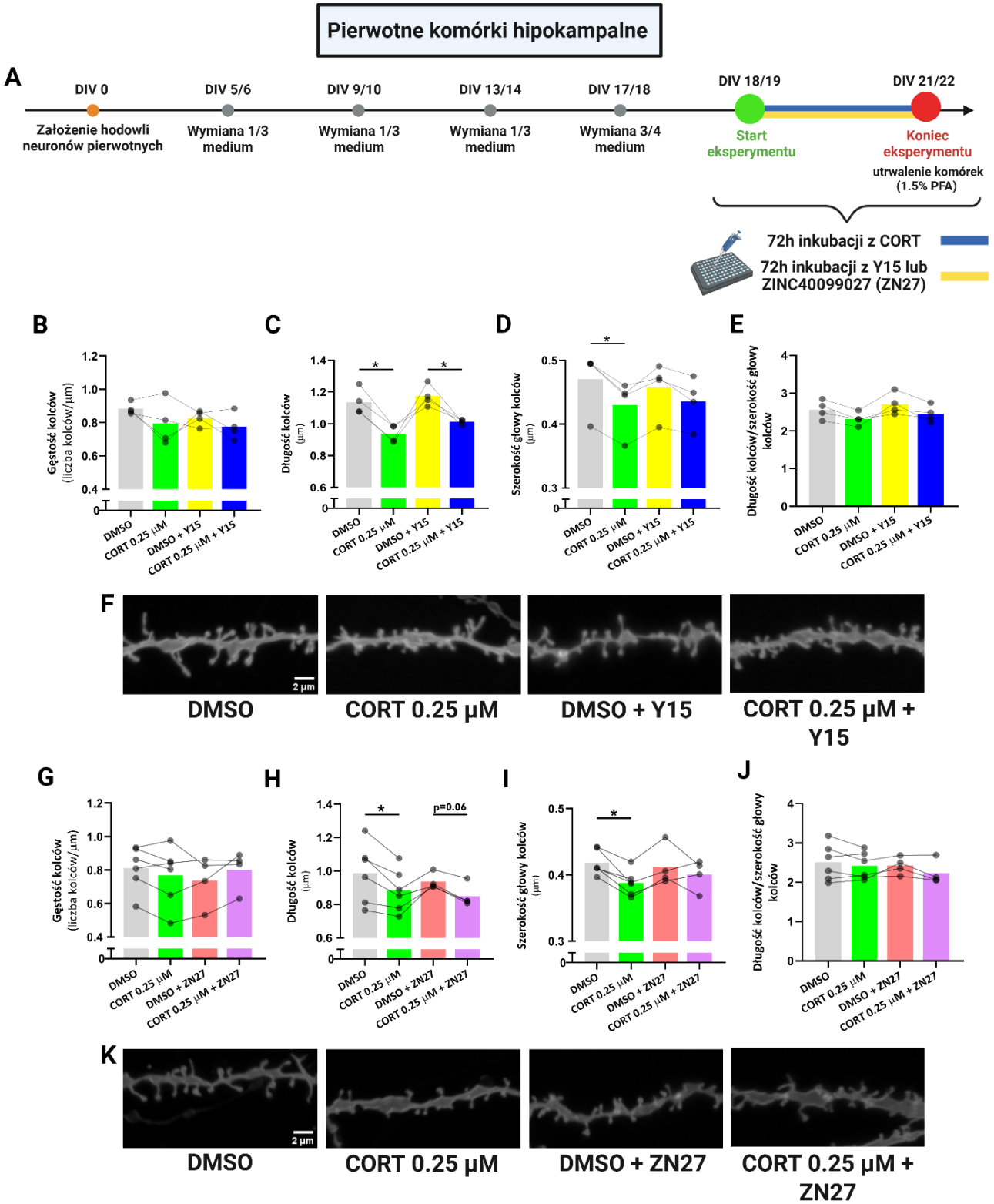
Także w przypadku analizy przeciętnej długości kolców dendrytycznych, zaobserwowano analogiczne rezultaty do tych uzyskanych we wcześniejszych eksperymentach. Jedyny wykazany efekt eksperymentalny, związany był z oddziaływaniem 0.25 μ M CORT i nie zależał od działania aktywatora białka FAK – substancji ZN27 (Ryc 4.10 H: REML, traktowanie $F_{(1,5)}=30.84$, $p=0.0026$, modulator $F_{(1,5)}=0.3607$, $p=0.5743$, traktowanie \times modulator $F_{(1,1)}=0.3271$, $p=0.6693$). Dalsza analiza, polegająca na porównaniu poszczególnych grup w ramach istotnego czynnika ‘traktowanie’, wykazała spadek przeciętnej długości głów kolców na skutek inkubacji neuronów pierwotnych z 0.25 μ M CORT, w porównaniu do grupy DMSO (test *post hoc* Tukeya, $p=0.0114$ dla DMSO vs. CORT 0.25 μ M). W grupie, w której do 0.25 μ M CORT dodano aktywator białka FAK – ZN27, zaobserwowano wyniki na granicy

istotności statystycznej i zanotowano podobnej wielkości spadek przeciętnej długości głowy kolców dendrytycznych, w porównaniu do grupy DMSO+ZN27 (test *post hoc* Tukeya, $p=0.0666$ dla DMSO+ZN27 vs. CORT 0.25 μM +ZN27).

Wpływ 0.25 μM CORT wykazano także w przypadku parametru dotyczącego przeciętnej szerokości głów kolców (Ryc 4.10 I: REML, traktowanie $F_{(1,5)}=11.77$, $p=0.0186$, modulator $F_{(1,5)}=0.8267$, $p=0.4049$, traktowanie \times modulator $F_{(1,1)}=2.896$, $p=0.3382$). Za sprawą analizy różnic pomiędzy poszczególnymi grupami, zaobserwowano spadek przeciętnej szerokości głów kolców dendrytycznych, na skutek działania 0.25 μM CORT, w porównaniu do grupy kontrolnej – DMSO (test *post hoc* Tukeya, $p=0.0239$ dla DMSO vs. CORT 0.25 μM). Dodanie aktywatora białka FAK – substancji ZN27 do grupy DMSO oraz CORT 0.25 μM , spowodowało osłabienie efektu 0.25 μM CORT i mimo obserwowanej tendencji spadkowej, brak istotnej statystycznie różnicy między tymi grupami w zakresie przeciętnej szerokości głów kolców dendrytycznych (test *post hoc* Tukeya, $p=0.5862$ dla DMSO+ZN27 vs. CORT 0.25 μM +ZN27).

Wykazano brak efektu oddziaływania eksperymentalnego na stosunek długości kolców dendrytycznych do szerokości ich głów (Ryc 4.10 J: REML, traktowanie $F_{(1,5)}=5.282$, $p=0.0699$, modulator $F_{(1,5)}=0.3256$, $p=0.5929$, traktowanie \times modulator $F_{(1,1)}=0.7567$, $p=0.5442$).

Uzyskane dane potwierdzają obserwowany w poprzednich eksperymentach, wpływ 0.25 μM CORT na przeciętną długość kolców dendrytycznych oraz przeciętną szerokość ich głów. Ponadto, dane sugerują brak wpływu zastosowanej aktywacji białka FAK, na parametr dotyczący długości kolców dendrytycznych. Pomimo braku wykazanej istotności statystycznej (która jednak znajdowała się na granicy progu zmienności), na skutek porównania poszczególnych grup w zakresie przeciętnej długości kolców, wielkość różnicy pomiędzy grupą DMSO+ZN27 a grupą CORT 0.25 μM +ZN27, była podobna do tej obserwowanej w przypadku grupy DMSO oraz CORT 0.25 μM . Zastosowanie aktywatora ZN27, znosiło efekty działania 0.25 μM CORT w przypadku parametru szerokości głów kolców. Nie wykazano różnicy pomiędzy grupą DMSO+ZN27 a grupą CORT 0.25 μM +ZN27, analogicznej do tej obserwowanej w porównaniu grupy DMSO oraz CORT 0.25 μM .



Rycina 4.10: Wpływ manipulacji aktywnością białka FAK na zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych hipokampalnych neuronów pierwotnych, wywołane przez 72-godziną inkubację z 0.25 μM CORT.

(A) Schemat doświadczenia, zawierający informację o momencie rozpoczęcia i zakończenia procedury eksperymentalnej, a także informację o sposobie utrwalenia hodowli pierwotnych. Rezultaty analizy wybranych parametrów morfologii kolców dendrytycznych hipokampalnych neuronów pierwotnych, w tym: (B) gęstości kolców (C) długości kolców (D) szerokości głowy kolców i (E) stosunku długości kolców do szerokości głowy kolców, które były inkubowane z 0.25 μM CORT przez 72 godziny i/lub z inhibitorem fosforylacji białka FAK – Y15 oraz (G) gęstości kolców (H) długości kolców (I) szerokości głowy kolców i (J) stosunku długości kolców do szerokości głowy kolców neuronów pierwotnych, które były inkubowane z 0.25 μM CORT przez 72 godziny i/lub z aktywatorem białka FAK – ZN27. (F, K) Reprezentatywne zdjęcia kolców dendrytycznych, których przeciętne parametry morfologiczne w największym stopniu odzwierciedlają średnie obserwowane na wykresach. Słupki na wykresach przedstawiają średnią. Czarne kółka przedstawiają przeciętne wyniki dla poszczególnych biologicznych replikatów. Linie łączą dane pochodzące z tego samego biologicznego replikatu. Wyniki uzyskano z co najmniej trzech niezależnych, biologicznych replikatów. Liczba przeanalizowanych dendrytów na grupę – $N_{\text{DMSO}}=52$, $N_{\text{CORT } 0.25 \mu\text{M}}=60$, $N_{\text{DMSO+Y15}}=50$, $N_{\text{CORT } 0.25 \mu\text{M+Y15}}=56$ oraz $N_{\text{DMSO}}=74$, $N_{\text{CORT } 0.25 \mu\text{M}}=71$, $N_{\text{DMSO+ZN27}}=49$, $N_{\text{CORT } 0.25 \mu\text{M+ZN27}}=51$. Skala 2 μm . Dane analizowane dwuczynnikową RM ANOVA lub REML, w przypadku uzyskania istotności statystycznej w teście ANOVA lub REML, analizowane testem post hoc Tukeya. Na wykresach znajdują się istotności statystyczne z testu post hoc $*p \leq 0.05$.

4.7 Ocena wpływu CORT i różnych czasów inkubacji kortykalnych i hipokampalnych hodowli pierwotnych z CORT na zmiany w poziomie mRNA genu *PTK2* oraz w poziomie białka FAK

W celu określenia wpływu przedłużonego działania 0.25 μM CORT, na profil ekspresji FAK, zbadano ilość transkryptu genu *PTK2*, a także poziom całkowitego i fosforylowanego na Tyrozyne 397, białka FAK. W związku ze zmianami morfologicznymi kolców dendrytycznych kortykalnych i hipokampalnych neuronów pierwotnych, które w obu przypadkach wykazano po 72-godzinnej inkubacji komórek pierwotnych z 0.25 μM CORT, poziom mRNA genu *PTK2* oraz poziom białka FAK, określano po 72-godzinach, ale również po krótszym czasie inkubacji z 0.25 μM CORT, m.in. po 48 godzinach, w celu identyfikacji pierwszego momentu zajścia potencjalnych zmian, w przypadku zaobserwowania zmian po 72 godzinach. Komórki pierwotne hodowano oraz poddawano określonym procedurom eksperymentalnym, zgodnie ze schematem przedstawionym na rycinie 4.11, 4.12, 4.13, 4.14 A.

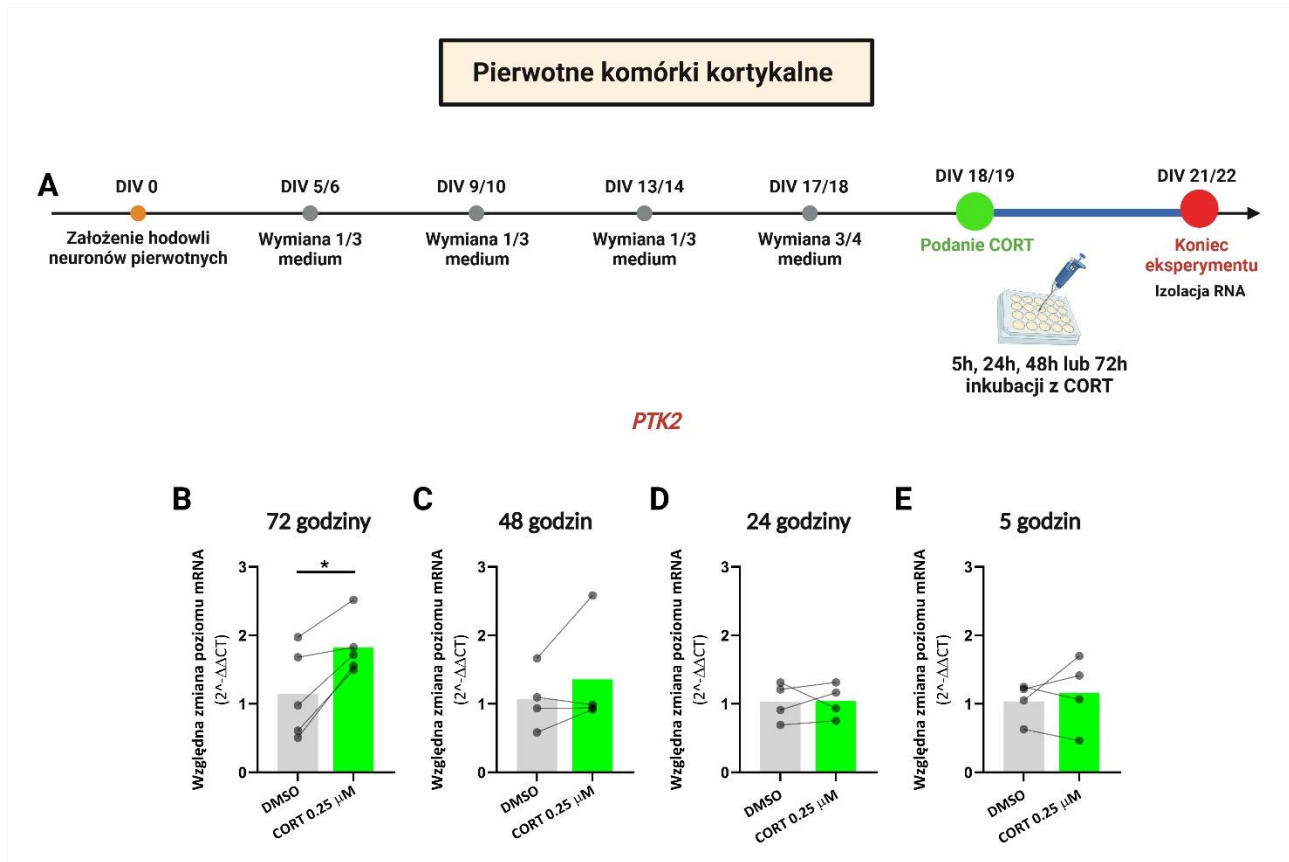
4.7.1 Analiza kortykalnych hodowli pierwotnych – poziom mRNA genu *PTK2* oraz poziom całkowitego i fosforylowanego FAK

W przypadku pierwotnych komórek kortykalnych, zmiany w poziomie mRNA zaobserwowano w pierwszej kolejności po 72 godzinach inkubacji komórek pierwotnych z 0.25 μM CORT. Na skutek inkubacji komórek z 0.25 μM CORT, wykazano ponad półtorakrotny wzrostu mRNA genu *PTK2*, w porównaniu z grupą DMSO (Ryc 4.11 B: sparowany test t-Studenta, $t=4.307$, $df=4$, $p=0.0126$). Aby zweryfikować moment zajścia obserwowanych zmian, poziom mRNA genu *PTK2*, określono również po 48, 24 i 5 godzinach inkubacji komórek kortykalnych z 0.25 μM CORT. W przypadku pozostałych zbadanych czasów, nie wykazano różnic między grupą DMSO, a grupą CORT 0.25 μM (Ryc 4.11 C, D,

E: sparowany test t-Studenta, $t=1.243$, $df=4$, $p=0.3022$ dla 48 godzin, $t=0.6992$, $df=4$, $p=0.9487$ dla 24 godzin, $t=0.6392$, $df=3$ $p=0.5682$ dla 5 godzin).

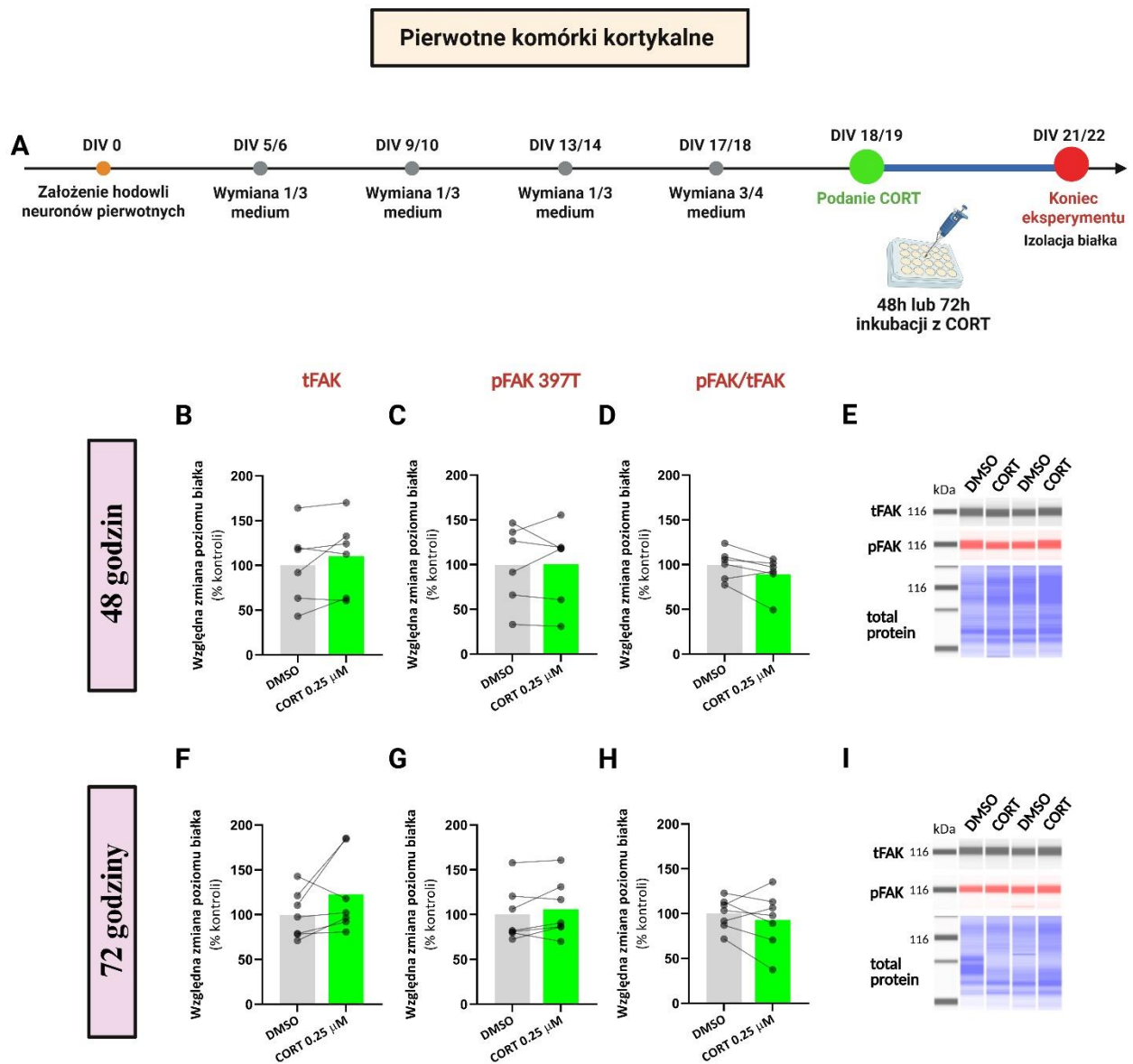
Aby ustalić, czy na skutek 72-godzinnej inkubacji komórek pierwotnych z $0.25 \mu\text{M}$ CORT, która wywołuje zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych oraz zmiany w poziomie mRNA genu *PTK2*, dochodzi również do zmian w poziomie całkowitego białka FAK oraz fosforylowanego na tyrozynie 397, przeprowadzono analizy Western Blot, z wykorzystaniem platformy Simple Jess. W celu identyfikacji momentu zajścia potencjalnych zmian, poziom białka określano po 72 oraz 48 godzinach inkubacji z $0.25 \mu\text{M}$ CORT. Jak wskazują uzyskane dane, po 48-godzinnej inkubacji korykalnych komórek pierwotnych z $0.25 \mu\text{M}$ CORT, nie dochodzi do zmian ani w całkowitym poziomie białka FAK (Ryc 4.12 B, sparowany test t-Studenta, $t=1.485$, $df=5$, $p=0.1976$) ani w poziomie jego fosforylowanej formy (Ryc 4.12 C, sparowany test t-Studenta, $t=0.04532$, $df=5$ $p=0.9656$), w porównaniu do grupy DMSO. Idąc dalej, pomimo tendencji spadkowej, zmian nie wykryto również w przypadku stosunku formy fosforylowanej do formy całkowitej, w zestawieniu z DMSO (Ryc 4.12 D, sparowany test t-Studenta, $t=2.124$, $df=5$ $p=0.0871$). Podobne rezultaty zaobserwowano po 72-godzinnej inkubacji komórek pierwotnych z CORT $0.25 \mu\text{M}$. Mimo niewielkiej tendencji wzrostowej, nie wykazano istotnych zmian w poziomie całkowitej formy białka FAK, pomiędzy grupą DMSO, a grupą CORT $0.25 \mu\text{M}$ (Ryc 4.12 F, sparowany test t-Studenta, $t=1.705$, $df=6$ $p=0.1390$). Brak efektów $0.25 \mu\text{M}$ CORT, zaobserwowano również w przypadku formy białka FAK, fosforylowanej na tyrozynie 397 (Ryc 4.12 G, sparowany test t-Studenta, $t=1.412$, $df=6$ $p=0.2078$) oraz w przypadku stosunku formy fosforylowanej do formy całkowitej (Ryc 4.12 H, sparowany test t-Studenta, $t=0.8916$, $df=6$ $p=0.4069$).

Podsumowując, uzyskane dane wskazują wzrost mRNA genu *PTK2*, na skutek 72-godzinnej inkubacji korykalnych komórek pierwotnych z $0.25 \mu\text{M}$ CORT, który koreluje czasowo z obserwowanymi zmianami morfologicznymi kolców dendrytycznych. Co więcej, jest to pierwszy i jedyny punkt czasowy w którym pojawią się istotne różnice, biorąc pod uwagę, że nie wykazano różnic między grupą kontrolną (DMSO), a grupą CORT $0.25 \mu\text{M}$, po krótszym niż 72 godziny czasie inkubacji z $0.25 \mu\text{M}$ CORT. Wykazano brak wpływu $0.25 \mu\text{M}$ CORT na zmiany w profilu białkowym FAK.



Rycina 4.11: Charakterystyka wpływu różnych czasów inkubacji korykalnych hodowli pierwotnych z 0.25 μM CORT, na poziom mRNA genu *PTK2*, kodującego białko FAK

(A) Schemat doświadczenia, zawierający informację o momencie rozpoczęcia i zakończenia procedury eksperymentalnej, a także informację o materiale pobranym do dalszych analiz. Rezultaty analizy poziomu mRNA genu *PTK2* po (B) 72-godzinnej, (C) 48-godzinnej, (D) 24-godzinnej oraz (E) 5-godzinnej inkubacji korykalnych hodowli pierwotnych z DMSO lub 0.25 μM CORT. Czarne kółka przedstawiają przeciętne wyniki dla poszczególnych biologicznych replikatów. Linie łączą dane pochodzące z tego samego biologicznego replikatu. Wyniki uzyskano z co najmniej trzech niezależnych, biologicznych replikatów. Dane analizowane testem t-Studenta dla prób zależnych, * $p \leq 0.05$



Rycina 4.12: Charakterystyka wpływu 48 i 72-godzinnej inkubacji kortalnych hodowli pierwotnych z 0.25 μ M CORT, na profil ekspresji białka FAK

(A) Schemat doświadczenia, zawierający informację o momencie rozpoczęcia i zakończenia procedury eksperymentalnej, a także informację o materiale pobranym do dalszych analiz. Poziom (B) całkowitego i (C) fosforylowanego (pFAK 397T) białka FAK, a także (D) stosunek formy fosforylowanej do całkowitej, po 48-godzinnej inkubacji kortalnych hodowli pierwotnych z DMSO lub 0.25 μ M CORT. Poziom (F) całkowitego i (G) fosforylowanego (pFAK 397T) białka FAK, a także (H) stosunek formy fosforylowanej do całkowitej, po 72-godzinnej inkubacji kortalnych hodowli pierwotnych z DMSO lub 0.25 μ M CORT. (E, I) Zdjęcia przedstawiające reprezentatywne prążki będące graficzną wizualizacją sygnału. Czarne kółka przedstawiają przeciętne wyniki dla poszczególnych biologicznych replikatów. Linie łączą dane pochodzące z tego samego biologicznego replikatu. Wyniki uzyskano z co najmniej trzech niezależnych, biologicznych replikatów. Dane analizowane testem t-Studenta dla prób zależnych.

4.7.2 Analiza hipokampalnych hodowli pierwotnych - poziom mRNA genu *PTK2* oraz poziom całkowitego i fosforylowanego FAK

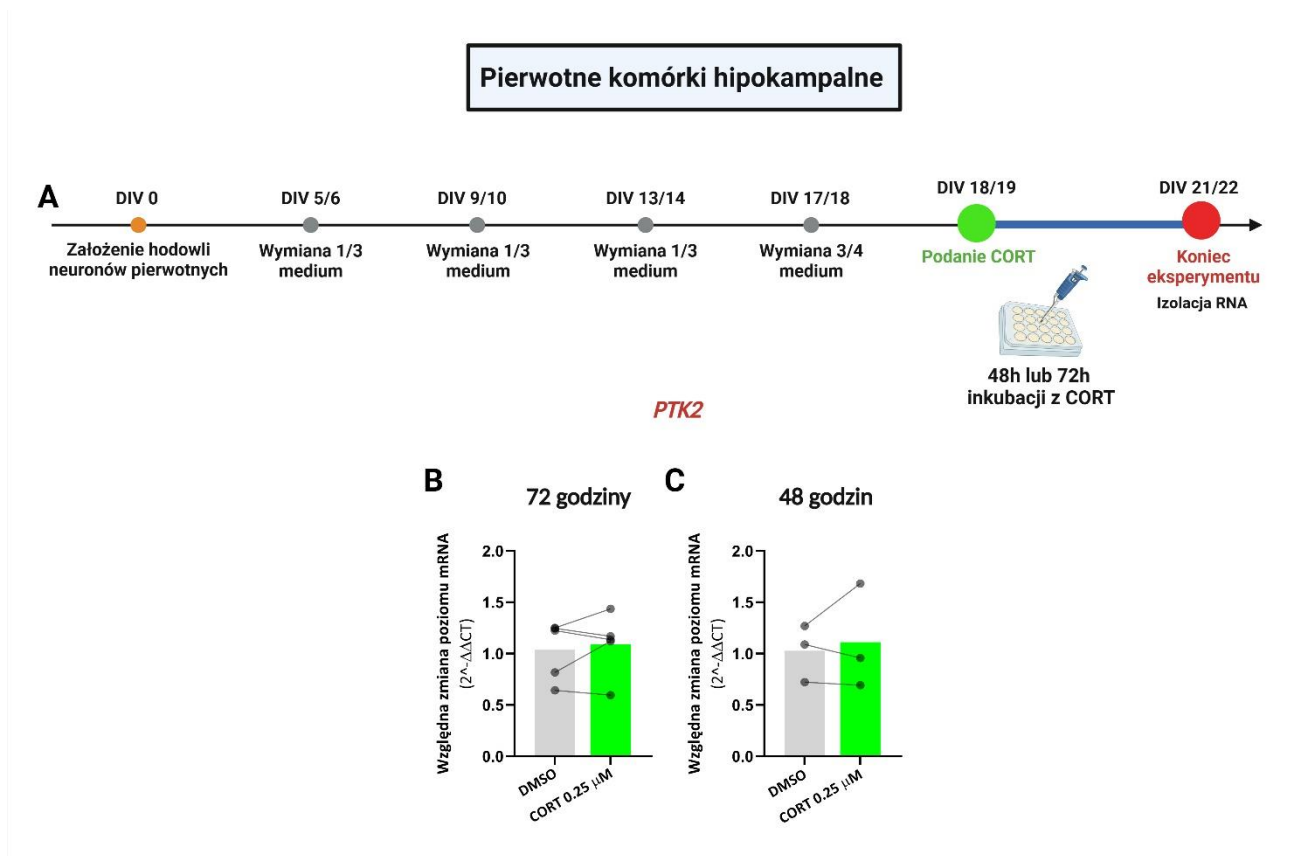
W związku z zaobserwowanymi zmianami morfologicznymi kolców dendrytycznych pierwotnych neuronów hipokampalnych, na skutek 72-godzinnej inkubacji komórek pierwotnych z 0.25 μ M CORT. A także w związku z hipotezą, zakładającą udział białka FAK w pojawieniu się owych zmian. Również i w przypadku pierwotnych komórek hipokampalnych, zbadano wpływ 72-godzinne działanie 0.25 μ M CORT, na profil ekspresji FAK. Ponownie określono ilość transkryptu genu *PTK2*, a także poziom całkowitego i fosforylowanego na tyrozynie 397, białka FAK. Analogicznie do badań przeprowadzonych na korykalnych komórkach pierwotnych, poziom mRNA genu *PTK2*, a także poziomy białka, określano po 72-godzinach, ale również po krótszym czasie inkubacji z 0.25 μ M CORT, w tym przypadku, również po 48 godzinach.

Inaczej niż w przypadku komórek korykalnych, nie wykazano różnic pomiędzy grupą DMSO, a grupą, którą poddano 72-godzinnej inkubacji hipokampalnych komórek pierwotnych z 0.25 μ M CORT, w zakresie poziomu mRNA genu *PTK2* (Ryc 4.13 B, sparowany test t-Studenta, $t=0.6966$, $df=4$, $p=0.5244$). Różnic nie zaobserwowano również po 48-godzinnej inkubacji z 0.25 μ M CORT (Ryc 4.13 C, sparowany test t-Studenta, $t=0.5012$, $df=2$, $p=0.6660$).

Aby ustalić, czy na skutek 72-godzinnej inkubacji hipokampalnych komórek pierwotnych z 0.25 μ M CORT, dochodzi do zmian w poziomie całkowitego białka FAK oraz fosforylowanego na tyrozynie 397, przeprowadzono analizy Western Blot, z wykorzystaniem platformy Simple Jess. Analogicznie do analiz przeprowadzonych na komórkach korykalnych, poziom białka określano po 48 oraz 72 godzinach inkubacji z 0.25 μ M CORT. Nie wykazano zmian po 48 godzinach inkubacji hipokampalnych komórek pierwotnych z 0.25 μ M CORT, w poziomie całkowitego białka FAK, w porównaniu do grupy DMSO (Ryc 4.14 B, sparowany test t-Studenta, $t=0.9196$, $df=3$, $p=0.4256$). Efektów 0.25 μ M CORT w porównaniu do grupy kontrolnej (DMSO), nie zaobserwowano również w poziomie jego fosforylowanej formy (Ryc 4.14 C, sparowany test t-Studenta, $t=1.496$, $df=3$, $p=0.2316$), a także w stosunku fosforylowanej formy białka FAK do formy całkowitej (Ryc 4.14 D, sparowany test t-Studenta, $t=0.1119$, $df=3$, $p=0.9180$). Analiza wykazała analogiczne rezultaty w przypadku 72-godzinnej inkubacji komórek pierwotnych z 0.25 μ M CORT. Ponownie nie zaobserwowano istotnych różnic pomiędzy grupą DMSO, a grupą CORT 0.25 μ M, w poziomie całkowitego białka FAK (Ryc 4.14 F, sparowany test t-Studenta, $t=1.183$, $df=4$, $p=0.3024$), jego fosforylowanej formy (Ryc 4.14 G, sparowany test t-Studenta, $t=1.313$,

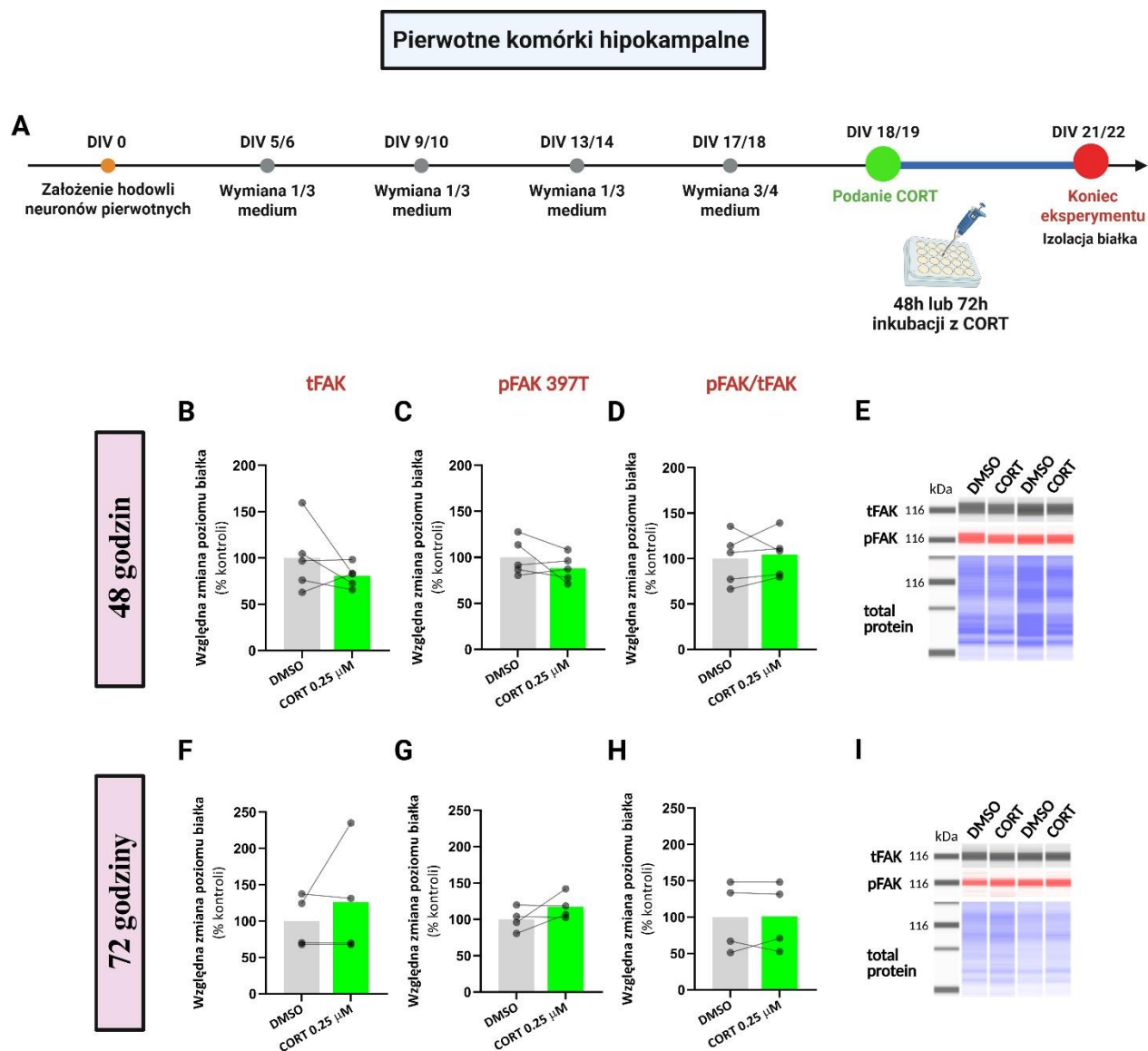
df=4, p=0.2596) oraz w stosunku fosforylowanej formy białka FAK, do formy całkowitej (Ryc 4.14 H, sparowany test t-Studenta, t=0.4859, df=4, p=0.6525).

Nie wykazano wpływu inkubacji hipokampalnych hodowli pierwotnych z 0.25 μM CORT na poziom mRNA genu *PTK2* oraz na poziom białka FAK, mierzony zarówno w jego całkowitej jak i fosforylowanej formie, niezależnie od zastosowanego czasu trwania inkubacji z CORT.



Rycina 4.13: Charakterystyka wpływu różnych czasów inkubacji hipokampalnych hodowli pierwotnych z 0.25 μM CORT, na poziom mRNA genu *PTK2*, kodującego białko FAK

(A) Schemat doświadczenia, zawierający informację o momencie rozpoczęcia i zakończenia procedury eksperymentalnej, a także informację o materiale pobranym do dalszych analiz. Rezultaty analizy poziomu mRNA genu *PTK2* po (B) 72-godzinnej oraz (C) 48-godzinnej inkubacji hipokampalnych hodowli pierwotnych z DMSO lub 0.25 μM CORT. Czarne kółka przedstawiają przeciętne wyniki dla poszczególnych biologicznych replikatów. Linie łączą dane pochodzące z tego samego biologicznego replikatu. Wyniki uzyskano z co najmniej trzech niezależnych, biologicznych replikatów. Dane analizowane testem t-Studenta dla prób zależnych.



Rycina 4.14: Charakterystyka wpływu 48 i 72-godzinnej inkubacji hipokampalnych hodowli pierwotnych z 0.25 μ M CORT, na profil ekspresji białka FAK

(A) Schemat doświadczenia, zawierający informację o momencie rozpoczęcia i zakończenia procedury eksperymentalnej, a także informację o materiale pobranym do dalszych analiz. Poziom (B) całkowitego i (C) ufosforylowanego (pFAK 397T) białka FAK, a także (D) stosunek formy ufosforylowanej do całkowitej, po 48-godzinnej inkubacji hipokampalnych hodowli pierwotnych z DMSO lub 0.25 μ M CORT. Poziom (F) całkowitego i (G) ufosforylowanego (pFAK 397T) białka FAK, a także (H) stosunek formy ufosforylowanej do całkowitej, po 72-godzinnej inkubacji hipokampalnych hodowli pierwotnych z DMSO lub 0.25 μ M CORT. (E, I) Zdjęcia przedstawiające reprezentatywne prążki będące graficzną wizualizacją sygnału. Czarne kółka na wykresach przedstawiają przeciętne wyniki dla poszczególnych biologicznych replikatów. Linie łączą dane pochodzące z tego samego biologicznego replikatu. Wyniki uzyskano z co najmniej trzech niezależnych, biologicznych replikatów. Dane analizowane testem t-Studenta dla prób zależnych.

4.8 Analiza wpływu CORT i różnych czasów inkubacji korykalnych i hipokampalnych hodowli pierwotnych z CORT na poziom mRNA genów kodujących białka związane z plastycznością synaptyczną i/lub wchodzące w interakcję z białkiem FAK

Działanie CORT oraz modyfikacje w strukturze kolców dendrytycznych, są związane z szeregiem zmian w sygnalizacji wewnątrzkomórkowej, które obejmują m.in. zmiany w aktywności i w poziomie białek takich jak SRC, p130cas, bądź RhoA. Jednocześnie, jak pokazuje literatura przedmiotu, białko FAK wchodzi w interakcję i modyfikuje aktywność tychże białek, a także aktywność białka FAK, jest modyfikowana za ich pośrednictwem, co może wiązać się ze zmianami morfologicznymi zachodzącymi na skutek działania CORT. Dlatego, w kolejnych eksperymentach sprawdzono wpływ 72-godzinnej inkubacji korykalnych oraz hipokampalnych komórek pierwotnych z 0.25 μM CORT, na zmiany ekspresji genów, które kodują białka wchodzące w interakcje z białkiem FAK, a także tych genów, które jak wskazuje dotychczasowa wiedza, są zaangażowane w zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych. Zmiany we względnej ekspresji genów, określano po 72 godzinach inkubacji komórek pierwotnych z 0.25 μM CORT, zarówno w przypadku hodowli korykalnych jak i hipokampalnych. W przypadku pierwotnych komórek korykalnych, w związku z zaobserwowaną dużą ilością zmian, eksperymenty przeprowadzono również po 48 godzinach inkubacji z CORT, w celu potwierdzenia czy wykazane zmiany pierwszy raz pojawiają się po 72 godzinach czy występują również wcześniej. Badane geny ułożono na wykresie ze względu na funkcjonalną bliskość. Komórki pierwotne hodowano oraz poddawano określonym procedurom eksperymentalnym, zgodnie ze schematem przedstawionym na rycinie 4.15 A i 4.16 A

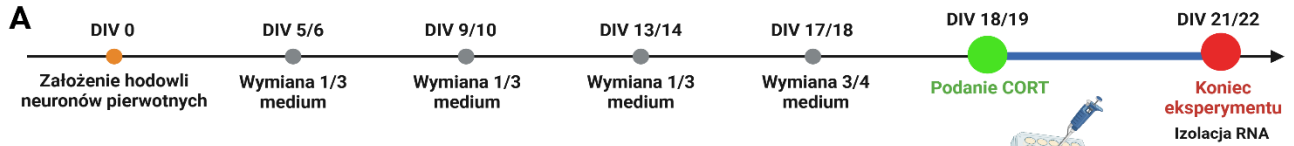
4.8.1 Analiza korykalnych hodowli pierwotnych – poziom mRNA genów kodujących białka związane z plastycznością synaptyczną i/lub wchodzące w interakcję z białkiem FAK

Jak wskazują dane dotyczące pierwotnych neuronów korykalnych, znaczące różnice pomiędzy grupą DMSO, a grupą CORT 0.25 μM , po 72 godzinach inkubacji z 0.25 μM CORT, wykazano w przypadku genów *mTOR* (Ryc 4.15 B, sparowany test t-Studenta, $t=3.082$, $df=4$ $p=0.0369$), *PTK2B* (sparowany test t-Studenta, $t=5.610$, $df=4$ $p=0.0050$), *SRC* (sparowany test t-Studenta, $t=3.894$, $df=4$ $p=0.0176$), oraz *ARHGAP26* (sparowany test t-Studenta, $t=3.003$, $df=4$ $p=0.0398$). W przypadku wszystkich wymienionych genów, doszło do wzrostu poziomu mRNA na skutek działania 0.25 μM CORT. A najwyższą, dwuipółkrotną różnicę, wykazała analiza genu *PTK2B*. Mimo wyraźnych tendencji wzrostowych, znaczących statystycznie zmian względem grupy kontrolnej (DMSO), nie zaobserwowano

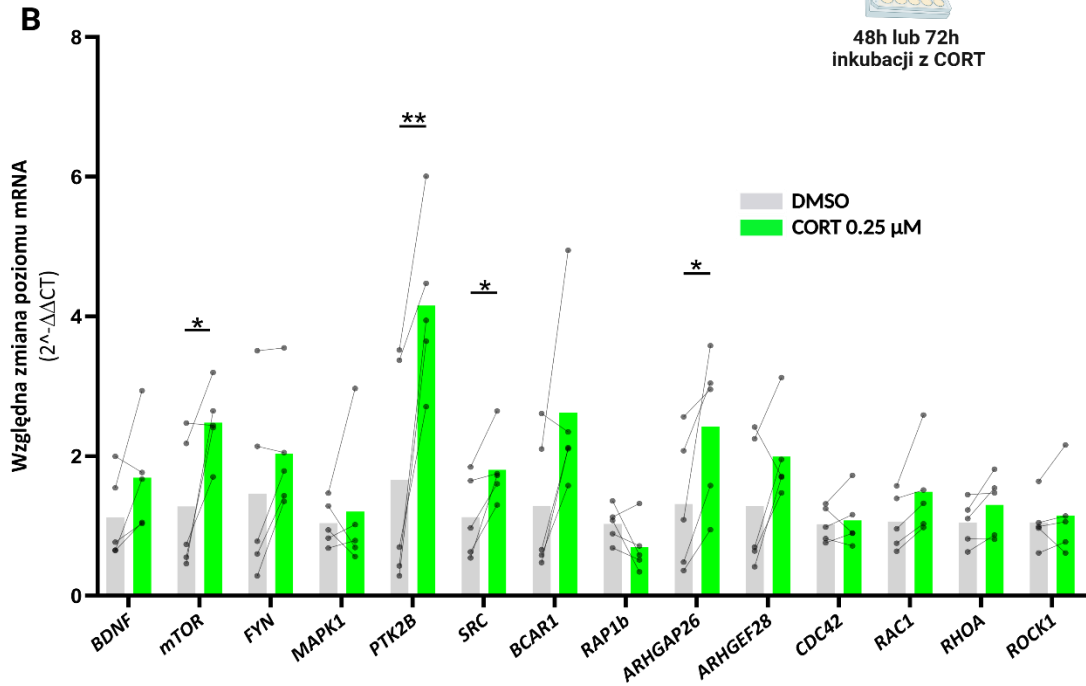
w przypadku genów *BDNF*, *FYN*, *BCAR1*, *ARHGEF28* oraz *RAC1*. Dodatkowo, wyraźną ale nieznaczącą statystycznie tendencję spadkową wykazano w przypadku genu *RAP1*. Geny, których względna ekspresja znacząco się zmieniła, bądź pojawiła się wyraźna tendencja na skutek 72-godzinnej inkubacji z 0.25 μ M CORT, przeanalizowano również po 48-godzinnej inkubacji z 0.25 μ M CORT. Nie zaobserwowano różnic pomiędzy grupą DMSO, a grupą 0.25 μ M CORT, w poziomie mRNA żadnego z wcześniej analizowanych genów, po 48-godzinnej inkubacji kortykalnych hodowli pierwotnych z 0.25 μ M CORT (Ryc 4.15 C).

Podsumowując, uzyskane dane wskazują zmiany w poziomie mRNA genów kodujących białka wchodzące w interakcję z białkiem FAK i znane z zaangażowania w plastyczność synaptyczną (*PTK2B* oraz *SRC*), a także, zmiany w poziomie mRNA genów kodujących białka regulujące aktywność białek takich jak RhoA (*ARHGAP26*), których rola w zmianach morfologii kolców dendrytycznych, również pod wpływem CORT, została udowodniona. Ostatecznie, obserwowane zmiany pojawiają się po 72 godzinach i nie zaobserwowano ich po 48 godzinach inkubacji pierwotnych neuronów kortykalnych z 0.25 μ M CORT.

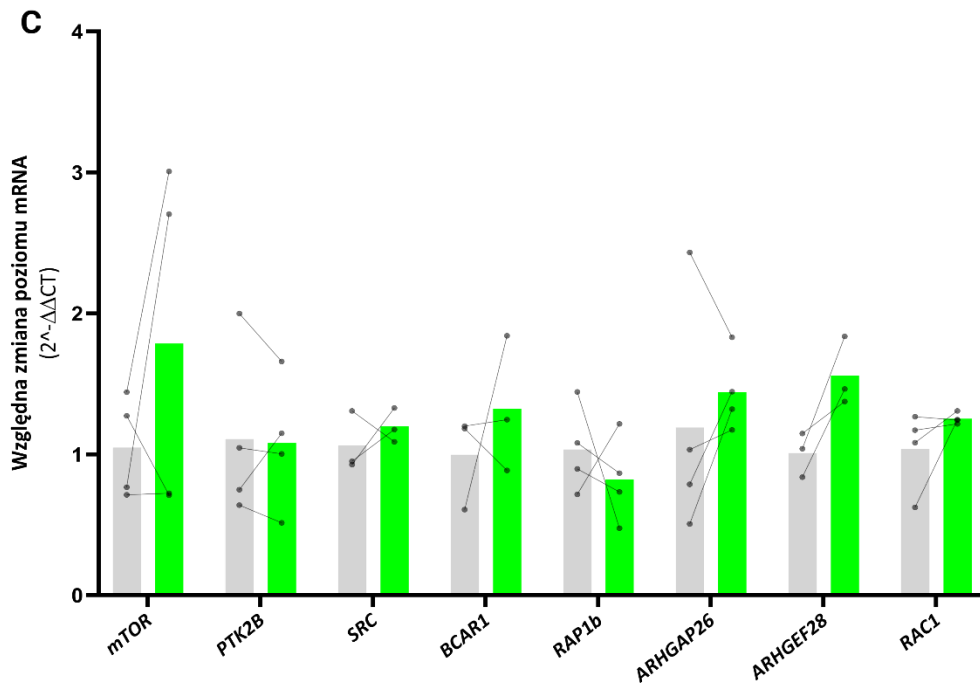
Pierwotne komórki korykalne



72 godzin



48 godzin



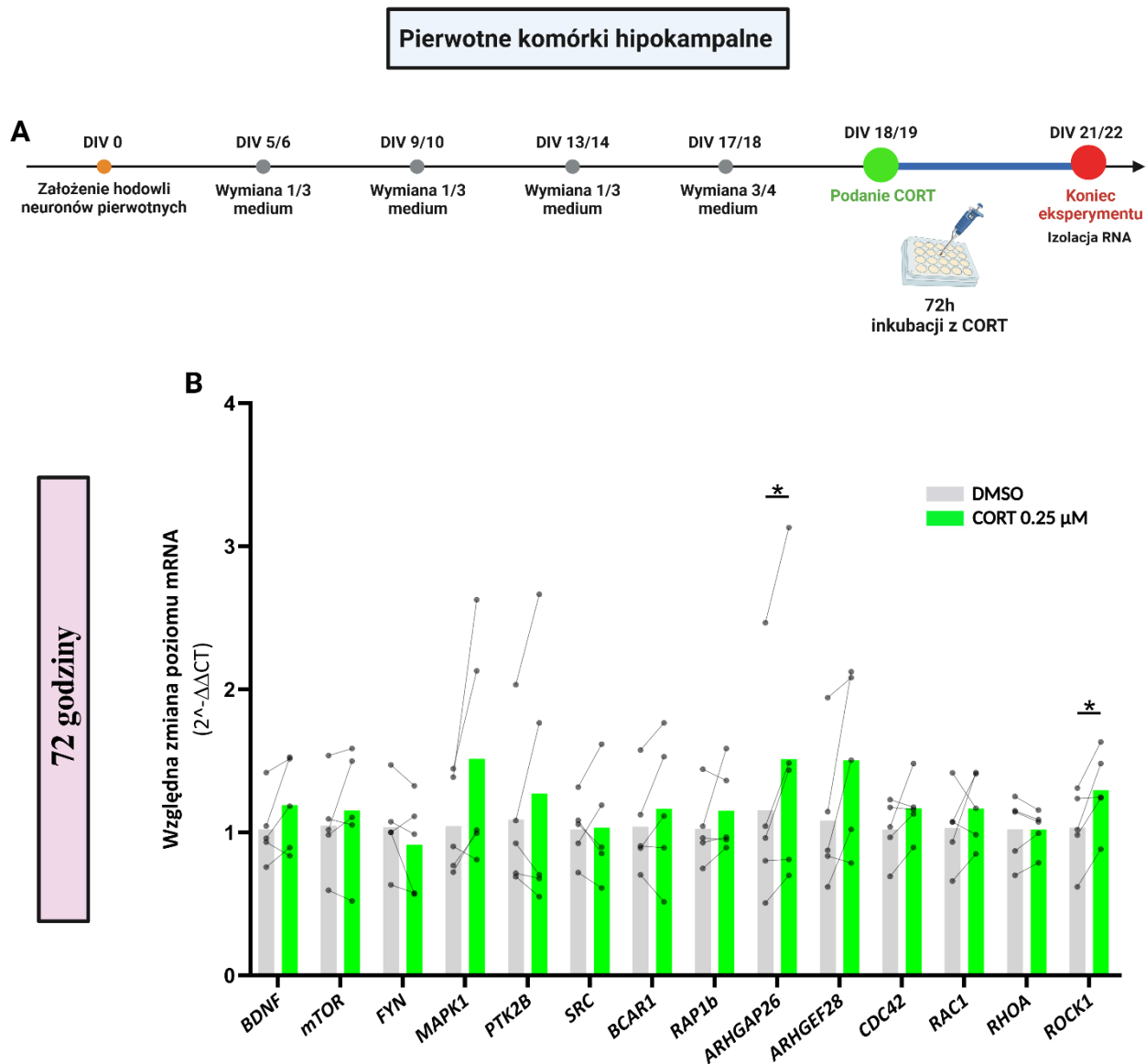
Rycina 4.15: Charakterystyka wpływu 72 i 48-godzinnej inkubacji korykalnych hodowli pierwotnych z 0.25 μ M CORT, na zmiany w poziomie mRNA genów kodujących białka związane z plastycznością synaptyczną i/lub wchodzące w interakcję z białkiem FAK

(A) Schemat doświadczenia, zawierający informację o momencie rozpoczęcia i zakończenia procedury eksperymentalnej, a także informację o materiale pobranym do dalszych analiz. (B) Poziom mRNA wybranych genów, kodujących białka związane z plastycznością synaptyczną oraz wchodzące w interakcję z białkiem FAK, po 72-godzinnej inkubacji korykalnych hodowli pierwotnych z DMSO lub 0.25 μ M CORT (C) Wpływ 48-godzinnej inkubacji korykalnych hodowli pierwotnych z 0.25 μ M CORT, na poziom mRNA genów, w przypadku których, po 72-godzinnej inkubacji z 0.25 μ M CORT, doszło do zmian względem grupy DMSO bądź zaobserwowano wyraźne tendencje. Czarne kółka na wykresach przedstawiają wyniki dla poszczególnych biologicznych replikatów. Linie łączą dane pochodzące z tego samego biologicznego replikatu. Wyniki uzyskano z co najmniej trzech niezależnych, biologicznych replikatów. Dane analizowane testem t-Studenta dla prób zależnych. Porównania grup DMSO i CORT 0.25 μ M, przeprowadzono dla każdego genu z osobna. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

4.8.2 Analiza hipokampalnych hodowli pierwotnych - poziom mRNA genów kodujących białka związane z plastycznością synaptyczną i/lub wchodzące w interakcję z białkiem FAK

W kwestii pierwotnych neuronów hipokampalnych, efekty 72-godzinnej inkubacji komórek z 0.25 μ M CORT, w porównaniu do grupy DMSO, wykazano w przypadku poziomu mRNA genów *ARHGAP26* (Ryc 4.16 B: sparowany test t-Studenta, $t=3.113$, $df=4$ $p=0.0358$) oraz *ROCK1* (sparowany test t-Studenta, $t=3.592$, $df=4$ $p=0.0229$). W obu tych przypadkach, zanotowano wzrost w poziomie mRNA, względem grupy DMSO. Tendencje wzrostowe zaobserwowano w poziomie mRNA genów *MAPK1* oraz *ARHGEF28*, tym niemniej, wyniki nie osiągnęły znamienności statystycznej. Poza wymienionymi istotnymi różnicami, a także nieistotnymi, ale wyraźnymi tendencjami wzrostowymi, nie zaobserwowano innych zmian.

Podsumowując, dane wskazują, że zastosowanie 72-godzinnej inkubacji 0.25 μ M CORT z hipokampalnymi hodowlami pierwotnymi, prowadzi do zmian względem grupy DMSO, które są ograniczone do dwóch z kilkunastu badanych genów.



Rycina 4.16: Charakterystyka wpływu 72-godzinnej inkubacji hipokampalnych hodowli pierwotnych z 0.25 μM CORT, na zmiany w poziomie mRNA genów kodujących białka związane z plastycznością synaptyczną i wchodzące w interakcję z białkiem FAK

(A) Schemat doświadczenia, zawierający informację o momencie rozpoczęcia i zakończenia procedury eksperymentalnej, a także informację o materiale pobranym do dalszych analiz. (B) Poziom mRNA wybranych genów, kodujących białka związane z plastycznością synaptyczną oraz wchodzące w interakcję z białkiem FAK, po 72-godzinnej inkubacji hipokampalnych hodowli pierwotnych z DMSO lub 0.25 μM CORT. Czarne kółka na wykresach przedstawiają wyniki dla poszczególnych biologicznych replikatów. Linie łączą dane pochodzące z tego samego biologicznego replikatu. Wyniki uzyskano z co najmniej trzech niezależnych, biologicznych replikatów. Dane analizowane testem t-Studenta dla prób zależnych. Porównania grup DMSO i CORT 0.25 μM, przeprowadzono dla każdego genu z osobna.

5. Dyskusja

Plastyczność synaptyczna leży u podłoża prawidłowego funkcjonowania mózgowia. W związku z tym, że dominujące w mózgowiu synapsy chemiczne zlokalizowane są na kolcach dendrytycznych, plastyczność synaptyczną można badać analizując morfologię i/lub gęstość kolców dendrytycznych. Nawet niewielkie odstępstwo od typowej morfologii kolców dendrytycznych, może prowadzić do zaburzeń działania na poziomie pojedynczej komórki oraz całej sieci neuronalnej. Dlatego zrozumienie jak różne czynniki biologiczne wpływają na morfologię kolców dendrytycznych, tym samym plastyczność synaptyczną, jest kluczowe. Jednym z czynników, które wpływają na morfologię kolców dendrytycznych, jest chronicznie podwyższony poziom CORT.

W niniejszej rozprawie, wykazano wpływ długotrwanie podniesionego poziomu CORT, na morfologię kolców dendrytycznych korykalnych oraz hipokampalnych neuronów pierwotnych. Wskazano specyficzne parametry morfologii kolców dendrytycznych, które ulegają zmianie w wyniku działania CORT oraz dowiedziono, że CORT wpływa na kolce dendrytyczne neuronów korykalnych i hipokampalnych w odmienny sposób.

Ponadto, w niniejszej rozprawie, wykazano znaczenie białka FAK w zmianach morfologicznych kolców dendrytycznych w ogóle, a także tych wywołanych chronicznie podniesionym poziomem CORT. Wykazano wpływ manipulacji aktywnością białka FAK na morfologię kolców dendrytycznych pierwotnych neuronów korykalnych oraz hipokampalnych. A także, wykazano, że za sprawą manipulacji aktywnością FAK, możliwe jest przeciwdziałanie efektom jakie długotrwanie podniesiony poziom CORT, wywiera na wybrane parametry morfologiczne kolców dendrytyczny pierwotnych neuronów korykalnych i hipokampalnych.

W dotychczasowych badaniach, wpływ CORT na morfologię kolców dendrytycznych określano stosując podejście oparte o ich kategoryzację, co może być obarczone utratą istotnych informacji dotyczących struktury kolców (Pchitskaya & Bezprozvanny, 2020). Ponadto, niewiele jest dostępnych danych, przedstawiających wpływ CORT na morfologię kolców dendrytycznych korykalnych oraz hipokampalnych neuronów pierwotnych, pomimo tego, że neurony pierwotne pozyskane z obu tych regionów mózgowia (kory mózgowej oraz hipokampa), wykorzystuje się do badania wpływu CORT na różne aspekty biologii komórki, inne niż morfologia (Bassil i in., 2023). Dlatego, badania przedstawione w niniejszej rozprawie, ukierunkowane na indukowanie zmian morfologicznych kolców dendrytycznych, poprzez chroniczną inkubację korykalnych oraz hipokampalnych komórek pierwotnych z podniesionym poziomem CORT, oraz ich późniejszą charakteryzację (w oparciu o analizę wybranych parametrów

morfologicznych, a nie kategoryzację), dostarczają nowych danych na temat wpływu CORT na aspekty biologii komórki nerwowej, związane z ich budową oraz plastycznością.

Mimo znaczącego postępu w zrozumieniu mechanizmów zjawiska zmian morfologicznych kolców dendrytycznych, także w wyniku działania CORT, nadal istnieje wiele niewiadomych dotyczących procesów zaangażowanych w owe zmiany i mediujących je białek. Dlatego, badania oparte o wywołanie i charakteryzację zmian morfologicznych kolców dendrytycznych, za sprawą chronicznie podwyższonego poziomu CORT, połączono z próbą zrozumienia jaką rolę w owych zmianach, może odgrywać białko FAK. Adaptorowy charakter białka FAK, integrującego sygnał z wielu źródeł (w tym m.in. czynników wzrostu), jego wysoka ekspresja w neuronach korykalnych oraz hipokampalnych, a także udowodnione zaangażowanie w plastyczność strukturalną neuronów, sytuują jako odpowiedniego kandydata do potencjalnego modulowania wpływu CORT na morfologię kolców dendrytycznych (S. G. Grant i in., 1995; Armendáriz i in., 2014b).

5.1 Hodowle pierwotne jako model badawczy zmian morfologicznych kolców dendrytycznych wywołanych CORT

Badania przedstawione w niniejszej pracy, przeprowadzono wykorzystując pierwotne hodowle korykalne oraz hipokampalne. Wybór modelu badawczego podyktowany był kilkoma powodami. Po pierwsze, zastosowanie hodowli pierwotnych umożliwia bardziej selektywne badanie wpływu CORT na zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych, a także, zwykle umożliwia bardziej selektywne wskazanie potencjalnych mechanizmów mediujących owe zmiany. W związku z izolowanym układem, składającym się jedynie z określonego typu komórek (w przypadku badań własnych, komórek hipokampalnych bądź korykalnych), wykluczyć można wpływ czynników innych niż te będące charakterystyczne dla danego regionu mózgowia, które w przypadku badań *in vivo*, mogłyby modulować efekty CORT. Dodatkowo, różnego rodzaju manipulacje eksperymentalne, w przypadku hodowli pierwotnych są zwykle znacznie prostsze technicznie do przeprowadzenia i często osiągają wyższe efektywności oddziaływania, np. transfekcja plazmidem bądź barwienie komórek indokarbacyjaniną (Beaudoin i in., 2012). Warto dodać, że wpływ jaki CORT wywiera na komórki pierwotne, jest zbieżny, przynajmniej częściowo, z efektami obserwowanymi *in vivo*, np. tak jak w przypadku badań *in vivo*, długotrwała inkubacja komórek z podwyższonym CORT, skutkuje spadkiem poziomu białka TrkB (Kutiyanawalla i in., 2011; Pandya i in., 2014b).

Należy jednak pokreślić ograniczenia związane z zastosowaniem uproszczonego modelu badawczego opartego o hodowle pierwotne. Funkcjonowanie pierwotnych neuronów korykalnych oraz

hipokampalnych, bez projekcji dochodzących (tak jak w warunkach *in vivo*) z innych regionów mózgowia, skutkuje zubożeniem aktywności fizjologicznej, względem warunków *in vivo*. Ponadto, zarówno skład zwykle wykorzystywanych mediów hodowlanych jak i zwykle stosowane podłoża, nie są doskonałym odzwierciedleniem warunków *in vivo* (Bardy i in., 2015). Zapewnienie właściwego podłoża do wzrostu wydaje się szczególnie istotne, biorąc pod uwagę, że zmiany morfologiczne są w dużym stopniu zależne od adhezji komórek do macierzy zewnątrzkomórkowej (Włodarczyk i in., 2011; Levy i in., 2014).

Co więcej, należy mieć na uwadze, że wydzielanie CORT ma charakter rytmiczny, co w przypadku projektowania eksperymentów z wykorzystaniem hodowli pierwotnych, jest trudne do odtworzenia (Lightman i in., 2008, 2020). Brak możliwości odtworzenia rytmiki wydzielania CORT w warunkach *in vitro*, upraszcza wpływ CORT na komórki pierwotne (np. wpływ na proces transkrypcji genów) i prawdopodobnie skutkuje ograniczonym obrazem potencjalnych efektów CORT, jaki uzyskuje się w badaniach.

5.2 Ocena zastosowanej metody ekspozycji hodowli pierwotnych na CORT oraz wpływ zróżnicowanych stężeń CORT na podstawowe parametry funkcjonowania komórek pierwotnych

Głównym celem badań przedstawionych w niniejszej pracy, było scharakteryzowanie wpływu długotrwale podniesionego poziomu CORT, na kolce dendrytyczne neuronów korykalnych i hipokampalnych oraz pogłębienie wiedzy o mechanizmach strukturalnej plastyczności synaptycznej wywołanej CORT, w korykalnych i hipokampalnych hodowlach pierwotnych.

Dlatego, w niniejszej pracy, układ eksperymentalny oraz zastosowane stężenia i czas inkubacji z CORT, starano się dobrać w sposób umożliwiający wywołanie zmian w morfologii kolców dendrytycznych neuronów pierwotnych, by następnie zaobserwowane zmiany scharakteryzować. Jednakże, z uwagi na nieliczne dane, brak wystandaryzowanych protokołów stosowania CORT i wytycznych dotyczących projektowania eksperymentów łączących CORT oraz hodowlę pierwotne (Bassil i in., 2022, 2023), w początkowym etapie badań, zweryfikowano zaplanowany układ eksperymentalny.

Sprawdzono jak: schemat wymiany medium, wybrany czas inkubacji komórek z CORT oraz wykorzystane stężenia CORT, wpływają na podstawową sygnalizację glikokortykoidową oraz na przeżywalność korykalnych i hipokampalnych komórek pierwotnych.

5.2.1 Zastosowany schemat wymiany medium hodowlanego

W pierwszym etapie, w związku z niesprecyzowanym stężeniem CORT, jakie zawiera komercyjnie dostępny suplement B27, będący jedynym ze składników medium hodowlanego, a także z faktem powinowactwa CORT do plastiku oraz jego degradacją; oszacowano poziom CORT w medium hodowlanym oraz sprawdzono czy za sprawą wykorzystanego schematu wymiany medium hodowlanego, dochodzi do planowanego obniżenia poziomu CORT (Kelava i in., 2022). Zgodnie z założeniem, uzyskane wyniki pokazały prawie całkowitą eliminację CORT po ostatniej wymianie medium, która miała miejsce na dzień przed rozpoczęciem danej procedury eksperymentalnej.

Przyjęty schemat wymiany medium, polegający na stopniowym usuwaniu CORT z medium hodowlanego, wynikał przede wszystkim z dwóch powodów. Pierwszym z nich, była potrzeba precyzyjnego określenia czasu ekspozycji hodowli pierwotnych na CORT oraz na wybrane stężenia CORT. Wymiana medium hodowlanego, na takie, które zawiera suplement B27, zawierający również CORT w nieznanym stężeniu, ograniczałaby możliwość oszacowania faktycznego stężenia CORT jakie działa na komórki pierwotne.

Drugi powód związany był z koniecznością ograniczenia sygnału wynikającego z pobudzenia receptorów MR i zwiększenia wrażliwości receptorów GR na CORT. Stopniowe obniżanie poziomu CORT w medium hodowlanym (przed ekspozycją na zdefiniowane stężenie CORT), zwiększa prawdopodobieństwo pojawienia się efektów związanych z plastycznością synaptyczną na skutek ekspozycji eksperymentalnej. Ponadto, stopniowe obniżanie CORT w medium hodowlanym, ogranicza do sygnalizacji zależnej od receptorów GR, proces odpowiedzialny za wywołanie zmian plastycznych. Jak pokazują badania, zminimalizowanie pobudzenia MR (co dzieje się za sprawą obniżania poziomu CORT w medium hodowlanym), prowadzi do obniżenia podstawowej ekspresji genu *FKBP5*, kodującego białko FKBP51 (które działa antagonistycznie wobec receptora GR). W konsekwencji dochodzi do sensytyzacji receptora GR i jego ostrej, izolowanej (od MR) odpowiedzi na działanie CORT (Hartmann i in., 2021; De Kloet, 2022).

Podobny schemat wymiany medium, polegający na redukcji CORT znajdującego się w medium hodowlanym (przed ekspozycją na zdefiniowane stężenie CORT), zastosowano również w innych pracach, w których badano wpływ CORT na biologię neuronalnych komórek pierwotnych (Jeanneteau i in., 2008; Cabrera i in., 2014; Arango-Lievano i in., 2015).

Układ eksperymentalny wykorzystany w badaniach własnych, polegający na długotrwałe podniesionym poziomie CORT, zdaje się częściowo odzwierciedlać efekty pojawiające się na skutek

ekspozycji na chroniczny stres bądź te występujące w chorobie Cushinga. Zarówno w przypadku chronicznego stresu jak i choroby Cushinga, dochodzi do zaburzenia rytmów dobowych i ultradobowych i długotrwanie utrzymującego się, podwyższonego poziomu CORT (lub kortyzolu w chorobie Cushinga) (Van Den Berg i in., 1995; Sterlemann i in., 2008).

5.2.2 Dobór stężeń CORT oraz czasu inkubacji hodowli pierwotnych z CORT

Wykorzystane w badaniach własnych stężenia CORT, dobrano na podstawie literatury przedmiotu, zwracając szczególną uwagę na prace, w których badano wpływ CORT na plastyczność synaptyczną oraz morfologię komórek. A także, biorąc pod uwagę fakt, że stężenia CORT, bliskie tym obserwowanym w mózgowiu, w sytuacjach np. chronicznego stresu, nie zawsze wywierają wpływ na pierwotne komórki neuronalne (co może być związane z m.in. adsorpcją CORT do plastiku) (Tanokashira i in., 2012).

Stężenia CORT wykorzystane w przedstawionych badaniach, były relatywnie wyższe ze względu na ich częściowo narzędziowy charakter. Nie odbiegały one jednak od tych wykorzystywanych w większości prac, badających efekty CORT w kontekście pierwotnych hodowli komórek mózgowia. Stężenia te zwykle oscylują w zakresie od 0.1 μM do 1 μM i wywołują efekty bezpośrednio oraz niebezpośrednio związane z plastycznością synaptyczną, takie jak m.in. przebudowa morfologiczna kolców dendrytycznych czy spadek poziomu receptora TrkB (Du i in., 2009; Tanokashira i in., 2012; Pandya i in., 2014b; Bassil i in., 2023). Czas inkubacji hodowli pierwotnych z CORT, który ustalono na 72 godziny, również dobrano na podstawie literatury przedmiotu. 72-godzinna inkubacja hodowli pierwotnych z CORT, była wystarczająca do wywołania spadku w poziomie mitochondrialnego receptora GR i przeciwapoptotycznego białka Bcl-2. Analogiczne efekty zaobserwowano w badaniach *ex vivo*, po długotrwałej, dwutygodniowej ekspozycji szczurów na CORT, co potwierdza adekwatność 72-godzinnej inkubacji komórek pierwotnych z CORT (Du i in., 2009).

5.2.3 Ekspresja genów *FKBP5* oraz *NR3C1* – wybrane elementy sygnalizacji wzbudzonej przez glikokortykoidy

W kolejnym etapie, w celu weryfikacji efektów stałego, długotrwanie podniesionego poziomu CORT, a także dokładniejszego określenia efektów zastosowanego układu eksperymentalnego (w tym schematu wymiany medium, wykorzystanego czasu inkubacji z CORT oraz wybranych stężeń CORT), sprawdzono poziom mRNA genów *FKBP5* oraz *NR3C1*.

Zarówno w przypadku pierwotnych hodowli korykalnych jak i hipokampalnych, zaobserwowano kilkukrotny wzrost mRNA genu *FKBP5*, po inkubacji z każdym z zastosowanych stężeń CORT, co

potwierdza efekty pojawiające się w badaniach innych autorów (Shiraki i in., 2025). Pomimo braku istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupą DMSO, a grupami CORT 0.25 μM i CORT 0.50 μM , w przypadku pierwotnych neuronów korykalnych, ponad kilkukrotna tendencja wzrostowa względem grupy DMSO, po każdym z tych stężeń CORT oraz brak różnic pomiędzy określonymi stężeniami CORT, sugerują bliską nasyceniu odpowiedź transkrypcyjną genu *FKBP5*, już po najniższym zastosowanym stężeniu – 0.25 μM CORT i jej stabilizację na maksymalnym poziomie przy stężeniach CORT 0.50 μM i 1 μM . W przypadku pierwotnych komórek hipokampalnych, istotny statystycznie wzrost poziomu mRNA genu *FKBP5*, również zaobserwowano jedynie po najwyższym stężeniu CORT - 1 μM . Najniższe, 0.25 μM stężenie CORT, doprowadziło do ponad dwukrotnej tendencji wzrostowej względem DMSO, której podobny poziom zaobserwowano także po 0.50 μM CORT. Wydaje się jednak, że inkubacja pierwotnych komórek hipokampalnych z CORT, inaczej niż w przypadku komórek korykalnych, prowadzi do granicznej wartości ekspresji *FKBP5*, jedynie w efekcie ekspozycji komórek na najwyższe 1 μM stężenie CORT. A poziom mRNA genu *FKBP5*, ma w większym stopniu charakter dawkozależny. Najprostszym wyjaśnieniem różnego typu odpowiedzi pierwotnych komórek hipokampalnych na CORT, w zakresie poziomu mRNA genu *FKBP5*, może być fakt innej proporcji receptorów MR i GR (zwykle wyższe poziomy MR obserwuje się w hipokampie), znajdującej się na komórkach hipokampalnych gryzoni względem komórek korykalnych. Inne wyjaśnienie obejmuje wyższy podstawowy poziom mRNA *FKBP5* w hipokampie, świadczący o najpewniej wyższym poziomie białka FKBP51 i wynikającym z tego, mniejszym powinowactwie CORT do receptorów GR w komórkach hipokampalnych (Reul & Kloet, 1985b; Ahima i in., 1991; Scharf i in., 2011). Co ciekawe, podobną zależność i wyższe poziomy mRNA genu *FKBP5* w obszarze kory w porównaniu do obszaru hipokampa, na skutek działania CORT, zaobserwowano również w badaniach *ex vivo*, przeprowadzonych przez innych autorów (Shiraki i in., 2025).

W przypadku poziomu mRNA genu *NR3C1*, jedyne zaobserwowane zmiany dotyczyły pierwotnych hodowli korykalnych i obejmowały spadek poziomu mRNA w grupie CORT 0.50 μM , względem grupy DMSO oraz w grupie CORT 0.50 μM i CORT 1 μM , względem grupy CORT 0.25 μM . Zaobserwowane rezultaty są najprawdopodobniej, wyrazem mechanizmów samoograniczenia sygnalizacji glikokortykoidowej, które pojawiły się przy wyższych stężeniach CORT. Owe mechanizmy mogą obejmować obserwowane w innych pracach, zwiększenie aktywności wybranych microRNA, na skutek inkubacji hodowli pierwotnych z CORT bądź DEX, które nie tylko hamują translację mRNA genu *NR3C1*, ale i zwiększają degradację samego transkryptu (Dwivedi i in., 2015; Roy i in., 2017). Co

ciekawe, pojawienie się zmian w przypadku pierwotnych komórek korykalnych, ale nie hipokampalnych, koresponduje z wynikami obserwowanymi w przypadku poziomu mRNA genu *FKBP5* w pierwotnych hodowlach korykalnych. Spadek poziomu mRNA genu *NR3C1* w wyniku działania CORT o stężeniach 0.50 μM i 1 μM i jednoczesny wzrost w zakresie poziomu mRNA genu *FKBP5*, który wydaje się stabilizować na poziomie maksymalnym przy tych samych stężeniach CORT (0.50 μM i 1 μM), skłania do wniosku, że te stężenia CORT, skutkują nasyceniem odpowiedzi transkrypcyjnej i wywołują aktywację pętli ograniczających. W efekcie, dochodzi do spadku w poziomie receptora GR i ograniczenia dalszego wzrostu ekspresji określonych genów zależnych od GR, pomimo utrzymującego się, wysokiego poziomu CORT. Brak zmian w poziomie mRNA genu *NR3C1* w przypadku pierwotnych komórek hipokampalnych, pozostaje w zgodzie z hipotezą, że w związku z większą ilością receptorów MR na tych komórkach i wyższym podstawowym poziomem mRNA *FKBP5*, wykorzystywane w badaniach stężenia nie były wystarczające do wywołania nasycenia odpowiedzi transkrypcyjnej, co uwidacznia i potwierdza względny poziom mRNA genu *FKBP5*.

5.2.4 Zastosowany układ eksperymentalny a cytotoksyczność

Ostatecznie, zbadano wpływ 72-godzinnej inkubacji korykalnych oraz hipokampalnych hodowli pierwotnych z różnymi stężeniami CORT, na poziom LDH. Celem tego eksperymentu, było zidentyfikowanie stężenia CORT, które nie wywołuje cytotoksyczności.

Poziom LDH rośnie w medium hodowlanym, na skutek dezintegracji błony komórkowej, co może wskazywać na zwiększoną śmiertelność komórek. W badaniach własnych, jedynie najwyższe, 1 μM stężenie CORT, wyłącznie w przypadku pierwotnych komórek hipokampalnych, prowadziło do istotnego wzrostu poziomu LDH w medium hodowlanym. Zaobserwowane rezultaty są zbieżne z danymi literaturowymi, zgodnie z którymi, stężenia CORT oscylujące wokół bądź wyższe niż 1 μM , prowadzą do degeneracji i/bądź śmierci komórek mózgowia (Liu i in., 2011; Kurek i in., 2016; Hyun i in., 2022; M. Zhang i in., 2021). Warto jednak zwrócić uwagę, że dane znajdujące się w literaturze przedmiotu są niejednoznaczne. Mimo obecności badań, w których wysokie stężenia CORT (powyżej 1 μM) były potrzebne do wywołania negatywnego efektu na przeżywalność komórek, w części prac obserwowano spadek przeżywalności komórek, na skutek niższych stężeń CORT, oscylujących w granicach 0.1-0.5 μM (Zhu i in., 2006; Liu i in., 2011).

Podsumowując, przyjęty schemat stopniowej wymiany medium, prowadził do oczekiwanej redukcji poziomu CORT w medium hodowlanym. Dodatkowo, wykazano, że wykorzystany układ eksperymentalny (stężenia CORT oraz czas inkubacji hodowli pierwotnych z CORT), prowadzi do zmian w sygnalizacji glikokortykoidowej, które są analogiczne do wyników opisanych w innych pracach badawczych. Ostatecznie, zaobserwowano, że jedynie najwyższe wykorzystane stężenie CORT (1 μM), wyłącznie w przypadku pierwotnych hodowli hipokampalnych, skutkuje zwiększonym poziomem LDH w medium. Tak więc, zidentyfikowano stężenia CORT, które indukując odpowiedź komórkową, nie wywołują cytotoxyczności.

5.3 Ocena wpływu zróżnicowanych stężeń CORT na morfologię korykalnych oraz hipokampalnych neuronów pierwotnych

Dysponując uzyskanymi eksperymentalnie danymi na temat wpływu wybranych stężeń CORT na podstawową sygnalizację glikokortykoidową oraz przeżywalność hodowli pierwotnych, w kolejnym etapie badań, określono wpływ różnych stężeń CORT na morfologię korykalnych i hipokampalnych neuronów pierwotnych. Celem tych eksperymentów, było zidentyfikowanie stężenia CORT, które nie wpływa na morfologię neuronów pierwotnych.

W przeprowadzonych badaniach, określano całkowitą długość oraz liczbę dendrytów, które zwizualizowano wykorzystując transfekcję komórek plazmidem z sekwencją kodującą białko GFP. Wykorzystany sposób pomiaru ogólnej morfologii neuronów, oparty na zmianach zachodzących na poziomie dendrytów, jest dobrze opisanym w literaturze przedmiotu, sposobem określenia wpływu różnych czynników na strukturę neuronów.

W przypadku pierwotnych neuronów korykalnych, uzyskane dane wskazały spadek całkowitej długości i liczby dendrytów, po zastosowaniu 0.50 μM i 1 μM stężenia CORT, względem grupy DMSO oraz grupy CORT 0.25 μM . Najniższe wykorzystane stężenie CORT - 0.25 μM , nie spowodowało zmian w porównaniu do grupy DMSO. Tak więc, to jedynie 0.50 μM i 1 μM stężenia CORT, doprowadziły do zmian morfologicznych pierwotnych neuronów korykalnych. Co ciekawe, badania innych autorów, przedstawiające wpływ długotrwale podniesionego poziomu CORT na morfologię dendrytów neuronów korykalnych, są nieliczne. W jednej z prac, wykazano, że 3 tygodniowa ekspozycja szczurów na wolno uwalniającą się, wysoką dawkę CORT, prowadzi do spadku długości dendrytów apikalnych, ale nie bazalnych, w części prelimbiczej kory przedczołowej. Jednakże, w tej samej pracy, nie wykazano spadku liczby wypustek dendrytycznych (Anderson i in., 2016a). Wyniki przedstawione w innej pracy, wskazują wzrost, a nie spadek długości oraz liczby dendrytów apikalnych warstwy drugiej i trzeciej kory motorycznej, po chronicznej, 7-dniowej ekspozycji szczurów na CORT (Kula i in., 2017). Obserwowane rozbieżności w ramach przytoczonych badań, mogą być efektem analizy różnych regionów kory, a także

wpływu innych czynników, takich jak np. noradrenalina, których aktywność jest ograniczona w izolowanym środowisku hodowli pierwotnych. Niestety, liczba prac podejmujących podobną tematykę, w których wykorzystano hodowle pierwotne jest niewielka. W jednej z takich prac, 20 minutowa inkubacja korykalnych komórek pierwotnych z 0.50 μM CORT, również doprowadziła do spadku długości dendrytów, która była odwracalna za sprawą ketaminy (Sala i in., 2022). W innej pracy, gdzie wykorzystano ludzkie komórki macierzyste różnicowane w neurony glutaminianergiczne, wykazano spadek całkowitej długości neurytów, po 1 μM , ale nie 0.1 μM stężeniu hydrokortyzolu, działającego na neurony przez 24 godziny (Seah i in., 2025). Dwa ostatnie z przytoczonych powyżej badań, potwierdzają, że w przypadku hodowli *in vitro*, ekspozycja komórek na stężenia CORT w zakresie 0.5-1 μM , podobnie jak w badaniach własnych, prowadzi do jednoznacznych rezultatów (inaczej niż w przypadku eksperymentów *ex vivo*), jakim jest zubożenie drzewa dendrytycznego. Zajście zmian w morfologii dendrytów, na skutek inkubacji neuronów korykalnych z 0.50 μM i 1 μM CORT, a także spadek w poziomie mRNA genu *NR3C1*, również tylko za sprawą tych dwóch stężeń CORT, sugerują związek pomiędzy tymi dwoma wynikami i potencjalnie inny wzór aktywności transkrypcyjnej w przypadku wyższych niż 0.25 μM stężeń CORT, skutkujący np. zajściem ekspresji genów, która nie pojawia się w przypadku stężenia niższego.

W przypadku pierwotnych hodowli hipokampalnych, zmiany w morfologii neuronów, wykazano za sprawą najwyższego wykorzystanego stężenia CORT - 1 μM . Zaobserwowano redukcję całkowitej długości dendrytów względem grupy DMSO oraz grupy CORT 0.25 μM , a także spadek w liczbie dendrytów, jednakże, w przypadku tego parametru, jedynie w porównaniu do grupy kontrolnej (DMSO). Nie wykazano różnic pomiędzy innymi grupami. Podobnie jak w przypadku neuronów korykalnych, badania podejmujące tematykę wpływu CORT na morfologię pierwotnych neuronów hipokampalnych są nieliczne. W jednym z nich, 3 dniowa inkubacja pierwotnych neuronów hipokampalnych z 0.20 μM CORT, doprowadziła do spadku długości dendrytów. Co ciekawe, podobnie jak w przypadku neuronów korykalnych, zaobserwowane zmiany w strukturze dendrytów, cofnięto wykorzystując ketaminę (Mingardi i in., 2021b). Stężenie CORT, użyte w opisanych powyżej badaniach było niższe niż stężenie CORT, które w badaniach własnych nie wywołało efektu (0.25 μM). Przepuszczalnie, jest to wyniki specyficznej konstrukcji eksperymentu, która polegała na dodawaniu 0.20 μM CORT, dwa razy dziennie, każdego dnia inkubacji komórek z CORT. Tak więc, w związku z powolną degradacją CORT, stężenie CORT faktycznie oddziałujące na neurony pierwotne, prawdopodobnie znacznie przewyższało 0.20 μM (Mingardi i in., 2021b). Badania prowadzone *ex vivo*, na materiale pozyskanym z gryzoni eksponowanych

na chroniczne działanie CORT, potwierdzają efekty obserwowane *in vitro* i wskazują spadek liczby wypustek dendrytów apikalnych, w obszarze CA3 hipokampa, po 21-dniowych podaniach CORT (Woolley i in., 1990). Podobnie, zaobserwowano spadek długości dendrytów, dojrzałych komórek zakrętu zębatego hipokampa, będący efektem podań CORT trwających 14 dni (Yau i in., 2016). Zmiany zachodzące jedynie za sprawą najwyższego, 1 μM stężenia CORT, w przypadku pierwotnych neuronów hipokampalnych (inaczej niż w przypadku neuronów korykalnych), mogą być efektem wyższego podstawowego poziomu mRNA genu *FKBP5* w komórkach hipokampalnych, co z kolei może skutkować słabszą odpowiedzią neuronów na wykorzystane w badaniach stężenia CORT.

Ze względu na pozytywne działanie ketaminy w przypadku hodowli pierwotnych z obu regionów mózgowia (kory oraz hipokampa), opisane powyżej badania *in vitro*, wspierają hipotezę o ekscytotoksyczności jako prawdopodobnej przyczynie atrofii dendrytów wywołanej chronicznym stresem i CORT. Pierwsze doniesienia na ten temat, pochodzą z badań *in vivo*, w przypadku których, podanie kompetytywnego antagonisty receptora NMDA – substancji CGP 43487, znosiło wywołaną chronicznym stresem (któremu towarzyszył podwyższony poziom CORT), redukcję długości dendrytów oraz ich liczby w obszarze CA3 hipokampa (Magarinos & McEwen, 1995). Inną prawdopodobną przyczyną redukcji drzewa dendrytycznego wywołaną CORT, może być zwiększony poziom białka NRSF (ang. *neuron-restrictive silencer factor*), będący efektem działania CORT, a także ekspozycji zwierząt na chroniczny stres. Hipotezę związaną z białkiem NRSF uprawdopodobnia fakt, że podania ketaminy, prowadzące do normalizacji drzewa dendrytycznego, normalizują również poziom NRSF (Mingardi i in., 2021b).

Podsumowując, w badaniach własnych wskazano stężenia CORT, które nie prowadzą do zmian morfologicznych neuronów korykalnych oraz hipokampalnych. W przypadku hodowli pierwotnych z obu badanych regionów mózgowia, nie zaobserwowano zmian w całkowitej długości oraz liczbie dendrytów, na skutek 72-godzinnej inkubacji neuronów z najniższym stężeniem CORT - 0.25 μM . Natomiast efekty obserwowane na skutek zastosowania wyższych stężeń, są zbieżne z efektami CORT obserwowanymi w innych badaniach *in vitro* oraz przynajmniej częściowo z tymi, które obserwowano *ex vivo*.

5.4 Ocena wpływu zróżnicowanych stężeń CORT na morfologię kolców dendrytycznych oraz stabilność synaps korykalnych i hipokampalnych neuronów pierwotnych

Jednym z głównych aspektów badań przedstawionych w niniejszej pracy, było wywołanie strukturalnej plastyczności kolców dendrytycznych, pod wpływem długotrwałej inkubacji korykalnych i hipokampalnych hodowli pierwotnych z wybranymi stężeniami CORT, a następnie scharakteryzowanie

zaobserwowanych zmian. Morfologię kolców dendrytycznych, podobnie jak w przypadku poprzednich eksperymentów, charakteryzowano po 72-godzinnej inkubacji hodowli pierwotnych z wcześniej wykorzystywanymi stężeniami CORT. W celu wizualizacji struktury kolców, neurony pierwotne barwiono wykorzystując lipofilną indokarbacyjaninę. Wykorzystanie indokarbacyjaniny umożliwia wizualizację kolców dendrytycznych po utrwaleniu hodowli pierwotnych, co eliminuje negatywne aspekty innych metod, jak np. wywołaną transfekcją neuronów pierwotnych, nadekspresję GFP, które w przypadku wysokiego poziomu w komórce, może negatywnie wpływać na fizjologię i obserwowane parametry morfologiczne (Detrait i in., 2002; Uemura i in., 2016).

W badaniach przedstawionych w niniejszej pracy, określano wpływ CORT na gęstość kolców dendrytycznych, a także wybrane parametry strukturalne kolców, takie jak długość kolców dendrytycznych, szerokość ich głów oraz bezskalowy parametr, którym był stosunek długości kolców dendrytycznych do szerokości ich głów. Sposób analizy, polegający na określeniu specyficznych parametrów morfologii kolców dendrytycznych, bez zwykle stosowanego podziału na kategorie, umożliwia uniknięcie potencjalnych błędów i niedokładności, wynikających ze stosowania arbitralnych kryteriów podziału kolców, często różniących się pomiędzy pracami. I tak, podejście oparte o kategoryzację kolców dendrytycznych, utrudnia wyciąganie wniosków o wpływie danego oddziaływania eksperymentalnego na ich strukturę. Może bowiem skutkować utratą informacji w przypadku nie dość wielkiego efektu manipulacji eksperymentalnej, np. zaobserwowana zmiana strukturalna danego kolca dendrytycznego, mimo istotnego znaczenia funkcjonalnego, może nie być wystarczająca do umieszczenia go w innej kategorii morfologicznej. Z tym związany jest również kolejny problem, mianowicie, kategoryzowanie kolców dendrytycznych skutkuje utratą informacji na temat różnic potencjalnie pojawiających się wewnątrz danej kategorii morfologicznej. Dodatkowych wątpliwości dostarcza pytanie, na ile zasadne jest zastosowanie tych samych kryteriów porządkowania kolców dendrytycznych w określone kategorie, dla neuronów pierwotnych pochodzących z różnych regionów mózgowia. Ostatecznie, o wiele łatwiej wskazać jak dana zmiana morfologiczna, np. w zakresie szerokość głowy kolca bądź szerokości szyi kolca, może być powiązana z potencjalną zmianą w zakresie funkcjonalnym, niż w przypadku podejścia opartego o kategoryzację (Pchitskaya & Bezprozvanny, 2020; Bączyńska i in., 2021).

5.4.1 Wpływ CORT na kolce dendrytyczne korykalnych neuronów pierwotnych

W przypadku pierwotnych neuronów korykalnych, zastosowanie najwyższego, 1 μ M stężenia CORT, wywołało spadek gęstości kolców dendrytycznych. Mimo tendencji wzrostowej spowodowanej

każdym z badanych stężeń CORT, nie wykazano zmian w zakresie przeciętnej długości kolców dendrytycznych, względem grupy DMSO. Jednakże, inkubacja kortykalnych neuronów pierwotnych z CORT, spowodowała spadek przeciętnej szerokości głów kolców dendrytycznych i wzrost przeciętnego stosunku długości kolców do szerokości ich głów, w porównaniu do grupy kontrolnej (DMSO), niezależnie od zastosowanego stężenia CORT. Tym samym, wykazano, że najniższe wykorzystane stężenie CORT (0.25 μM), które w poprzednich eksperymentach nie wpływało ani na przeżywalność kortykalnych komórek pierwotnych, ani na ich ogólną morfologię, doprowadziło do zmian w strukturze kolców dendrytycznych, które były analogiczne do tych obserwowanych po zastosowaniu wyższych stężeń CORT.

Szczególnie dyskusyjne, są wyniki dotyczące gęstości kolców dendrytycznych. Mimo wyraźnych tendencji spadkowych, pojawiających się po każdym ze stężeń CORT, znaczące zmiany, wykazano jedynie po zastosowaniu najwyższego - 1 μM stężenia CORT. Wytlumaczeniem dla braku zmian w gęstości kolców dendrytycznych, w przypadku zastosowania niższych niż najwyższe stężenie CORT (1 μM), może być fakt zbyt niskiej liczby biologicznych replikatów, która, gdyby podwojona w pozostałych grupach eksperymentalnych, prawdopodobnie pozwoliłaby na przekroczenie granicy istotności statystycznej. Ze względu na brak badań, dotyczących wpływu długotrwałe podniesionego poziomu CORT na kolce dendrytyczne kortykalnych neuronów pierwotnych, obserwowane efekty w zakresie gęstości kolców, można odnieść jedynie do analiz prowadzonych *in vivo* bądź *ex vivo*. I tak, rezultaty obserwowane w badaniach własnych, związane ze spadkiem gęstości kolców, są zbieżne z tymi uzyskiwanymi w innych pracach, gdzie chroniczne podania CORT prowadziły do ubytku kolców dendrytycznych neuronów znajdujących się w różnych obszarach kory mózgowej (Gourley i in., 2013b; Anderson i in., 2016a; Moda-Sava i in., 2019).

Niestety, ze względu na brak danych pochodzących z hodowli pierwotnych, a także fakt stosowania kategoryzacji kolców dendrytycznych w większości badań przeprowadzonych *in vivo* bądź *ex vivo*, interpretacja uzyskanych rezultatów, odnoszących się do wybranych parametrów morfologicznych kolców dendrytycznych, jest częściowo utrudniona. Trudno np. znaleźć jednoznaczne dane dotyczące wpływu długotrwałe podniesionego poziomu CORT na długość kolców dendrytycznych. Wyniki uzyskane w badaniach własnych, wskazujące niewielką tendencję wzrostową w zakresie przeciętnej długości kolców dendrytycznych, obserwowane na skutek działania CORT, są sprzeczne z większością innych badań, które wskazują spadek przeciętnej długości kolców w korze mózgowej, na skutek zwiększonego poziomu CORT (Gourley i in., 2012; Anderson i in., 2014). W pozostałych badaniach,

gdzie analizowano parametr długości kolców korykalnych, podobnie jak w przypadku wyników własnych, nie wykazano istotnych statystycznie efektów CORT w tym zakresie (Barfield i in., 2020). Warto również zwrócić uwagę, że w części badań łączących CORT (bądź chroniczny stres) oraz kolce dendrytyczne, często całkowicie pomijano kategorię kolców filopodialnych, mogącą ewentualnie odzwierciedlać wzrost liczby kolców długich, a kolce relatywnie długie, posiadające wąską głowę, kategoryzowano jako kolce cienkie. Jest to efekt kilku czynników, w tym m.in. niewielkiej liczby kolców filopodialnych w mózgowiach dojrzałych osobników (Tremblay i in., 2010; Ozcan, 2017).

Wynikiem często powtarzającym się w pracach, analizujących wpływ CORT na morfologię kolców dendrytycznych kory mózgowia, zbieżnym z rezultatami badań własnych, jest obserwacja spadku objętości bądź szerokości głowy kolców na skutek chronicznego zastosowania CORT, które zwykle raportowane jest w kontekście zmian w ramach kategorii morfologicznych kolców dendrytycznych (Anderson i in., 2016a; Barfield i in., 2020).

Ostatecznie, wykorzystując bezskalowy parametr oceny morfologii kolców dendrytycznych, wykazano, że dochodzi do wzrostu stosunku długości kolców do szerokości ich głów. Taka obserwacja wskazuje na większy udział długich kolców dendrytycznych, które jednocześnie charakteryzuje węższa głowa. Obserwowany wzrost w przypadku tego parametru, w przedstawionych badaniach własnych jest w głównej mierze, efektem spadku szerokości głów kolców. Wskazany parametr nie był często wykorzystywany w dotychczasowych badaniach. Jednakże, w związku z dostrzeżeniem, że kształt kolców przyjmuje formę kontinuum i wynikającym z tego odchodzeniem od kategoryzacji kolców dendrytycznych, wykorzystanie tego parametru pojawia się w coraz większej ilości prac (Bijata i in., 2022; Bączyńska i in., 2024).

Uzyskane dane, dotyczące morfologii kolców dendrytycznych, wskazują na potencjalne osłabienie połączeń synaptycznych, do jakiego dochodzi na skutek zastosowania 72-godzinnej inkubacji korykalnych neuronów pierwotnych z CORT. Wydłużenie kolców dendrytycznych, skutkuje osłabioną amplitudą uEPSP (ang. *uncaging excitatory postsynaptic potential*). Szerokość głowy kolców jest z kolei pozytywnie skorelowana z amplitudą uEPSC (ang. *uncaging excitatory postsynaptic currents*), a spadek szerokości głowy, może wskazywać na spadek stabilności synapsy (rozumianej jako prawdopodobieństwo eliminacji kolca dendrytycznego, tym samym połączenia synaptycznego), szczególnie biorąc pod uwagę, że LTP skutkuje wzrostem głowy kolca i większą stabilnością badanego połączenia, podczas gdy LTD, skutkujące zmniejszeniem głowy kolca, jest związane z większym prawdopodobieństwem eliminacji kolca i utraty połączenia (Holtmaat i in., 2005b; Yasumatsu i in., 2008;

Oh i in., 2013a; Compans i in., 2021). Zgromadzone dane dotyczące bezskalowego parametru, potwierdzają wyżej opisane wnioski i razem z pozostałymi badanymi parametrami, wskazują na osłabienie siły połączeń obserwowane w badaniach własnych.

5.4.2 Wpływ CORT na stabilność synaps kortykalnych neuronów pierwotnych

W związku z zaobserwowanym wpływem CORT na morfologię kolców dendrytycznych, a także wyraźną tendencją spadkową w zakresie gęstości kolców, co wspólnie może wiązać się ze spadkiem stabilności połączeń synaptycznych. Postanowiono sprawdzić, jak najniższe stężenie CORT wpływa na potencjalną liczbę połączeń synaptycznych, którą badano w sposób pośredni, mierząc gęstość punktów PSD95 oraz średnią intensywność ich fluorescencji. PSD95 jest białkiem gęstości postsynaptycznej, którego obecność jest związana ze stabilnością synapsy, a część nowo powstałych kolców, która nie wykazuje obecności PSD95, jest eliminowana i nie staje się częścią nowego połączenia synaptycznego. Co więcej, utrata białka PSD95 przez kolec dendrytyczny również jest zwiastunem eliminacji danego kolca, co jest z kolei związane z utratą połączenia synaptycznego (Lambert i in., 2017; Yusifov i in., 2021; Melander i in., 2021; Fok i in., 2024).

Jak wskazują badania własne, nie wykazano wpływu 72-godzinnej inkubacji z 0.25 μM CORT ani na średnią gęstość punktów PSD95, ani na średnią intensywność ich fluorescencji. Otrzymany wynik jest zaskakujący, biorąc pod uwagę wyraźną tendencję spadkową w zakresie gęstości kolców (tak więc prawdopodobny ubytek kolców), pojawiającą się za sprawą 72-godzinnego działania CORT. Praktycznie każdy kolec dendrytyczny jest miejscem tworzenia synapsy. Prawdopodobny spadek gęstości kolców, sugeruje więc ubytek również sygnału pochodzącego z PSD95, co w przypadku naszych badań nie miało miejsca. Co więcej, obserwowany spadek przeciętnej szerokości głowy oraz wzrost w zakresie stosunku długości kolców do szerokości ich głów, sugerują zmniejszenie stabilności synaps, co również może wskazywać na obecność puli kolców dendrytycznych pozbawionych PSD95, które wkrótce zostaną usunięte, czemu jednak przeczą nasze dane.

Wyniki uzyskane w niniejszej rozprawie można interpretować na kilka sposobów. W badaniach własnych, analizowano sygnał z PSD95 znajdujący się również w dendrytach, a nie tylko w kolcach dendrytycznych. To może świadczyć o obecności puli PSD95, niezwiązanej z kolcem dendrytycznym, potencjalnie „nadrabiającej” zanik będący efektem spadku gęstości kolców dendrytycznych. Obecność PSD95 w dendrytach można wyjaśnić obserwacją, że w kulturach komórkowych, duża część (większa niż w przypadku mózgowia) synaps pobudzających znajduje się również na dendrytach (Boyer i in., 1998; Prange & Murphy, 2001b). Uzyskane dane własne, przynajmniej na tym poziomie analizy, pozostają w

zgodzie z danymi literaturowymi, które wskazują na brak efektów 20-minutowej inkubacji pierwotnych komórek korykalnych z 0.1 μM CORT na poziom PSD95 znajdujący się w dendrytach (Yuen i in., 2011; J. B. Lee i in., 2012).

5.4.3 Wpływ CORT na kolce dendrytyczne hipokampalnych neuronów pierwotnych

Analogiczne badania, dotyczące struktury kolców dendrytycznych, przeprowadzono na pierwotnych hodowlach hipokampalnych. W przypadku kolców dendrytycznych pierwotnych neuronów hipokampalnych, mimo tendencji spadkowych, nie wykazano zmian gęstości po żadnym z zastosowanych stężeń CORT. Inaczej niż w przypadku neuronów korykalnych, wykazano istotny spadek przeciętnej długości kolców dendrytycznych, który zaobserwowano po każdym z zastosowanych stężeń CORT. Ponadto, wykazano spadek szerokości głów kolców, również niezależnie od stężenia CORT. Nie zaobserwowano zmian w zakresie bezskalowego parametru, którym był stosunek długości kolców do szerokości ich głów.

Interesującą obserwacją w przypadku morfologii kolców dendrytycznych neuronów hipokampalnych, jest spadek ich przeciętnej długości, a nie tendencja wzrostowa jak w przypadku neuronów korykalnych. Zaobserwowany wynik jest zgodny z danymi literaturowymi. W pracy, w której hipokampalne komórki pierwotne hodowano przez 2 tygodnie z różnymi stężeniami CORT, doszło do istotnego wzrostu odsetka kolców cienkich i spadku odsetka kolców grzybkowatych za sprawą 0.1 μm i 0.2 μm stężenia CORT (Tanokashira i in., 2012). Kolce cienkie to kolce krótsze niż kolce grzybkowate, które dodatkowo posiadają mniejszą głowę. Obserwowane w badaniach własnych, skrócenie kolców oraz spadek szerokości ich głów, sugerują wzrost odsetka kolców, które zgodnie z przyjętymi kryteriami kategoryzacji, uznano by za kolce cienkie. Biorąc pod uwagę fakt, że kolce cienkie są opisywane jako kolce mniej stabilne aniżeli kolce grzybkowate, to w przypadku pierwotnych neuronów hipokampalnych, obserwujemy zjawisko zbieżne z tym wykazany w przypadku hodowli korykalnych, tj. osłabienie połączenia synaptycznego. Rzeczywiście, jak opisano powyżej, dostępne dane wskazują, że LTD może powodować skurczenie kolców dendrytycznych (Oh i in., 2013b; Wiegert & Oertner, 2013). Co ciekawe, samo skrócenie (a nie skurczenie) kolców dendrytycznych, przede wszystkim ich szyjki, jest związane z wzrostem amplitudy uEPSP, tym samym ze wzrostem siły synapsy, jednakże, zmniejszenie szerokości głowy kolców, towarzyszące skróceniu kolców, które wskazuje na brak maszynerii gęstości postsynaptycznej, sugeruje brak stabilności kolców i faktyczną możliwość uznania ich za kolce, które w przypadku kategoryzacji, określane są jako kolce cienkie i uznawane są za kolce przejściowe (Holtmaat i in., 2005b; Bourne & Harris, 2007b; Araya i in., 2014).

5.4.4 Wpływ CORT na stabilność synaps hipokampalnych neuronów pierwotnych

Również w przypadku pierwotnych hodowli hipokampalnych, postanowiono zestawzić zaobserwowane dane morfologiczne z pośrednim wskaźnikiem obecności połączeń synaptycznych. Tak więc, określono poziom PSD95 poprzez analizę gęstości punktów białka PSD95 oraz średniej intensywności ich fluorescencji. Nie wykazano wpływu 72-godzinnej inkubacji z 0.25 μM CORT na gęstość punktów PSD95 oraz na ich średnią intensywność fluorescencji. I tym razem, nieistotnej, ale wyraźnej tendencji spadkowej w zakresie gęstości kolców, nie towarzyszył ubytek połączeń synaptycznych. Ponownie, analizę przeprowadzono skupiając się na całym dendrycie, a nie jedynie na kolcach dendrytycznych, dlatego brak zaobserwowanej różnicy pomiędzy grupą CORT 0.25 μM , a grupą DMSO, również można wytłumaczyć sygnałem PSD95 znajdującym się w dendrycie, ze względu na obecność pobudzających połączeń synaptycznych, tworzonych w przypadku kultur komórkowych, również na dendrycie. Częściowo zbieżne dane z danymi własnymi, dotyczące PSD95, uzyskano w pracy Tanokashira i in., 2012, gdzie żadne z wykorzystanych stężeń CORT (w tym 0.1 i 0.2 μM) z którymi komórki pierwotne inkubowano przez 2 tygodnie, nie wpłynęło na całkowity poziom PSD95.

Podsumowując, przeprowadzone eksperymenty umożliwiły wskazanie stężeń CORT, które wpływają na gęstość oraz zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych, pierwotnych neuronów korykalnych oraz hipokampalnych. W pierwszym etapie, scharakteryzowano wpływ różnych stężeń CORT na wybrane parametry struktury kolców, obserwując zmiany innego rodzaju w przypadku neuronów korykalnych i hipokampalnych. W kolejnym, sprawdzono jak zaobserwowane zmiany w gęstości i morfologii kolców, przekładają się na liczbę połączeń synaptycznych, mierzona w sposób pośredni, poprzez analizę poziomu białka PSD95. W tym wypadku, wykazano brak efektów 72-godzinnej inkubacji z 0.25 μM CORT.

Tabela 10. Porównanie zmian morfologicznych kolców dendrytycznych, zachodzących w wyniku działania różnych stężeń CORT w hodowlach korykalnych oraz hipokampalnych.

Mierzony parametr morfologii kolców dendrytycznych	Pierwotne neurony korykalne			Pierwotne neurony hipokampalne		
	Stężenie CORT					
	CORT 0.25 μM vs. DMSO	CORT 0.50 μM vs. DMSO	CORT 1 μM vs. DMSO	CORT 0.25 μM vs. DMSO	CORT 0.50 μM vs. DMSO	CORT 1 μM vs. DMSO
Gęstość kolców	↔	↔	↓	↔	↔	↔
Długość kolców	↔	↔	↔	↓	↓	↓
Szerokość głowy kolców	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Długość kolców/szerokość ich głów	↑	↑	↑	↔	↔	↔

5.5 Badanie mechanizmu, pośredniczącego w indukowanych przez CORT zmianach morfologii kolców dendrytycznych – udział kinazy płytek przylegania (FAK)

72-godzinna inkubacja korykalnych i hipokampalnych hodowli pierwotnych z najniższym, 0.25 μM stężeniem CORT, skutkowała zmianami morfologicznymi kolców dendrytycznych, zbieżnymi z tymi uzyskanymi w efekcie działania stężeń wyższych. Dodatkowo, w pozostałych eksperymentach, wykazano brak wpływu najniższego stężenia CORT na przeżywalność komórek pierwotnych oraz na zmiany w morfologii dendrytów, uzyskując tym samym selektywny wpływ najniższego wykorzystywanego stężenia CORT (0.25 μM) na kolce dendrytyczne. W związku z tym, w eksperymentach dotyczących zaangażowania białka FAK w zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych wywołane CORT, zastosowano jedynie 0.25 μM stężenie CORT. I tak, w pierwszym etapie eksperymentów, wykorzystując inhibitor (Y15) oraz aktywator (ZN27) białka FAK, sprawdzono, czy istnieje możliwość, że za sprawą manipulacji aktywnością FAK, będzie można wpłynąć na działanie CORT w zakresie morfologii kolców dendrytycznych pierwotnych neuronów korykalnych oraz hipokampalnych. W naszych eksperymentach, w pierwszej fazie, sprawdzano jak działanie inhibitora Y15 oraz aktywatora ZN27 w ogóle lub w połączeniu z CORT, wpłynie na badane parametry kolców dendrytycznych. Żeby to zrobić, zaraz po dodaniu CORT, dodawano inhibitor Y15 bądź aktywator ZN27.

5.5.1 Manipulacja aktywnością FAK a zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych wywołane CORT w korykalnych hodowlach pierwotnych

Zastosowanie inhibitora Y15 doprowadziło do odtworzenia zmian obserwowanych w efekcie zastosowania 0.25 μM CORT, w zakresie przeciętnej szerokości głów kolców oraz stosunku długości kolców do szerokości ich głów. Ponownie wykazano nieistotną tendencję wzrostową w przypadku parametru przeciętnej długości kolców dendrytycznych, tym razem zarówno po wyłącznym zastosowaniu 0.25 μM CORT, jak i w przypadku wyłącznego zastosowania Y15 oraz wspólnych podań 0.25 μM CORT i Y15. W przypadku żadnego z mierzonych parametrów, nie wykazano efektów połączonego działania 0.25 μM CORT oraz Y15. Co więcej, tak jak w przypadku poprzednich eksperymentów, nie wykazano wpływu 0.25 μM CORT na gęstość kolców dendrytycznych. Również inhibitor Y15 nie wpłynął na ten parametr ani nie modulował efektów działania CORT w modelu pierwotnych neuronów korykalnych.

Obserwacja, że zahamowanie aktywności białka FAK, wpływa na zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych, w sposób podobny do efektu działania 0.25 μM CORT, sugeruje potencjalne zaangażowanie kinazy FAK w działanie CORT. Dlatego, w kolejnym kroku sprawdzono czy aktywacja

białka FAK, będzie w stanie przeciwdziałać wpływowi 0.25 μ M CORT, na zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych. Zgodnie z przewidywaniami, wykazano wzrost szerokości głów kolców w grupie, gdzie do 0.25 μ M CORT dodano ZN27, względem grupy CORT 0.25 μ M. Co więcej, wykazano istotny spadek szerokości głów w grupie CORT 0.25 μ M względem grupy DMSO, ale analogicznej różnicy nie zaobserwowano pomiędzy grupą DMSO, a grupą w której do 0.25 μ M CORT dodano ZN27. Jednocześnie, sam ZN27 nie miał wpływu na szerokość głów kolców. Podobne efekty działania ZN27, zauważono w zakresie parametru, którym jest stosunek długości kolców dendrytycznych do szerokości ich głów. Dodanie ZN27 do 0.25 μ M CORT, przeciwdziało obserwowanemu wzrostowi, który wykazano w grupie CORT 0.25 μ M, względem grupy DMSO. Nie wykazano wpływu samego ZN27 na analizowany parametr, a także, nie zaobserwowano zmian w zakresie gęstości kolców dendrytycznych, niezależnie od analizowanej grupy badawczej.

Wyniki uzyskane po zastosowaniu aktywatora białka FAK, potwierdzają dane uzyskane na skutek zahamowania aktywności FAK i wzmacniają założenie o udziale białka FAK w zmianach morfologicznych kolców dendrytycznych pierwotnych neuronów korykalnych.

Warto podkreślić wysoką selektywność cząsteczek wykorzystanych w niniejszych badaniach, służących jak inhibitor oraz aktywator FAK. Wyklucza to możliwość aktywacji innych niż FAK białek, których struktura jest częściowo homologiczna z FAK, w tym m.in. białka PYK2 (ang. *proline rich tyrosine kinase 2*) (O'Brien i in., 2014; Hochwald i in., 2016; Q. Wang i in., 2019; Rashmi i in., 2021; Oncel i in., 2021), przynajmniej w przypadku stężeń inhibitora i aktywatora, które zastosowano w badaniach własnych.

W pierwszym etapie interpretacji uzyskanych wyników, warto zwrócić uwagę na potencjalny mechanizm, za pośrednictwem którego FAK może wpływać na morfologię kolców dendrytycznych neuronów korykalnych. Dane wskazujące na zaangażowanie białka FAK w wydłużenie kolców i spadek szerokości ich głów, czyli zmiany analogiczne do tych zaobserwowanych po zastosowaniu CORT w przypadku neuronów korykalnych, są dostępne, ale pochodzą z prac przeprowadzonych na komórkach hipokampalnych, w przypadku których, w badaniach własnych, CORT wywołał zmiany innego rodzaju niż te opisane powyżej (Y. Shi i in., 2009). Niestety, badania dotyczące roli białka FAK w zmianach morfologicznych kolców, korykalnych, a nie hipokampalnych komórek neuronalnych, są nieliczne. Dlatego, interpretacja potencjalnego zaangażowania FAK w neuronach korykalnych, musi być oparta na analizie interakcji FAK z białkami, które opisano jako zaangażowane w proces modyfikacji struktury kolców dendrytycznych neuronów korykalnych.

Jednym z białek, które jak wykazano, jest częścią mechanizmu prowadzącego do wydłużenia kolców i zmniejszenia ich głów w komórkach korykalnych jest N-kadheryna. Zaburzenie adhezji mediowanej przez N-kadherynę, poprzez zastosowanie przeciwciała GC-4, skutkuje wydłużeniem kolców dendrytycznych, a także wzrostem częstości występowania kolców o wydłużonym kształcie z węższą głową, czyli o fenotypie obserwowanym w przypadku zastosowania CORT oraz inhibitora FAK (Xie i in., 2008). Co ciekawe, najprawdopodobniej istnieje obopólna zależność pomiędzy N-kadheryną, a białkiem FAK. W modelach nie neuronalnych, klasteryzacja N-kadheryn, zwiększająca adhezję komórkową, skutkuje aktywacją integryny $\beta 1$, co prowadzi do powstania kompleksu kadheryn oraz integryn, lokalizacji białka FAK w tym kompleksie i jego autofosforylacji (Lefort i in., 2011; Hadjisavva i in., 2022). Z kolei zastosowanie siRNA (ang. *small interfering RNA*) przeciw FAK, skutkuje zmniejszeniem stabilności złącz N-kadherynowych, które wykazano poprzez obserwację spadku zależnej od N-kadheryn, adhezji pomiędzy komórkami HeLa (Yano i in., 2004; Playford i in., 2008). To sugeruje potencjalny związek pomiędzy tymi białkami również w kontekście przebudowy kolców dendrytycznych. Zahamowanie fosforylacji białka FAK, może w negatywny sposób wpływać na klasteryzację N-kadheryn i skutkować specyficzną, opisywaną powyżej i obserwowaną w badaniach własnych, morfologią kolców, którą z kolei odwraca działanie aktywatora FAK. Co ciekawe, swoje działanie na kolce dendrytyczne, N-kadheryny wywierają poprzez kompleks białek wpływający na białko RAC1 (ang. *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*), którego zmniejszona aktywność jest połączona z obserwowanym w tych samych badaniach, specyficznym, wydłużonym fenotypem morfologicznym kolców dendrytycznych. (Xie i in., 2008). Białko FAK, może regulować aktywność RAC1 poprzez wiązanie z białkiem p130cas (Hsia i in., 2003; Deramautd i in., 2011). Co więcej, białko FAK może regulować RAC1 również poprzez fosforylację paksyliny oraz białka β -PIX (ang. *PAK-interacting exchange factor beta, ARHGEF7*), które funkcjonuje jako GEF (ang. *Guanine nucleotide exchanged factor*) białka RAC1 (Vallés i in., 2004; Brown i in., 2005; Goicoechea i in., 2014). Białko FAK, może więc aktywować białko RAC1 i przypuszczalnie stabilizować morfologię kolców w stanie natywnym, bez obserwowanego wydłużenia i zmniejszenia głów kolców dendrytycznych, które obserwuje się w przypadku zahamowania aktywności FAK i działania CORT, a które odwraca aktywacja FAK; potencjalnie właśnie za sprawą pośredniego działania na białko RAC1. Co ciekawe, w części badań faktycznie wykazano związek pomiędzy chronicznym stresem, któremu zwykle towarzyszy zaburzenie wydzielania CORT, a RAC1. W jednym z badań pochodzących z naszego zakładu, 14-dniowa ekspozycja na chroniczny stres unieruchomienia, skutkowała wzrostem poziomu mRNA białka RAC1 w korze przedczołowej, co można interpretować jako

mechanizm kompensacji, wynikający z potencjalnie obniżonej aktywności RAC1 na skutek chronicznego stresu (Rafa-Zabłocka i in., 2021). Dodatkowych wskazówek na potencjalne zaangażowanie FAK w proces stabilizacji morfologii kolców dendrytycznych, dostarczają dane dotyczące kluczowej roli integrzyn. Manipulacja poziomem β 1-integryny we wczesnej fazie rozwoju, związana była ze spadkiem gęstości kolców grzybkowatych w korze oczodołowo-czołowej oraz w korze przedczołowej (DePoy i in., 2019; Kietzman i in., 2022). Jest to o tyle istotne, że integryna β 1 sygnalizuje za pośrednictwem białka FAK, powodując jego rekrutację do miejsc adhezji komórkowej, gdzie dochodzi do autofosforylacji FAK, wiązania SRC i uruchomienia kaskady dalszego przekazywania sygnałowego, mogącego prowadzić m.in. do opisanych powyżej, manipulacji aktywnością białka RAC1 czy stabilizacji bądź destabilizacji N-kadheryn (Cobb, 1994; Schaller i in., 1994a; Velling i in., 2004). Ostatecznie, nie można wykluczyć, że sposób w jaki białko FAK jest zaangażowane w zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych neuronów korykalnych, wywołane CORT, jest zbieżny z tym co obserwowano w badaniach pierwotnych neuronów hipokampalnych, gdzie niezaburzona aktywność białka FAK, była kluczowa dla utrzymania dojrzałej morfologii kolców dendrytycznych, najpewniej poprzez działanie na szlak RhoA-ROCK-LIMK i wpływ LIMK (ang. *LIM domain kinase*) na fosforylację, tym samym aktywność, kofiliny (Y. Shi i in., 2009). Wskazówką sugerującą istnienie opisanego mechanizmu również w przypadku neuronów korykalnych, może być praca, gdzie wykazano znaczenie Eph2B (ang. *Ephrin type-B receptor 2*), sygnalizującego poprzez białko FAK, dla utrzymania dojrzałej, bardziej stabilnej formy kolców dendrytycznych neuronów korykalnych (Kayser i in., 2008; R.-X. Zhang i in., 2016).

Otwartą kwestią pozostaje pytanie czy CORT wpływa na kolce dendrytyczne za pośrednictwem białka FAK, czy mechanizm wpływu CORT na kolce, jest od FAK niezależny. Co więcej, niewiadomą pozostaje odpowiedź na pytanie, w jaki sposób CORT wywiera swoje działanie na białko FAK, jeżeli faktycznie oddziałuje za jego pośrednictwem. Niestety, brak jest danych wskazujących na bezpośrednie oddziaływanie między receptorami dla CORT oraz białkiem FAK, a także, brak doniesień na temat regulacji transkrypcji genu *PTK2* przez receptory MR i GR. Tak więc, jeżeli procesy wywołane przez CORT zachodzą za pośrednictwem białka FAK, to dzieje się to w sposób pośredni. Jednym z kandydatów, który może łączyć sygnał pochodzący od receptorów dla CORT, z białkiem FAK, jest białko SRC. Działanie CORT zwiększa fosforylację SRC, które z kolei wchodzi w interakcję z białkiem FAK (które, gdy fosforylowane na tyrozynie 397, wykazuje wysokie powinowactwo do białka SRC)(Thomas i in., 1998; Schaller i in., 1994a; S. Yang i in., 2013). Co więcej, w jednym z badań, w komórkach nie neuronalnych, zaobserwowano wzrost fosforylacji białka SRC i FAK po zastosowaniu DEX (S. Tan i in.,

2022). Poszukując dalej powiązań pomiędzy CORT i FAK, należy zwrócić uwagę na BDNF. Jednym z efektów chronicznie podwyższonego CORT jest spadek poziomu BDNF w korze przedczołowej oraz spadek poziomu receptora dla BDNF – TrkB, w tej samej strukturze (Kutiyanawalla i in., 2011; Sousa i in., 2015). Ponadto, dane pochodzące z korykalnych kultur pierwotnych, wskazują na spadek w poziomie fosforylowanych białek AKT (ang. *Protein Kinase B*) oraz mTOR (ang. *Mechanistic target of rapamycin*) po 48 i 72-godzinnej inkubacji komórek z CORT (Howell i in., 2011). AKT oraz mTOR są częścią szlaku sygnałowego związanego z BDNF i TrkB (Takei i in., 2004; Xia i in., 2004a; F. Zheng i in., 2008; Vitillo & Kimber, 2017). Aktywność BDNF jest związana ze stabilizacją kolców dendrytycznych, a także z sLTP, którego wyrazem jest zwiększona głowa kolca, zaś spadek poziomu BDNF, jest związany z fenotypem morfologicznym przypominającym ten obserwowany w badaniach własnych (włącznie z wydłużeniem kolców i spadkiem szerokości ich głów), pojawiający się na skutek chronicznego działania CORT (Tanaka i in., 2008; Kaneko i in., 2012; Kellner i in., 2014; Harward i in., 2016). Co ciekawe, BDNF pobudza klasteryzację β 1-integryn, a kompleksy integryn powstałe na skutek indukcji przez BDNF, ko-lokalizują z sygnałem FAK (Carlstrom i in., 2011). Co więcej, BDNF zwiększa poziom białka FAK fosforylowanego na tyrozynie 397 oraz 861 (Myers & Gomez, 2011b). Fosforylacja białka FAK na tyrozynie 861, zwiększa prawdopodobieństwo interakcji białka FAK z białkiem p130cas, co może w ostateczności skutkować aktywacją białka RAC1 (Y. Lim i in., 2004; Chacón & Fazzari, 2011; Koshman i in., 2011), które stabilizuje morfologię kolców.

Warto jednak zwrócić uwagę, iż istnieje możliwość, że chroniczna inkubacja komórek korykalnych z CORT, poprzez wpływ na BDNF oraz TrkB, działa na RAC1 bez udziału białka FAK, poprzez interakcję białka TrkB z białkiem Tiam1 (ang. *T-lymphoma invasion and metastasis-inducing protein 1*) i jego fosforylacją. Fosforylacja Tiam1 zachodzi w komórkach korykalnych za sprawą TrkB i w przypadku działania CORT i spadku poziomu TrkB, może być osłabiona (Miyamoto i in., 2006; Lai i in., 2012). Tym samym, może odpowiadać za obserwowane zmiany w morfologii kolców dendrytycznych, będące efektem obniżonej aktywności białka RAC1. Tiam1 jest bowiem białkiem będącym GEF białka RAC1, a jego fosforylacja na tyrozynie 829 skutkuje zwiększoną aktywnością białka RAC1 (Miyamoto i in., 2006).

5.5.2 Wpływ zróżnicowanych czasów inkubacji pierwotnych komórek korykalnych z CORT, na ekspresję genu *PTK2* oraz poziom białka FAK

Aby zweryfikować i potwierdzić wpływ CORT na kolce dendrytyczne neuronów korykalnych, poprzez potencjalne działanie za pośrednictwem białka FAK, w kolejnym eksperymencie sprawdzono,

czy różne czasy inkubacji z CORT, wpłyną na poziom mRNA genu *PTK2* oraz na poziom całkowitego i fosforylowanego białka FAK.

Jak wskazują dane, 5-godzinna, 24-godzinna oraz 48-godzinna inkubacja korykalnych komórek pierwotnych z 0.25 μ M CORT, nie wpływała na poziom mRNA genu *PTK2*. Wzrost względnego poziomu mRNA *PTK2*, wykazano za to na skutek 72-godzinnej inkubacji z 0.25 μ M CORT.

Wzrost poziomu mRNA genu kodującego FAK, po 72 godzinach inkubacji korykalnych komórek pierwotnych z CORT, można odczytywać jako efekt homeostatycznej kompensacji. To wzmacniałoby hipotezę o zahamowaniu aktywności białka FAK na skutek działania CORT i w efekcie, obserwowanymi w badaniach własnych, zmianami morfologicznymi kolców dendrytycznych, które są zbieżne z tymi wywołanymi zahamowaniem aktywności FAK. Jeżeli efektem zastosowania CORT jest obniżona aktywność troficzna na skutek spadku poziomu BDNF oraz TrkB, które mogą wpływać na aktywność FAK, które z kolei może pośrednio (poprzez wiązanie z PI3K (ang. *phosphoinositide 3-kinase*)) regulować białko AKT i mTOR, to spodziewanym efektem końcowym, mogłyby być obserwowane zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych (Akagi i in., 2002; Takei i in., 2004; Kumar i in., 2005; Henry i in., 2017). Tym bardziej, że zwiększona fosforylacja AKT, uzyskana poprzez wyciszenie genu (ang. *knockdown*) PTEN (ang. *Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten*), skutkuje zwiększoną średnicą głowy kolców dendrytycznych (Haws i in., 2014). A nokaut genu kodującego FAK, osłabia fosforylację AKT, którą przywraca nadekspresja dzikiej formy FAK (Hong i in., 2011). Co więcej, konstytutywnie aktywny FAK, zwiększa poziom fosforylowanego PI3K oraz AKT, a efekt przeciwny obserwuje się na skutek zastosowania dominująco negatywnej formy FAK (Xia i in., 2004b).

W ten sposób, wzrost mRNA genu *PTK2* może być kompensacyjny z dwóch powodów, jeden z nich to wywołana CORT, osłabiona klasteryzacja integrzyn, będąca efektem zmian w sygnalizacji BDNF i skutkująca zmniejszoną stabilizacją synaps, między innymi za sprawą zaburzonej aktywności FAK. Drugi z nich mógłby być związany z rolą FAK jako białka mogącego przywrócić właściwą aktywność szlaku PI3K-AKT, którego zaburzenie może wynikać z pojawiającej się na skutek DEX, bądź chronicznego stresu, zwiększonego poziomu fosfatazy PTEN w korze przedczołowej, która defosforyluje PIP3 (ang. *Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate*) do PIP2 (ang. *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*), czym pośrednio ogranicza również fosforylację AKT (Maehama & Dixon, 1998; Howell i in., 2011; X.-Q. Wang i in., 2021). Należy jednak pamiętać, że wzrost transkryptu nie jest równoznaczny ze zwiększoną aktywnością i nie musi się przekładać na zwiększony poziom fosforylowanego białka, a tym samym, na skuteczną kompensację. Co więcej, na skutek alternatywnego składania, z mRNA genu *PTK2*, może

powstawać wariant FRNK, który wykazuje antagonistyczne działanie wobec FAK. To jednak wyklucza sonda użyta w przypadku badań własnych, łącząca się do m.in. egzonów 21 i 22, których brak w przypadku transkryptu FRNK, wskazując na wykrytą obecność mRNA kodującego FAK, a nie FRNK (Armendáriz i in., 2014b).

W przypadku poziom całkowitego oraz fosforylowanego FAK, wykazano brak zmian, zarówno po 48, jak i 72 godzinach inkubacji pierwotnych hodowli kortykalnych z 0.25 μ M CORT. Należy podkreślić, że zaobserwowano tendencję wzrostową w poziomie całkowitego FAK po 72 godzinach działania CORT, ale okazała się ona nieistotna statystycznie. Brak zmian można interpretować jako pozostający w sprzeczności z wcześniej zaobserwowanymi danymi pochodzącymi z eksperymentów z użyciem inhibitora oraz aktywatora FAK, a także z hipotezą o zaangażowaniu FAK w zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych, wywołane CORT. Jednakże, nie można wykluczyć zmian w poziomie FAK, które pojawiły się wcześniej niż badane punkty czasowe. Co więcej, nie można wykluczyć lokalnych, np. synaptycznych zmian w poziomie białka FAK, które również nie były badane. Ostatecznie, nie można wykluczyć opcji, w przypadku której CORT oddziałuje na kolce dendrytyczne, za pośrednictwem mechanizmów niezwiązanych z sygnalizacją zależną od białka FAK. Czemu jednak można przeciwdziałać, zwiększając fosforylację białka FAK, w warunkach obecności CORT. Co więcej, brak zmian w poziomie białka nie wyklucza, że sygnał wywołany przez CORT przechodzi przez FAK, którego rola jako białka adaptorowego jest znana (Sieg i in., 2000b; Armendáriz i in., 2014b; Srikanth i in., 2018). Być może FAK jest jednym z elementów nie będących podstawowym celem działania CORT, który wpływa na inne białka, będące elementami szlaku znajdującymi się powyżej białka FAK, które sygnalizują za pośrednictwem białka FAK. W takim przypadku, rola FAK może polegać np. na integrowaniu sygnały z różnych źródeł w odpowiednim miejscu komórki.

Brak korelacji pomiędzy zmianami w poziomie mRNA i w poziomie białka, można wyjaśnić na co najmniej dwa sposoby. Po pierwsze, zmiana w poziomie mRNA nie musi skutkować zmianą poziomu białka, ze względu na np. potencjalnie zwiększoną degradację mRNA, działanie microRNA (ang. *micro ribonucleic acid*) czy osłabienie procesu translacji (m.in. przez działanie CORT na białko REDD1 i hamowanie kompleksu mTORC1) (Grange i in., 1994; Crisafulli i in., 2018). Po drugie, względny poziom mRNA oraz względny poziom białka, mierzono w badaniach własnych po 72 godzinach inkubacji komórek z CORT. Istnieje możliwość, że wzrost poziomu białka, który wspierałby hipotezę kompensacji, zaobserwowano by dopiero po czasie dłuższym niż 72 godziny np. ze względu na tempo procesu translacji. Tym bardziej, że już w przypadku 72 godzin inkubacji komórek pierwotnych z CORT,

obserwowana jest niewielka tendencja wzrostowa w poziomie białka. Warto również zwrócić uwagę, na wielość izoform białka FAK znajdujących się w mózgowiu, z których część jest zlokalizowana w synapsie (Armendáriz i in., 2014b). Wzrost w przypadku tylko którejś konkretniej izoformy, mógłby być, ze względu na brak odpowiednich technik badawczych (np. przeciwciał) oraz potencjalnie spodziewaną łagodną zmianę, niemożliwy do wykrycia.

Podsumowując, przedstawione wyniki sugerują zaangażowanie białka FAK w zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych pierwotnych neuronów korykalnych, wywołane długotrwałe podniesionym poziomem CORT. Zahamowanie fosforylacji FAK, za sprawą inhibitora Y15, naśladowało zmiany zachodzące za sprawą CORT, co może być wskazówką, że podobny efekt, w postaci zahamowania fosforylacji FAK, może być skutkiem działania CORT. Tym bardziej, że aktywacja białka FAK za sprawą ZN27, przeciwdziałała wpływowi CORT na kolce dendrytyczne. Jednakże, ze względu na brak zmian w poziomie białka, dane pochodzące z manipulacji aktywnością FAK, nie są wystarczające by jednoznacznie wesprzeć postawioną hipotezę.

5.5.3 Manipulacja aktywnością FAK a zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych wywołane CORT w hipokampalnych hodowlach pierwotnych

Inaczej niż w przypadku pierwotnych neuronów korykalnych, inhibitor FAK – Y15, nie doprowadził do odtworzenia zmian w zakresie przeciętnej długości kolców oraz szerokości głów kolców dendrytycznych, które zachodzą za sprawą 72-godzinnej inkubacji hipokampalnych hodowli pierwotnych z 0.25 μM CORT. Co więcej, nie wykazano efektów Y15 dodanego do 0.25 μM CORT. Tak jak w poprzednich eksperymentach, nie wykazano wpływu CORT na gęstość kolców dendrytycznych oraz bezskalowy parametr jakim był stosunek długości kolców do szerokości ich głów. Podobnie, nie wykazano wpływu Y15 na oba te parametry.

W kolejnym etapie, sprawdzono wpływ aktywatora FAK – ZN27. Nie zaobserwowano wpływu aktywatora ZN27 na długość kolców dendrytycznych. Różnica, którą wykazano pomiędzy grupą DMSO, a grupą CORT 0.25 μM , utrzymała się również w przypadku porównania grupy ZN27, z grupą, gdzie ZN27 podawano razem z 0.25 μM CORT. Co ciekawe, spadek w przeciętnej szerokości głowy kolców, który został spowodowany za sprawą 0.25 μM CORT, został zniwelowany za sprawą dodania ZN27 do 0.25 μM CORT. Tak więc, ZN27 nie zapobiegł zmianie wywołanej przez 0.25 μM CORT w zakresie długości kolców dendrytycznych, natomiast przeciwdziałał zmniejszeniu przeciętnej szerokości głów kolców, wywołanej przez CORT.

Uzyskane dane nasuwają przypuszczenie o braku udziału kinazy FAK, w zmianach morfologicznych kolców dendrytycznych wywołanych CORT, w hipokampalnych neuronach

pierwotnych. Hamowanie fosforylacji FAK nie wywołało zmian jakie pojawiają się na skutek działania CORT, a zastosowanie aktywatora białka FAK, wpłynęło jedynie na parametr jakim była szerokość głowy kolców. Co ciekawe, dotychczas przeprowadzone badania, wskazują białko FAK jako istotne dla morfologii hipokampalnych kolców dendrytycznych. Białko FAK jest zaangażowane w dojrzewanie kolców dendrytycznych pierwotnych neuronów hipokampalnych, które wiąże się z ich skróceniem (Moeller i in., 2006b). Jednocześnie, inne dane wskazują, że zmniejszona aktywność β 1-integriny, skutkuje zmniejszoną fosforylacją m.in. białka FAK, co związane jest ze spadkiem długości kolców dendrytycznych oraz ze spadkiem częstotliwości występowania kolców grzybkowatych. Jednakże, efekt ten nie może być analizowany jedynie w kontekście działania białka FAK, jako że zaobserwowano również spadek fosforylacji innych białek, w tym białka PYK2 oraz p130cas (Bourgin i in., 2007). Tym bardziej, że nokaut samego genu kodującego białko FAK w neuronach hipokampalnych, skutkowało wydłużeniem, a nie skróceniem kolców dendrytycznych. Dodatkowo, na skutek nokautu obserwowano spadek przeciętnej wielkości głów kolców dendrytycznych. W tym samym badaniu, nadekspresja dzięki bądź konstytutywnie aktywnej formy białka FAK, cofała owe zmiany (Y. Shi i in., 2009).

Szczególnie ostatnie z opisanych powyżej badań, wzmacnia tezę, że białko FAK jest istotne dla utrzymania dojrzałej, skróconej morfologii kolców dendrytycznych neuronów hipokampalnych. A jeżeli tak, to można przypuszczać, że w przypadku zmniejszonej aktywności białka FAK, wynikającej z działania CORT, doszłoby do wydłużenia kolców dendrytycznych, co jednak nie było obserwowane w badaniach własnych. Idąc dalej, hipotetycznie, nadmierna aktywność FAK, która potencjalnie również mogłaby być wywołana przez CORT, skutkowałaby skróceniem kolców dendrytycznych, które mimo, że obserwowane w badaniach własnych, nie było normalizowane przez działanie inhibitora Y15. Wydaje się więc, że zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych zachodzących za sprawą CORT, są niezależne od białka FAK. Przedstawione dane będące efektem zastosowania inhibitora oraz aktywatora, nie są jednak rozstrzygające i nie można wykluczyć możliwości, w której CORT faktycznie działa za pośrednictwem FAK, na co jednak uzyskane na tym etapie wyniki nie wskazują. Warto zaznaczyć, że zastosowany w badaniach własnych inhibitor Y15, nie doprowadził do wydłużenia kolców oraz zmniejszenia ich głowy, co jest efektem nokautu genu *PTK2* (Y. Shi i in., 2009). Aktywator białka FAK – ZN27, przeciwdziałał zmianom w zakresie szerokości głowy kolców, co z kolei jest w zgodzie z rolą jaką białko FAK odgrywa w przypadku indukcji LTP, która powoduje fosforylację białka FAK. Co więcej, transfekcja komórek hipokampalnych nieaktywną formą FAK powoduje osłabienie LTP, natomiast nadekspresja formy konstytutywnie aktywnej, obniża próg generacji LTP komórek zakrętu zębatego hipokampa (Y. C. Yang

i in., 2003b). LTP jest powiązane ze wzrostem głowy kolców dendrytycznych, tak więc, zwiększenie aktywności FAK, może prowadzić do niespecyficznego (tj. niezwiązanego z CORT) wzrostu głowy kolców dendrytycznych, przy jednoczesnym braku wpływu na ich długość.

Dane morfologiczne przedstawiające skrócenie kolców oraz spadek szerokości głów kolców dendrytycznych, zachodzące na skutek CORT, są zbieżne z rezultatami pochodzącymi z literatury przedmiotu. W jednej z takich prac, 2 tygodniowa ekspozycja hipokampalnych neuronów pierwotnych na CORT, skutkowałą spadkiem odsetka kolców z większą głową oraz wzrostem odsetka kolców cienkich, których morfologia odzwierciedla zmiany obserwowane w badaniach własnych. W tej samej pracy, wykazano rozregulowanie filamentów aktynowych za sprawą CORT, odpowiadające za zmiany w strukturze kolców oraz wskazano na istotne znaczenie białka caldesmon (białko wiążące kalmodulinę oraz filamenty aktynowe) w opisanym powyżej procesie (Tanokashira i in., 2012). Co ciekawe, zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych zachodzące za sprawą CORT w pierwotnych neuronach hipokampalnych, najpewniej również są powiązane z zaburzeniami aktywności BDNF. Wykazano bowiem, że 24-godzinna inkubacja komórek z DEX, prowadzi do zmniejszonego wzrostu poziomu białek synaptycznych wywołanego BDNF, których pojawienie się jest istotne dla rozwoju maszyneryi gęstości synaptycznej, kluczowej dla utrzymania połączenia synaptycznego (Kumamaru i in., 2008).

5.5.4 Wpływ zróżnicowanych czasów inkubacji pierwotnych komórek hipokampalnych z CORT, na ekspresję genu *PTK2* oraz poziom białka FAK

W kolejnym etapie, również w przypadku pierwotnych hodowli hipokampalnych, sprawdzono, czy CORT wpływa na względny poziom mRNA genu *PTK2* oraz względny poziom całkowitego oraz fosforylowanego FAK, po różnych czasach inkubacji z 0.25 μ M CORT.

Zgodnie z przedstawionymi danymi ani 48-godzinna ani 72-godzinna inkubacja hipokampalnych komórek pierwotnych z 0.25 μ M CORT, nie wpływała na poziom mRNA genu *PTK2*. W związku z brakiem zmian w dwóch badanych czasach, nie określano wpływu 0.25 μ M CORT na względny poziom mRNA po 5 i 24-godzinnej inkubacji. Podobnie, wykazano brak zmian w poziomie całkowitego oraz fosforylowanego FAK, zarówno po 48 jak i 72 godzinach inkubacji pierwotnych hodowli hipokampalnych z 0.25 μ M CORT. Brak zmian można uznać za kolejną wskazówkę świadczącą o braku zaangażowaniu białka FAK w zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych neuronów hipokampalnych. Należy jednak mieć na uwadze, że brak zmian zarówno w poziomie transkryptu jak i całkowitego oraz fosforylowanego białka, nawet w połączeniu z danymi uzyskanymi za sprawą inhibitora oraz aktywatora FAK, nie jest jednoznacznym dowodem na brak zaangażowania FAK w proces zmian morfologicznych wywołanych

CORT. Podobnie jak opisywano to w przypadku interpretacji wyników uzyskanych dla komórek korykalnych, celem działania CORT mogą być elementy szlaków sygnałowych, które są związane z białkiem FAK, a rola FAK polega na integrowaniu sygnału z różnych źródeł, co w przypadku potencjalnych zakłóceń tego procesu, niekoniecznie będzie powiązane ze zmianami w poziomie całkowitego bądź fosforylowanego FAK.

Podsumowując, wykazano brak wpływu inhibicji FAK przez Y15. Różnice, które zaobserwowano na skutek działania CORT, w zakresie długości kolców oraz szerokości ich głów, nie były modyfikowane przez hamowanie FAK. Wykazano wpływ aktywacji FAK (za sprawą aktywatora ZN27), która przeciwdziałała indukowanemu przez CORT zmniejszeniu szerokości głów kolców. Nie zaobserwowano zmian we względnym poziomie mRNA genu *PTK2*. Ponadto, nie wykazano wpływu CORT na poziom całkowitego i fosforylowanego FAK. Tym samym, uzyskane dane sugerują brak zaangażowania białka FAK w zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych pierwotnych neuronów hipokampalnych, wywołane działaniem CORT.

5.6 Badanie wpływu CORT i zróżnicowanych czasów inkubacji korykalnych i hipokampalnych hodowli pierwotnych z CORT, na poziom mRNA genów kodujących białka związane z plastycznością synaptyczną i/lub wchodzące w interakcję z białkiem FAK

W ostatnim etapie badań, sprawdzono wpływ inkubacji korykalnych oraz hipokampalnych komórek pierwotnych z 0.25 μ M CORT, na zmiany w poziomie mRNA genów kodujących białka znane z zaangażowania w procesy morfologiczne kolców dendrytycznych, a także, będące częścią szlaku sygnałowego związanego z białkiem FAK. Badania przeprowadzono po 72 godzinach inkubacji z 0.25 μ M stężeniem CORT oraz w przypadku zaobserwowania zmian we względnym poziomie mRNA wielu genów, również po 48 godzinach. Celem badania efektów dwóch różnych czasów inkubacji z CORT, było wskazanie pierwszego momentu, w którym pojawiają się obserwowane zmiany.

5.6.1 Wpływ CORT na poziom mRNA genów kodujących białka związane z plastycznością synaptyczną i/lub wchodzące w interakcję z białkiem FAK w korykalnych neuronach pierwotnych

72-godzinna inkubacja korykalnych hodowli z CORT, spowodowała wzrost względnego poziomu mRNA genów *mTOR*, *PTK2B*, *SRC* oraz *ARHGAP26*. Ponadto, zauważono nieistotną statystycznie tendencję wzrostową w przypadku genu *BCAR1*, *ARHGEF28* i *RAC1* oraz nieistotną statystycznie tendencję spadkową w przypadku genu *RAP1b*. Badanie przeprowadzone po 48 godzinach inkubacji z CORT, w którym testowano względny poziom mRNA genów, które uległy zmianie bądź wykazywały

tendencję po 72 godzinach działania CORT, wskazało, że żadna ze zmian zaobserwowanych po 72 godzinach, nie pojawiła się po 48 godzinach inkubacji z CORT. Jednakże, zaobserwowano nieistotne tendencje wzrostowe w zakresie genów *mTOR* oraz *ARHGEF28*.

Fakt pojawienia się zmian po 72, a nie 48 godzinach inkubacji korykalnych hodowli pierwotnych z CORT, wzmacnia hipotezę o zachodzeniu procesów kompensacji. Tym bardziej, że geny, których poziom mRNA uległ zmianie na skutek działania CORT, kodują białka faktycznie zaangażowane w zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych. W przypadku *mTOR*, wzrost we względnym poziomie mRNA na skutek 72-godzinnej inkubacji pierwotnych komórek korykalnych z CORT, może być efektem sprzężenia zwrotnego, pojawiającego się w wyniku spadku poziomu białka mTOR, który zachodzi na skutek 72-godzinnej inkubacji komórek korykalnych z CORT (Howell i in., 2011). Kolejny gen, którego ekspresja ulegała zmianie to *PTK2B*. Jest to gen kodujący białko PYK2, wykazujące wysoką homologię z białkiem FAK. PYK2 jest zaangażowany w zmiany morfologiczne kolców, a nokaut genu kodującego PYK2, powoduje wzrost odsetka kolców z krótszą szyjką oraz węższą głową w hipokampalnych neuronach pierwotnych (J. Zheng i in., 2022). W związku z rolą PYK2 jako białka wchodzącego w interakcję z jonami wapnia, zwiększony poziom mRNA genu *PTK2B*, może być odpowiedzią na zwiększony, wewnątrzkomórkowy poziom jonów Ca^{2+} obserwowany w pierwotnych neuronach korykalnych, również potencjalnie będący homeostatyczną kompensacją spadku sygnału wapniowego, który obserwuje się na skutek długotrwałego działania CORT (Momin i in., 2022; Wan i in., 2024). Co więcej, w promotorze *PTK2B* znajduje się sekwencja GRE, a ostry stres oraz podanie DEX, powodują zwiększoną ekspresję genu *PTK2B*. Tak więc, wzrost względnego poziomu mRNA w badaniach własnych, może być efektem późnej odpowiedzi genomowej wywołanej CORT (Frahm i in., 2018; Mifsud i in., 2021b). Co ciekawe, w kontekście hipotezy kompensacji, znaczenie może mieć również wzrost względnego poziomu mRNA genu *SRC*. Zarówno PYK2 jak i *SRC*, wchodzą w interakcję z białkiem FAK, będąc efektorami przyczyniającymi się do wpływu na takie białka jak m.in. PI3K oraz AKT, których aktywność jest zmniejszona na skutek długotrwałego działania podniesionego poziomu CORT (C.-S. Shi & Kehrl, 2001; Akagi i in., 2002; Brown i in., 2005). Ciekawym wynikiem jest również wzrost poziomu mRNA genu *ARHGAP26*, który koduje białko GRAF. GRAF przyspiesza hydrolizę GTP (ang. *Guanosine-5'-triphosphate*) do GDP (ang. *Guanosine-5'-diphosphate*), prowadząc w efekcie do wygaszenia sygnału białek RhoA oraz CDC42 (Hildebrand i in., 1996; J. M. Taylor i in., 1998). Zwiększona aktywność białka RhoA, skutkuje zwiększoną eliminacją kolców dendrytycznych, która była obserwowana w badaniach skrawków kory czołowej (Gourley i in., 2013b). Tendencja spadkowa w

zakresie gęstości kolców dendrytycznych, była obserwowana w badaniach własnych, co może wskazywać na zwiększoną aktywność RhoA wywołaną CORT i sprzężeniem zwrotnym, polegającym na zwiększonej transkrypcji genu *ARHGAP26*. Obraz dotyczący hipotezy kompensacji oraz zaangażowania białka FAK, dopełniają wyniki wskazujące tendencję wzrostową dla genów *BCAR1* oraz *RAC1*. Wiązanie białka FAK do białka p130cas, kodowanego przez gen *BCAR1*, może skutkować zwiększoną aktywnością białka RAC1, które jest jednym z kluczowych białek, istotnych dla zachowania stabilnej morfologii kolców (Tashiro & Yuste, 2004; Cahill i in., 2009; Chacón & Fazzari, 2011; Koshman i in., 2011; Saneyoshi i in., 2019). Tendencja wzrostowa w poziomie mRNA genu *RAC1*, podobnie jak genu *BCAR1*, może być odpowiedzią na zmniejszoną aktywność tych białek bądź białek będących częścią szlaku RAC1 i p130cas, na skutek 72-godzinnej inkubacji z CORT.

5.6.2 Wpływ CORT na poziom mRNA genów kodujących białka związane z plastycznością synaptyczną i/lub wchodzące w interakcję z białkiem FAK w hipokampalnych neuronach pierwotnych

72-godzinna inkubacja komórek z 0.25 μ M CORT, spowodowała wzrost względnego poziomu mRNA genu *ARHGAP26* oraz genu *ROCK1*. Dodatkowo, zaobserwowano nieistotną tendencję wzrostową w przypadku genów *MAPK1* oraz *ARHGEF28*. Zaobserwowane zmiany sugerują zachodzącą regulację działania osi RhoA-ROCK. Zarówno gen *ARHGAP26* jak i *ARHGEF28*, kodują białka regulujące aktywność RhoA, zaś gen *ROCK1*, koduje serynowo-treoninową kinazę ROCK1, będącą głównym efekтором białka RhoA. Zwiększona aktywność RhoA, w przypadku kolców dendrytycznych hipokampa, również prowadzi do ich zmniejszonej gęstości, którą co ciekawe, poprzedza retrakcja i kurczenie kolców (obserwowane w badaniach własnych)(Elia i in., 2006; Schubert i in., 2006). Tendencja wzrostowa w zakresie genu *MAPK1*, który koduje białko ERK2, dodatkowo wzmacnia hipotezę o regulacji osi zależnej od białka RhoA. Białko ERK2 (ang. *Extracellular signal-regulated kinase 2*), poprzez fosforylację białka GEF-H1 (ang. *Guanine nucleotide exchange factor H1*), może bowiem wpływać na aktywność RhoA (M.-G. Kang i in., 2009; Waheed i in., 2010).

Podsumowując, dane pozyskane z pomiarów wpływu długotrwałej inkubacji z podniesionym poziomem CORT na ekspresję genów w korykalnych i hipokampalnych komórkach pierwotnych, wskazują na zmiany w szeregu genów (szczególnie w przypadku komórek korykalnych), które kodują białka zaangażowane w procesy zmian morfologicznych kolców dendrytycznych. W przypadku komórek korykalnych, obserwowane zmiany zachodzą po 72, ale nie po 48 godzinach, co może wskazywać na procesy kompensacyjne, wywołane inkubacją komórek z 0.25 μ M CORT. W przypadku komórek hipokampalnych, zaobserwowano znacznie mniej zmian niż w przypadku komórek korykalnych, które jednak, tak jak w przypadku komórek korykalnych, pojawiły się na

skutek 72-godzinnej inkubacji komórek z 0.25 μ M CORT. Zmiany te związane były z genami kodującymi białka związane z działaniem osi RhoA-ROCK.

5.7 Podsumowanie i wnioski

Wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej, potwierdzają założenie, że długotrwałe podniesiony poziom CORT, indukuje zmiany w strukturze kolców dendrytycznych korykalnych oraz hipokampalnych neuronów pierwotnych. Zastosowana w niniejszej rozprawie ocena struktury kolców dendrytycznych, oparta na analizie określonych parametrów morfologicznych, umożliwiła uzyskanie nowych danych na temat zmian jakie zachodzą w skutek działania CORT w korykalnych oraz hipokampalnych neuronach pierwotnych. Na podkreślenie zasługuje fakt, że przynajmniej w przypadku pierwotnych neuronów korykalnych, wyniki badań zawarte w dysertacji, po raz pierwszy pokazały jakie specyficzne parametry morfologii kolców dendrytycznych, ulegają zmianie w wyniku chronicznego działania CORT. Ponadto, wykazano, że zmiany obserwowane w przypadku kolców dendrytycznych neuronów korykalnych, są różne od zmian obserwowanych w hodowlach hipokampalnych.

W kolejnych etapach pracy badawczej, wykazano zaangażowanie białka FAK w zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych neuronów korykalnych oraz hipokampalnych, nie tylko te, które zachodzą za sprawą CORT, ale również te wywołane poprzez manipulacje aktywnością białka FAK, w warunkach pozbawionych CORT. W niniejszej rozprawie, po raz pierwszy pokazano jakie parametry struktury kolców ulegają zmianie w wyniku manipulacji aktywnością białka FAK w neuronach korykalnych i hipokampalnych. Ponadto, po raz pierwszy wykazano, że za sprawą manipulacji aktywnością FAK, możliwe jest przeciwdziałanie efektom jakie długotrwałe podniesiony poziom CORT, wywiera na wybrane parametry morfologiczne kolców dendrytyczny pierwotnych neuronów korykalnych i hipokampalnych.

Opisane powyżej rezultaty, łącznie z tymi, które dotyczyły charakteryzacji zastosowanego układu eksperymentalnego (tj. wpływu CORT na przeżywalność komórek, podstawowe aspekty sygnalizacji glikokortykoidowej oraz ogólną morfologię neuronów) mogą być użyteczne w kontekście tworzenia izolowanych systemów opartych na komórkach pierwotnych. Takie systemy, mogłyby być przeznaczone do badania mechanizmów zmian morfologicznych kolców dendrytycznych związanych z np. chronicznym stresem, chorobą Cushinga bądź leczeniem steroidowym, w celu m.in. poszukiwania farmakologicznej terapii problemów poznawczych, współwystępujących z chronicznym stresem i

chorobą Cushinga. Należy jednak mieć na uwadze liczne ograniczenia takiego układu eksperymentalnego, który pozbawiony jest złożoności mózgowia, a także m.in. rytmicznych oscylacji wydzielania CORT.

5.7.1 Wnioski

Wnioski wynikające z badań wpływu długotrwałe podniesionego poziomu CORT na hodowle korykalnych i hipokampalnych komórek pierwotnych, jakie wykazano w niniejszej pracy, przedstawiają się następująco:

1. Długotrwałe (72-godzinna) działanie podwyższonego poziomu CORT na korykalne oraz hipokampalne komórki pierwotne, skutkuje:
 - a) wpływa na podstawową sygnalizację glikokortykoidową, badaną poprzez analizę ekspresji genów *FKBP5* oraz *NR3C1*. Wpływ ten jest zróżnicowany zależnie od badanego genu, zastosowanych stężeń CORT oraz od rodzaju hodowli (korykalna lub hipokampalna). W przypadku obu rodzajów hodowli, 0.25 μ M stężenie CORT i stężenia wyższe, wywołują wzrost poziomu mRNA genu *FKBP5*, co świadczy o odpowiedzi komórek pierwotnych na działanie CORT.
 - b) wpływa na przeżywalność pierwotnych hodowli komórkowych. 1 μ M stężenie CORT istotnie zmniejsza przeżywalność, wyłącznie w hodowlach hipokampalnych. 0.25 μ M stężenie CORT nie ma działania cytotoksycznego, niezależnie od rodzaju hodowli.
 - c) wpływa na ogólną morfologię neuronów pierwotnych. CORT modyfikuje morfologię neuronów pierwotnych, zależnie od zastosowanych stężeń. Stężenia CORT wyższe niż 0.25 μ M prowadzą do zubożenia drzewa dendrytycznego w obu typach hodowli. 0.25 μ M stężenie CORT nie wpływa na ogólną morfologię neuronów pierwotnych, niezależnie od typu hodowli.
 - d) wpływa na morfologię kolców dendrytycznych. CORT modyfikuje morfologię kolców dendrytycznych neuronów pierwotnych w sposób zależny od rodzaju hodowli, powodując skrócenie kolców w neuronach hipokampalnych i wydłużenie w neuronach korykalnych. Dodatkowo, w obu rodzajach hodowli, CORT prowadzi do zmniejszenia szerokości głów kolców. Wielkość efektu w obu rodzajach hodowli jest podobna, niezależnie od stężenia CORT. 0.25 μ M stężenie CORT, które nie ma działania cytotoksycznego i nie wpływa na ogólną morfologię neuronów, prowadzi do zmian morfologicznych kolców, które są analogiczne do tych obserwowanych w wyniku działania stężeń wyższych.

- e) nie wpływa na gęstość połączeń synaptycznych. Eksperymentalnie zidentyfikowane 0.25 μM stężenie CORT, które mimo braku działania cytotoksycznego i braku wpływu na ogólną morfologię neuronów, prowadzi do zmian w morfologii kolców dendrytycznych, nie wpływa na poziom PSD95, będący pośrednim wskaźnikiem stabilności połączeń synaptycznych.
2. Manipulacja aktywnością białka FAK, naśladuje wpływ 0.25 μM CORT na strukturę kolców dendrytycznych neuronów korykalnych, bądź mu przeciwdziałała, zależnie od rodzaju zastosowanego oddziaływania eksperymentalnego (zahamowanie bądź zwiększenie aktywności FAK). W przypadku kolców dendrytycznych pierwotnych neuronów hipokampalnych, efekty wykazuje jedynie aktywacja białka FAK, która przeciwdziała wpływowi 0.25 μM CORT na przeciętną szerokość głowy kolca.
 3. 72-godzinna inkubacja komórek korykalnych z 0.25 μM stężeniem CORT wpływa na względny poziom mRNA genu *PTK2* (kodującego białko FAK), powodując jego wzrost. Czasy inkubacji komórek korykalnych z CORT, krótsze niż 72 godziny, w tym inkubacje 5-godzinna, 24-godzinna i 48-godzinna, nie wpływają na poziom mRNA genu *PTK2*. 0.25 μM stężenie CORT nie wpływa na poziom mRNA genu *PTK2* w pierwotnych hodowlach hipokampalnych, niezależnie od czasu inkubacji komórek z CORT.
 4. 0.25 μM stężenie CORT nie wpływa na zmiany w poziomie całkowitego oraz fosforylowanego FAK, niezależnie od zastosowanych czasów inkubacji z CORT (48 godzin i 72 godziny) oraz rodzaju hodowli.
 5. 0.25 μM stężenie CORT wpływa na ekspresję genów kodujących białka związane z plastycznością synaptyczną oraz związane z sygnalizacją zależną od białka FAK, głównie w hodowlach korykalnych i w znacznie mniejszym stopniu, hodowlach hipokampalnych. Zmiany w ekspresji genów w obu tych hodowlach, zachodzą w wyniku działania 72-godzinnej, a nie 48-godzinnej stymulacji komórek z CORT.

Piśmiennictwo

- Ackermann, M., & Matus, A. (2003). Activity-induced targeting of profilin and stabilization of dendritic spine morphology. *Nature Neuroscience*, 6(11), 1194–1200. <https://doi.org/10.1038/nn1135>
- Agasse, F., Mendez-David, I., Christaller, W., Carpentier, R., Braz, B. Y., David, D. J., Saudou, F., & Humbert, S. (2020). Chronic Corticosterone Elevation Suppresses Adult Hippocampal Neurogenesis by Hyperphosphorylating Huntingtin. *Cell Reports*, 32(1), 107865. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107865>
- Ahima, R., Krozowski, Z., & Harlan, R. E. (1991). Type I corticosteroid receptor-like immunoreactivity in the rat CNS: Distribution and regulation by corticosteroids. *Journal of Comparative Neurology*, 313(3), 522–538. <https://doi.org/10.1002/cne.903130312>
- Akagi, T., Murata, K., Shishido, T., & Hanafusa, H. (2002). V-Crk Activates the Phosphoinositide 3-Kinase/AKT Pathway by Utilizing Focal Adhesion Kinase and H-Ras. *Molecular and Cellular Biology*, 22(20), 7015–7023. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.20.7015-7023.2002>
- Anderson, R. M., Birnie, A. K., Koblesky, N. K., Romig-Martin, S. A., & Radley, J. J. (2014). Adrenocortical Status Predicts the Degree of Age-Related Deficits in Prefrontal Structural Plasticity and Working Memory. *Journal of Neuroscience*, 34(25), 8387–8397. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1385-14.2014>
- Anderson, R. M., Glanz, R. M., Johnson, S. B., Miller, M. M., Romig-Martin, S. A., & Radley, J. J. (2016a). Prolonged corticosterone exposure induces dendritic spine remodeling and attrition in the rat medial prefrontal cortex. *Journal of Comparative Neurology*, 524(18), 3729–3746. <https://doi.org/10.1002/cne.24027>
- Anderson, R. M., Glanz, R. M., Johnson, S. B., Miller, M. M., Romig-Martin, S. A., & Radley, J. J. (2016b). Prolonged corticosterone exposure induces dendritic spine remodeling and attrition in the rat medial prefrontal cortex. *Journal of Comparative Neurology*, 524(18), 3729–3746. <https://doi.org/10.1002/cne.24027>
- Arango-Lievano, M., Lambert, W. M., Bath, K. G., Garabedian, M. J., Chao, M. V., & Jeanneteau, F. (2015). Neurotrophic-priming of glucocorticoid receptor signaling is essential for neuronal plasticity to stress and antidepressant treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(51), 15737–15742. <https://doi.org/10.1073/pnas.1509045112>
- Araya, R., Vogels, T. P., & Yuste, R. (2014). Activity-dependent dendritic spine neck changes are correlated with synaptic strength. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(28). <https://doi.org/10.1073/pnas.1321869111>
- Arber, S., Barbayannis, F. A., Hanser, H., Schneider, C., Stanyon, C. A., Bernard, O., & Caroni, P. (1998). Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature*, 393(6687), 805–809. <https://doi.org/10.1038/31729>
- Arellano, J. I. (2007). Ultrastructure of dendritic spines: Correlation between synaptic and spine morphologies. *Frontiers in Neuroscience*, 1(1), 131–143. <https://doi.org/10.3389/neuro.01.1.1.010.2007>

- Arikkath, J., Israely, I., Tao, Y., Mei, L., Liu, X., & Reichardt, L. F. (2008). Erbin Controls Dendritic Morphogenesis by Regulating Localization of δ -Catenin. *The Journal of Neuroscience*, *28*(28), 7047–7056. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0451-08.2008>
- Armendáriz, B. G., Masdeu, M. del M., Soriano, E., Ureña, J. M., & Burgaya, F. (2014a). The diverse roles and multiple forms of focal adhesion kinase in brain. *European Journal of Neuroscience*, *40*(11), 3573–3590. <https://doi.org/10.1111/ejn.12737>
- Armendáriz, B. G., Masdeu, M. del M., Soriano, E., Ureña, J. M., & Burgaya, F. (2014b). The diverse roles and multiple forms of focal adhesion kinase in brain. *European Journal of Neuroscience*, *40*(11), 3573–3590. <https://doi.org/10.1111/ejn.12737>
- Arriza, J. L., Weinberger, C., Cerelli, G., Glaser, T. M., Handelin, B. L., Housman, D. E., & Evans, R. M. (1987). Cloning of Human Mineralocorticoid Receptor Complementary DNA: Structural and Functional Kinship with the Glucocorticoid Receptor. *Science*, *237*(4812), 268–275. <https://doi.org/10.1126/science.3037703>
- Arshadi, C., Günther, U., Eddison, M., Harrington, K. I. S., & Ferreira, T. A. (2021). SNT: A unifying toolbox for quantification of neuronal anatomy. *Nature Methods*, *18*(4), 374–377. <https://doi.org/10.1038/s41592-021-01105-7>
- Baker, L. P., Daggett, D. F., & Peng, H. B. (1994). Concentration of pp125 focal adhesion kinase (FAK) at the myotendinous junction. *Journal of Cell Science*, *107*(6), 1485–1497. <https://doi.org/10.1242/jcs.107.6.1485>
- Bamji, S. X., Rico, B., Kimes, N., & Reichardt, L. F. (2006). BDNF mobilizes synaptic vesicles and enhances synapse formation by disrupting cadherin- β -catenin interactions. *The Journal of Cell Biology*, *174*(2), 289–299. <https://doi.org/10.1083/jcb.200601087>
- Bardy, C., Van Den Hurk, M., Eames, T., Marchand, C., Hernandez, R. V., Kellogg, M., Gorris, M., Galet, B., Palomares, V., Brown, J., Bang, A. G., Mertens, J., Böhnke, L., Boyer, L., Simon, S., & Gage, F. H. (2015). Neuronal medium that supports basic synaptic functions and activity of human neurons in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(20). <https://doi.org/10.1073/pnas.1504393112>
- Barfield, E. T., Sequeira, M. K., Parsons, R. G., & Gourley, S. L. (2020). Morphological Responses of Excitatory Prelimbic and Orbitofrontal Cortical Neurons to Excess Corticosterone in Adolescence and Acute Stress in Adulthood. *Frontiers in Neuroanatomy*, *14*, 45. <https://doi.org/10.3389/fnana.2020.00045>
- Barria, A., Muller, D., Derkach, V., Griffith, L. C., & Soderling, T. R. (1997). Regulatory Phosphorylation of AMPA-Type Glutamate Receptors by CaM-KII During Long-Term Potentiation. *Science*, *276*(5321), 2042–2045. <https://doi.org/10.1126/science.276.5321.2042>
- Bassil, K., De Nijs, L., Rutten, B. P. F., Van Den Hove, D. L. A., & Kenis, G. (2022). In vitro modeling of glucocorticoid mechanisms in stress-related mental disorders: Current challenges and future perspectives. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *10*, 1046357. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.1046357>

- Bassil, K., Krontira, A. C., Leroy, T., Escoto, A. I. H., Snijders, C., Pernia, C. D., Pasterkamp, R. J., de Nijs, L., van den Hove, D., Kenis, G., Boks, M. P., Vadodaria, K., Daskalakis, N. P., Binder, E. B., & Rutten, B. P. F. (2023). In vitro modeling of the neurobiological effects of glucocorticoids: A review. *Neurobiology of Stress*, 23, 100530. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2023.100530>
- Bączyńska, E., Pels, K. K., Basu, S., Włodarczyk, J., & Ruszczycki, B. (2021). Quantification of Dendritic Spines Remodeling under Physiological Stimuli and in Pathological Conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8), 4053. <https://doi.org/10.3390/ijms22084053>
- Bączyńska, E., Zaręba-Kozioł, M., Ruszczycki, B., Krzystyniak, A., Wójtowicz, T., Bijata, K., Pochwat, B., Magnowska, M., Roszkowska, M., Figiel, I., Masternak, J., Pytyś, A., Dzwonek, J., Worch, R., Olszyński, K. H., Wardak, A. D., Szymczak, P., Labus, J., Radwańska, K., ... Włodarczyk, J. (2024). Stress resilience is an active and multifactorial process manifested by structural, functional, and molecular changes in synapses. *Neurobiology of Stress*, 33, 100683. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2024.100683>
- Beaudoin, G. M. J., Lee, S.-H., Singh, D., Yuan, Y., Ng, Y.-G., Reichardt, L. F., & Arikath, J. (2012). Culturing pyramidal neurons from the early postnatal mouse hippocampus and cortex. *Nature Protocols*, 7(9), 1741–1754. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.099>
- Benavides-Piccione, R., Fernaud-Espinosa, I., Kastanauskaite, A., & DeFelipe, J. (2025). Principles for Dendritic Spine Size and Density in Human and Mouse Cortical Pyramidal Neurons. *Journal of Comparative Neurology*, 533(6), e70060. <https://doi.org/10.1002/cne.70060>
- Berry, K. P., & Nedivi, E. (2017). Spine Dynamics: Are They All the Same? *Neuron*, 96(1), 43–55. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.08.008>
- Bijata, M., Bączyńska, E., Müller, F. E., Bijata, K., Masternak, J., Krzystyniak, A., Szewczyk, B., Siwec, M., Antoniuk, S., Roszkowska, M., Figiel, I., Magnowska, M., Olszyński, K. H., Wardak, A. D., Hogendorf, A., Ruszczycki, B., Gorinski, N., Labus, J., Stępień, T., ... Włodarczyk, J. (2022). Activation of the 5-HT7 receptor and MMP-9 signaling module in the hippocampal CA1 region is necessary for the development of depressive-like behavior. *Cell Reports*, 38(11), 110532. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110532>
- Bosch, M., Castro, J., Saneyoshi, T., Matsuno, H., Sur, M., & Hayashi, Y. (2014). Structural and Molecular Remodeling of Dendritic Spine Substructures during Long-Term Potentiation. *Neuron*, 82(2), 444–459. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.03.021>
- Bourgin, C., Murai, K. K., Richter, M., & Pasquale, E. B. (2007). The EphA4 receptor regulates dendritic spine remodeling by affecting β 1-integrin signaling pathways. *The Journal of Cell Biology*, 178(7), 1295–1307. <https://doi.org/10.1083/jcb.200610139>
- Bourne, J., & Harris, K. M. (2007a). Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? *Current Opinion in Neurobiology*, 17(3), 381–386. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2007.04.009>
- Bourne, J., & Harris, K. M. (2007b). Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? *Current Opinion in Neurobiology*, 17(3), 381–386. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2007.04.009>

- Boyer, C., Schikorski, T., & Stevens, C. F. (1998). Comparison of Hippocampal Dendritic Spines in Culture and in Brain. *The Journal of Neuroscience*, *18*(14), 5294–5300. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-14-05294.1998>
- Britanova, O., De Juan Romero, C., Cheung, A., Kwan, K. Y., Schwark, M., Gyorgy, A., Vogel, T., Akopov, S., Mitkovski, M., Agoston, D., Šestan, N., Molnár, Z., & Tarabykin, V. (2008). Satb2 Is a Postmitotic Determinant for Upper-Layer Neuron Specification in the Neocortex. *Neuron*, *57*(3), 378–392. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.12.028>
- Brown, M. C., Cary, L. A., Jamieson, J. S., Cooper, J. A., & Turner, C. E. (2005). Src and FAK Kinases Cooperate to Phosphorylate Paxillin Kinase Linker, Stimulate Its Focal Adhesion Localization, and Regulate Cell Spreading and Protrusiveness. *Molecular Biology of the Cell*, *16*(9), 4316–4328. <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-02-0131>
- Burgaya, F., & Girault, J.-A. (1996). Cloning of focal adhesion kinase, pp125FAK, from rat brain reveals multiple transcripts with different patterns of expression. *Molecular Brain Research*, *37*(1–2), 63–73. [https://doi.org/10.1016/0169-328X\(95\)00273-U](https://doi.org/10.1016/0169-328X(95)00273-U)
- Burgaya, F., Menegon, A., Menegoz, M., Valtorta, F., & Girault, J. -A. (1995). Focal Adhesion Kinase in Rat Central Nervous System. *European Journal of Neuroscience*, *7*(8), 1810–1821. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1995.tb00700.x>
- Burgaya, F., Toutant, M., Studler, J.-M., Costa, A., Le Bert, M., Gelman, M., & Girault, J.-A. (1997). Alternatively Spliced Focal Adhesion Kinase in Rat Brain with Increased Autophosphorylation Activity. *Journal of Biological Chemistry*, *272*(45), 28720–28725. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.45.28720>
- Buttgereit, F., & Scheffold, A. (2002). Rapid glucocorticoid effects on immune cells. *Steroids*, *67*(6), 529–534. [https://doi.org/10.1016/S0039-128X\(01\)00171-4](https://doi.org/10.1016/S0039-128X(01)00171-4)
- Cabrera, O., Dougherty, J., Singh, S., Swiney, B. S., Farber, N. B., & Noguchi, K. K. (2014). Lithium protects against glucocorticoid induced neural progenitor cell apoptosis in the developing cerebellum. *Brain Research*, *1545*, 54–63. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.12.014>
- Cahill, M. E., Xie, Z., Day, M., Photowala, H., Barbolina, M. V., Miller, C. A., Weiss, C., Radulovic, J., Sweatt, J. D., Disterhoft, J. F., Surmeier, D. J., & Penzes, P. (2009). Kalirin regulates cortical spine morphogenesis and disease-related behavioral phenotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(31), 13058–13063. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904636106>
- Carlstrom, L. P., Hines, J. H., Henle, S. J., & Henley, J. R. (2011). Bidirectional remodeling of β 1-integrin adhesions during chemotropic regulation of nerve growth. *BMC Biology*, *9*(1), 82. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-9-82>
- Chacón, M. R., & Fazzari, P. (2011). FAK: Dynamic integration of guidance signals at the growth cone. *Cell Adhesion & Migration*, *5*(1), 52–55. <https://doi.org/10.4161/cam.5.1.13681>
- Chacón, M. R., Navarro, A. I., Cuesto, G., del Pino, I., Scott, R., Morales, M., & Rico, B. (2012). Focal adhesion kinase regulates actin nucleation and neuronal filopodia formation during axonal growth. *Development (Cambridge)*, *139*(17), 3200–3210. <https://doi.org/10.1242/dev.080564>

- Chacón, M. R., Navarro, A. I., Cuesto, G., Del Pino, I., Scott, R., Morales, M., & Rico, B. (2012). Focal adhesion kinase regulates actin nucleation and neuronal filopodia formation during axonal growth. *Development*, *139*(17), 3200–3210. <https://doi.org/10.1242/dev.080564>
- Chang, J.-Y., Parra-Bueno, P., Laviv, T., Szatmari, E. M., Lee, S.-J. R., & Yasuda, R. (2017). CaMKII Autophosphorylation Is Necessary for Optimal Integration of Ca²⁺ Signals during LTP Induction, but Not Maintenance. *Neuron*, *94*(4), 800–808.e4. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.04.041>
- Chen, S., Wang, X., Zhang, X., Wang, W., Liu, D., Long, Z., Dai, W., Chen, Q., Xu, M., & Zhou, J. (2011). High-dose glucocorticoids induce decreases calcium in hypothalamus neurons via plasma membrane Ca²⁺ pumps. *NeuroReport*, *22*(13), 660–663. <https://doi.org/10.1097/WNR.0b013e32834a282a>
- Chen, X., Leischner, U., Rochefort, N. L., Nelken, I., & Konnerth, A. (2011). Functional mapping of single spines in cortical neurons in vivo. *Nature*, *475*(7357), 501–505. <https://doi.org/10.1038/nature10193>
- Chen, Y., Molet, J., Lauterborn, J. C., Trieu, B. H., Bolton, J. L., Patterson, K. P., Gall, C. M., Lynch, G., & Baram, T. Z. (2016). Converging, Synergistic Actions of Multiple Stress Hormones Mediate Enduring Memory Impairments after Acute Simultaneous Stresses. *The Journal of Neuroscience*, *36*(44), 11295–11307. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2542-16.2016>
- Chklovskii, D. B. (2004). Synaptic Connectivity and Neuronal Morphology. *Neuron*, *43*(5), 609–617. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.08.012>
- Chklovskii, D. B., Schikorski, T., & Stevens, C. F. (2002). Wiring Optimization in Cortical Circuits. *Neuron*, *34*(3), 341–347. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00679-7](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00679-7)
- Citri, A., & Malenka, R. C. (2008). Synaptic plasticity: Multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology*, *33*(1), 18–41. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301559>
- Cobb, B. S. (1994). Stable Association of pp60src and pp59fyn with the Focal Adhesion-Associated Protein Tyrosine Kinase, pp125FAK. *MOL. CELL. BIOL.*, *14*.
- Compans, B., Camus, C., Kallergi, E., Sposini, S., Martineau, M., Butler, C., Kechkar, A., Klaassen, R. V., Retailleau, N., Sejnowski, T. J., Smit, A. B., Sibarita, J.-B., Bartol, T. M., Perrais, D., Nikolettou, V., Choquet, D., & Hosy, E. (2021). NMDAR-dependent long-term depression is associated with increased short term plasticity through autophagy mediated loss of PSD-95. *Nature Communications*, *12*(1), 2849. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23133-9>
- Cornejo, V. H., Ofer, N., & Yuste, R. (2022). Voltage compartmentalization in dendritic spines in vivo. *Science*, *375*(6576), 82–86. <https://doi.org/10.1126/science.abg0501>
- Corsi, J.-M., Rouer, E., Girault, J.-A., & Enslin, H. (2006). Organization and post-transcriptional processing of focal adhesion kinase gene. *BMC Genomics*, *7*(1), 198. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-198>
- Crisafulli, U., Xavier, A. M., Dos Santos, F. B., Cambiaghi, T. D., Chang, S. Y., Porcionatto, M., Castilho, B. A., Malnic, B., & Glezer, I. (2018). Topical Dexamethasone Administration Impairs Protein Synthesis

and Neuronal Regeneration in the Olfactory Epithelium. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *11*, 50. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00050>

Daub, A., Sharma, P., & Finkbeiner, S. (2009). High-content screening of primary neurons: Ready for prime time. *Current Opinion in Neurobiology*, *19*(5), 537–543. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2009.10.002>

De Kloet, E. R. (2022). Brain mineralocorticoid and glucocorticoid receptor balance in neuroendocrine regulation and stress-related psychiatric etiopathologies. *Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research*, *24*, 100352. <https://doi.org/10.1016/j.coemr.2022.100352>

DePoy, L. M., Shapiro, L. P., Kietzman, H. W., Roman, K. M., & Gourley, S. L. (2019). B1-Integrins in the Developing Orbitofrontal Cortex Are Necessary for Expectancy Updating in Mice. *The Journal of Neuroscience*, *39*(34), 6644–6655. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3072-18.2019>

Deramautd, T. B., Dujardin, D., Hamadi, A., Noulet, F., Kolli, K., De Mey, J., Takeda, K., & Rondé, P. (2011). FAK phosphorylation at Tyr-925 regulates cross-talk between focal adhesion turnover and cell protrusion. *Molecular Biology of the Cell*, *22*(7), 964–975. <https://doi.org/10.1091/mbc.e10-08-0725>

Detrait, E. R., Bowers, W. J., Halterman, M. W., Giuliano, R. E., Bennice, L., Federoff, H. J., & Richfield, E. K. (2002). Reporter Gene Transfer Induces Apoptosis in Primary Cortical Neurons. *Molecular Therapy*, *5*(6), 723–730. <https://doi.org/10.1006/mthe.2002.0609>

Digilio, L., Yap, C. C., & Winckler, B. (2015). Ctip2-, Satb2-, Prox1-, and GAD65-Expressing Neurons in Rat Cultures: Preponderance of Single- and Double-Positive Cells, and Cell Type-Specific Expression of Neuron-Specific Gene Family Members, Nsg-1 (NEEP21) and Nsg-2 (P19). *PLOS ONE*, *10*(10), e0140010. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140010>

Droste, S. K., De Groote, L., Atkinson, H. C., Lightman, S. L., Reul, J. M. H. M., & Linthorst, A. C. E. (2008). Corticosterone Levels in the Brain Show a Distinct Ultradian Rhythm but a Delayed Response to Forced Swim Stress. *Endocrinology*, *149*(7), 3244–3253. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0103>

Du, J., Wang, Y., Hunter, R., Wei, Y., Blumenthal, R., Falke, C., Khairova, R., Zhou, R., Yuan, P., Machado-Vieira, R., McEwen, B. S., & Manji, H. K. (2009). Dynamic regulation of mitochondrial function by glucocorticoids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(9), 3543–3548. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812671106>

Dwivedi, Y., Roy, B., Lugli, G., Rizavi, H., Zhang, H., & Smalheiser, N. R. (2015). Chronic corticosterone-mediated dysregulation of microRNA network in prefrontal cortex of rats: Relevance to depression pathophysiology. *Translational Psychiatry*, *5*(11), e682–e682. <https://doi.org/10.1038/tp.2015.175>

Elia, L. P., Yamamoto, M., Zang, K., & Reichardt, L. F. (2006). P120 Catenin Regulates Dendritic Spine and Synapse Development through Rho-Family GTPases and Cadherins. *Neuron*, *51*(1), 43–56. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.05.018>

- Ferreira, T. A., Blackman, A. V., Oyrer, J., Jayabal, S., Chung, A. J., Watt, A. J., Sjöström, P. J., & Van Meyel, D. J. (2014). Neuronal morphometry directly from bitmap images. *Nature Methods*, *11*(10), 982–984. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3125>
- Fok, A. H. K., Huang, Y., So, B. W. L., Zheng, Q., Tse, C. S. C., Li, X., Wong, K. K.-Y., Huang, J., Lai, K.-O., & Lai, C. S. W. (2024). KIF5B plays important roles in dendritic spine plasticity and dendritic localization of PSD95 and FMRP in the mouse cortex in vivo. *Cell Reports*, *43*(3), 113906. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2024.113906>
- Forrest, M. P., Parnell, E., & Penzes, P. (2018). Dendritic structural plasticity and neuropsychiatric disease. *Nature Reviews Neuroscience*, *19*(4), 215–234. <https://doi.org/10.1038/nrn.2018.16>
- Frahm, K. A., Waldman, J. K., Luthra, S., Rudine, A. C., Monaghan-Nichols, A. P., Chandran, U. R., & DeFranco, D. B. (2018). A comparison of the sexually dimorphic dexamethasone transcriptome in mouse cerebral cortical and hypothalamic embryonic neural stem cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *471*, 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.05.026>
- Frost, N. A., Shroff, H., Kong, H., Betzig, E., & Blanpied, T. A. (2010). Single-Molecule Discrimination of Discrete Perisynaptic and Distributed Sites of Actin Filament Assembly within Dendritic Spines. *Neuron*, *67*(1), 86–99. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.05.026>
- Gagliardi, L., Ho, J. T., & Torpy, D. J. (2010). Corticosteroid-binding globulin: The clinical significance of altered levels and heritable mutations. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *316*(1), 24–34. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.07.015>
- Geer, E. B., Grillo, I., Li, Q., Robins, H., Cohen, V., Baratz, H., Garcia, C., Sazo, M., Lin, A., Cohen, M., Tabar, V., Mao, J., & Garland, S. N. (2024). Sleep disruption in patients with active and treated endogenous Cushing’s syndrome. *Pituitary*, *27*(5), 654–664. <https://doi.org/10.1007/s11102-024-01450-8>
- Germain, P., Staels, B., Dacquet, C., Spedding, M., & Laudet, V. (2006). Overview of Nomenclature of Nuclear Receptors. *Pharmacological Reviews*, *58*(4), 685–704. <https://doi.org/10.1124/pr.58.4.2>
- Goicoechea, S. M., Awadia, S., & Garcia-Mata, R. (2014). I’m coming to GEF you: Regulation of RhoGEFs during cell migration. *Cell Adhesion & Migration*, *8*(6), 535–549. <https://doi.org/10.4161/cam.28721>
- Golubovskaya, V., Curtin, L., Groman, A., Sexton, S., & Cance, W. G. (2015). In vivo toxicity, metabolism and pharmacokinetic properties of FAK inhibitor 14 or Y15 (1, 2, 4, 5-benzenetetramine tetrahydrochloride). *Archives of Toxicology*, *89*(7), 1095–1101. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1290-y>
- Gourley, S. L., Swanson, A. M., Jacobs, A. M., Howell, J. L., Mo, M., DiLeone, R. J., Koleske, A. J., & Taylor, J. R. (2012). Action control is mediated by prefrontal BDNF and glucocorticoid receptor binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(50), 20714–20719. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208342109>

- Gourley, S. L., Swanson, A. M., & Koleske, A. J. (2013a). Corticosteroid-Induced Neural Remodeling Predicts Behavioral Vulnerability and Resilience. *The Journal of Neuroscience*, *33*(7), 3107–3112. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2138-12.2013>
- Gourley, S. L., Swanson, A. M., & Koleske, A. J. (2013b). Corticosteroid-induced neural remodeling predicts behavioral vulnerability and resilience. *Journal of Neuroscience*, *33*(7), 3107–3112. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2138-12.2013>
- Govind, A. P., Jeyifous, O., Russell, T. A., Yi, Z., Weigel, A. V., Ramaprasad, A., Newell, L., Ramos, W., Valbuena, F. M., Casler, J. C., Yan, J.-Z., Glick, B. S., Swanson, G. T., Lippincott-Schwartz, J., & Green, W. N. (2021). Activity-dependent Golgi satellite formation in dendrites reshapes the neuronal surface glycoproteome. *eLife*, *10*, e68910. <https://doi.org/10.7554/eLife.68910>
- Grange, E., Lepetit, P., Baubet, V., Giaume, M., Leclerc, M., Gay, N., Gagnon, J., & Bobillier, P. (1994). Adrenalectomy-Induced Increase of Brain Protein Synthesis Is Antagonized by Corticosterone Replacements in Free-Moving Rats. *Journal of Neurochemistry*, *62*(3), 1079–1088. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1994.62031079.x>
- Grant, S. G., Karl, K. A., Kiebler, M. A., & Kandel, E. R. (1995). Focal adhesion kinase in the brain: Novel subcellular localization and specific regulation by Fyn tyrosine kinase in mutant mice. *Genes & Development*, *9*(15), 1909–1921. <https://doi.org/10.1101/gad.9.15.1909>
- Grant, S. G. N., Karl, K. A., Kiebler, M. A., & Kandel, E. R. (1995). Focal adhesion kinase in the brain: Novel subcellular localization and specific regulation by Fyn tyrosine kinase in mutant mice. *Genes and Development*, *9*(15), 1909–1921. <https://doi.org/10.1101/gad.9.15.1909>
- Grunditz, Å., Holbro, N., Tian, L., Zuo, Y., & Oertner, T. G. (2008). Spine Neck Plasticity Controls Postsynaptic Calcium Signals through Electrical Compartmentalization. *The Journal of Neuroscience*, *28*(50), 13457–13466. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2702-08.2008>
- Gupton, S. L., & Gertler, F. B. (2010). Integrin Signaling Switches the Cytoskeletal and Exocytic Machinery that Drives Neuritogenesis. *Developmental Cell*, *18*(5), 725–736. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.02.017>
- Hadjisavva, R., Anastasiou, O., Ioannou, P. S., Zheltkova, M., & Skourides, P. A. (2022). Adherens junctions stimulate and spatially guide integrin activation and extracellular matrix deposition. *Cell Reports*, *40*(3), 111091. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111091>
- Harris, K. M. (2025). Enhanced cycling of presynaptic vesicles during long-term potentiation in rat hippocampus. *The Journal of Physiology*, JP286983. <https://doi.org/10.1113/JP286983>
- Harris, K. M., & Weinberg, R. J. (2012). Ultrastructure of Synapses in the Mammalian Brain. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *4*(5), a005587–a005587. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005587>
- Hartmann, J., Bajaj, T., Klengel, C., Chatzinakos, C., Ebert, T., Dedic, N., McCullough, K. M., Lardenoije, R., Joëls, M., Meijer, O. C., McCann, K. E., Dudek, S. M., Sarabdjitsingh, R. A., Daskalakis, N. P., Klengel, T., Gassen, N. C., Schmidt, M. V., & Ressler, K. J. (2021). Mineralocorticoid receptors dampen

- glucocorticoid receptor sensitivity to stress via regulation of FKBP5. *Cell Reports*, 35(9), 109185. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109185>
- Harvey, C. D., Yasuda, R., Zhong, H., & Svoboda, K. (2008). The Spread of Ras Activity Triggered by Activation of a Single Dendritic Spine. *Science*, 321(5885), 136–140. <https://doi.org/10.1126/science.1159675>
- Harward, S. C., Hedrick, N. G., Hall, C. E., Parra-Bueno, P., Milner, T. A., Pan, E., Laviv, T., Hempstead, B. L., Yasuda, R., & McNamara, J. O. (2016). Autocrine BDNF–TrkB signalling within a single dendritic spine. *Nature*, 538(7623), 99–103. <https://doi.org/10.1038/nature19766>
- Haws, M. E., Jaramillo, T. C., Espinosa, F., J. Widman, A., Stuber, G. D., Sparta, D. R., Tye, K. M., Russo, S. J., Parada, L. F., Stavarache, M., Kaplitt, M., Bonci, A., & Powell, C. M. (2014). PTEN knockdown alters dendritic spine/protrusion morphology, not density. *Journal of Comparative Neurology*, 522(5), 1171–1190. <https://doi.org/10.1002/cne.23488>
- Hedrick, N. G., & Yasuda, R. (2017). Regulation of Rho GTPase proteins during spine structural plasticity for the control of local dendritic plasticity. *Current Opinion in Neurobiology*, 45, 193–201. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.06.002>
- Henley, D. E., & Lightman, S. L. (2011). New insights into corticosteroid-binding globulin and glucocorticoid delivery. *Neuroscience*, 180, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.02.053>
- Henry, F. E., Hockeimer, W., Chen, A., Mysore, S. P., & Sutton, M. A. (2017). Mechanistic target of rapamycin is necessary for changes in dendritic spine morphology associated with long-term potentiation. *Molecular Brain*, 10(1), 50. <https://doi.org/10.1186/s13041-017-0330-y>
- Hildebrand, J. D., Taylor, J. M., & Parsons, J. T. (1996). An SH3 Domain-Containing GTPase-Activating Protein for Rho and Cdc42 Associates with Focal Adhesion Kinase. *Molecular and Cellular Biology*, 16(6), 3169–3178. <https://doi.org/10.1128/MCB.16.6.3169>
- Hobbiss, A. F., Ramiro-Cortés, Y., & Israely, I. (2018). Homeostatic Plasticity Scales Dendritic Spine Volumes and Changes the Threshold and Specificity of Hebbian Plasticity. *iScience*, 8, 161–174. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2018.09.015>
- Hochwald, S. N., Nyberg, C., Zheng, M., Zheng, D., Wood, C., Massoll, N. A., Magis, A., Ostrov, D., Cance, W. G., & Golubovskaya, V. M. (2016). *A novel small molecule inhibitor of FAK decreases growth of human pancreatic cancer.*
- Hodges, J. L., Vilchez, S. M., Asmussen, H., Whitmore, L. A., & Horwitz, A. R. (2014). α -Actinin-2 Mediates Spine Morphology and Assembly of the Post-Synaptic Density in Hippocampal Neurons. *PLoS ONE*, 9(7), e101770. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101770>
- Holtmaat, A. J. G. D., Trachtenberg, J. T., Wilbrecht, L., Shepherd, G. M., Zhang, X., Knott, G. W., & Svoboda, K. (2005a). Transient and Persistent Dendritic Spines in the Neocortex In Vivo. *Neuron*, 45(2), 279–291. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.01.003>

- Holtmaat, A. J. G. D., Trachtenberg, J. T., Wilbrecht, L., Shepherd, G. M., Zhang, X., Knott, G. W., & Svoboda, K. (2005b). Transient and persistent dendritic spines in the neocortex in vivo. *Neuron*, *45*(2), 279–291. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.01.003>
- Hong, M., Wilkes, M. C., Penheiter, S. G., Gupta, S. K., Edens, M., & Leof, E. B. (2011). Non-Smad Transforming Growth Factor- β Signaling Regulated by Focal Adhesion Kinase Binding the p85 Subunit of Phosphatidylinositol 3-Kinase. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(20), 17841–17850. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.233676>
- Honkura, N., Matsuzaki, M., Noguchi, J., Ellis-Davies, G. C. R., & Kasai, H. (2008). The Subspine Organization of Actin Fibers Regulates the Structure and Plasticity of Dendritic Spines. *Neuron*, *57*(5), 719–729. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.01.013>
- Hood, S., & Amir, S. (2017). The aging clock: Circadian rhythms and later life. *Journal of Clinical Investigation*, *127*(2), 437–446. <https://doi.org/10.1172/JCI90328>
- Howell, K. R., Kutiyawalla, A., & Pillai, A. (2011). Long-Term Continuous Corticosterone Treatment Decreases VEGF Receptor-2 Expression in Frontal Cortex. *PLoS ONE*, *6*(5), e20198. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020198>
- Hsia, D. A., Mitra, S. K., Hauck, C. R., Streblow, D. N., Nelson, J. A., Ilic, D., Huang, S., Li, E., Nemerow, G. R., Leng, J., Spencer, K. S. R., Cheresch, D. A., & Schlaepfer, D. D. (2003). Differential regulation of cell motility and invasion by FAK. *The Journal of Cell Biology*, *160*(5), 753–767. <https://doi.org/10.1083/jcb.200212114>
- Hu, M., Fan, M., Zhen, J., Lin, J., Wang, Q., Lv, Z., & Wang, R. (2017). FAK contributes to proteinuria in hypercholesterolaemic rats and modulates podocyte F-actin re-organization via activating p38 in response to ox-LDL. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *21*(3), 552–567. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13001>
- Hyun, S.-A., Lee, Y. J., Jang, S., Ko, M. Y., Lee, C. Y., Cho, Y. W., Yun, Y. E., Lee, B.-S., Seo, J.-W., Moon, K.-S., & Ka, M. (2022). Adipose stem cell-derived extracellular vesicles ameliorates corticosterone-induced apoptosis in the cortical neurons via inhibition of ER stress. *Stem Cell Research & Therapy*, *13*(1), 110. <https://doi.org/10.1186/s13287-022-02785-4>
- Ibata, K., Sun, Q., & Turrigiano, G. G. (2008). Rapid Synaptic Scaling Induced by Changes in Postsynaptic Firing. *Neuron*, *57*(6), 819–826. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.02.031>
- Iwano, T., Masuda, A., Kiyonari, H., Enomoto, H., & Matsuzaki, F. (2012). Prox1 postmitotically defines dentate gyrus cells by specifying granule cell identity over CA3 pyramidal cell fate in the hippocampus. *Development*, *139*(16), 3051–3062. <https://doi.org/10.1242/dev.080002>
- Jafari, M., Seese, R. R., Babayan, A. H., Gall, C. M., & Lauterborn, J. C. (2012). Glucocorticoid Receptors are Localized to Dendritic Spines and Influence Local Actin Signaling. *Molecular Neurobiology*, *46*(2), 304–315. <https://doi.org/10.1007/s12035-012-8288-3>

- Jeanneteau, F., Garabedian, M. J., & Chao, M. V. (2008). Activation of Trk neurotrophin receptors by glucocorticoids provides a neuroprotective effect. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(12), 4862–4867. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709102105>
- Joëls, M., Sarabdjitsingh, R. A., & Karst, H. (2012). Unraveling the Time Domains of Corticosteroid Hormone Influences on Brain Activity: Rapid, Slow, and Chronic Modes. *Pharmacological Reviews*, *64*(4), 901–938. <https://doi.org/10.1124/pr.112.005892>
- Kaech, S., & Banker, G. (2006). Culturing hippocampal neurons. *Nature Protocols*, *1*(5), 2406–2415. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.356>
- Kanchanawong, P., Shtengel, G., Pasapera, A. M., Ramko, E. B., Davidson, M. W., Hess, H. F., & Waterman, C. M. (2010). Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions. *Nature*, *468*(7323), 580–584. <https://doi.org/10.1038/nature09621>
- Kaneko, M., Xie, Y., An, J. J., Stryker, M. P., & Xu, B. (2012). Dendritic BDNF Synthesis Is Required for Late-Phase Spine Maturation and Recovery of Cortical Responses Following Sensory Deprivation. *The Journal of Neuroscience*, *32*(14), 4790–4802. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4462-11.2012>
- Kang, H. J., Voleti, B., Hajszan, T., Rajkowska, G., Stockmeier, C. A., Licznarski, P., Lepack, A., Majik, M. S., Jeong, L. S., Banasr, M., Son, H., & Duman, R. S. (2012). Decreased expression of synapse-related genes and loss of synapses in major depressive disorder. *Nature Medicine*, *18*(9), 1413–1417. <https://doi.org/10.1038/nm.2886>
- Kang, M.-G., Guo, Y., & Huganir, R. L. (2009). AMPA receptor and GEF-H1/Lfc complex regulates dendritic spine development through RhoA signaling cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(9), 3549–3554. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812861106>
- Kasai, H., Fukuda, M., Watanabe, S., Hayashi-Takagi, A., & Noguchi, J. (2010). Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition. *Trends in Neurosciences*, *33*(3), 121–129. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2010.01.001>
- Kayser, M. S., Nolt, M. J., & Dalva, M. B. (2008). EphB Receptors Couple Dendritic Filopodia Motility to Synapse Formation. *Neuron*, *59*(1), 56–69. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.05.007>
- Kelava, I., Chiaradia, I., Pellegrini, L., Kalinka, A. T., & Lancaster, M. A. (2022). Androgens increase excitatory neurogenic potential in human brain organoids. *Nature*, *602*(7895), 112–116. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04330-4>
- Kellner, Y., GÄ¶decke, N., Dierkes, T., Thieme, N., Zagrebelsky, M., & Korte, M. (2014). The BDNF effects on dendritic spines of mature hippocampal neurons depend on neuronal activity. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, *6*. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2014.00005>
- Kietzman, H. W., Shapiro, L. P., Trinoskey-Rice, G., & Gourley, S. L. (2022). Cell adhesion presence during adolescence controls the architecture of projection-defined prefrontal cortical neurons and reward-related action strategies later in life. *Developmental Cognitive Neuroscience*, *54*, 101097. <https://doi.org/10.1016/j.dcn.2022.101097>

- Kleene, R., Mzoughi, M., Joshi, G., Kalus, I., Bormann, U., Schulze, C., Xiao, M.-F., Dityatev, A., & Schachner, M. (2010). NCAM-Induced Neurite Outgrowth Depends on Binding of Calmodulin to NCAM and on Nuclear Import of NCAM and fak Fragments. *The Journal of Neuroscience*, *30*(32), 10784–10798. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0297-10.2010>
- Kokkinopoulou, I., & Moutsatsou, P. (2021). Mitochondrial Glucocorticoid Receptors and Their Actions. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(11), 6054. <https://doi.org/10.3390/ijms22116054>
- Koshman, Y. E., Chu, M., Engman, S. J., Kim, T., Iyengar, R., Robia, S. L., & Samarel, A. M. (2011). Focal Adhesion Kinase–Related Nonkinase Inhibits Vascular Smooth Muscle Cell Invasion by Focal Adhesion Targeting, Tyrosine 168 Phosphorylation, and Competition for p130^{Cas} Binding. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *31*(11), 2432–2440. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.235549>
- Koshman, Y. E., Kim, T., Chu, M., Engman, S. J., Iyengar, R., Robia, S. L., & Samarel, A. M. (2010). FRNK Inhibition of Focal Adhesion Kinase–Dependent Signaling and Migration in Vascular Smooth Muscle Cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *30*(11), 2226–2233. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.212761>
- Koukouritaki, S. B., Gravanis, A., & Stournaras, C. (1999). Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase and paxillin regulates the signaling mechanism of the rapid nongenomic action of dexamethasone on actin cytoskeleton. *Molecular Medicine*, *5*(11), 731–742. <https://doi.org/10.1007/bf03402097>
- Kula, J., Gugula, A., Blasiak, A., Bobula, B., Danielewicz, J., Kania, A., Tylko, G., & Hess, G. (2017). Diverse action of repeated corticosterone treatment on synaptic transmission, neuronal plasticity, and morphology in superficial and deep layers of the rat motor cortex. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, *469*(11), 1519–1532. <https://doi.org/10.1007/s00424-017-2036-5>
- Kumamaru, E., Numakawa, T., Adachi, N., Yagasaki, Y., Izumi, A., Niyaz, M., Kudo, M., & Kunugi, H. (2008). Glucocorticoid Prevents Brain-Derived Neurotrophic Factor-Mediated Maturation of Synaptic Function in Developing Hippocampal Neurons through Reduction in the Activity of Mitogen-Activated Protein Kinase. *Molecular Endocrinology*, *22*(3), 546–558. <https://doi.org/10.1210/me.2007-0264>
- Kumar, V., Zhang, M.-X., Swank, M. W., Kunz, J., & Wu, G.-Y. (2005). Regulation of Dendritic Morphogenesis by Ras–PI3K–Akt–mTOR and Ras–MAPK Signaling Pathways. *The Journal of Neuroscience*, *25*(49), 11288–11299. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2284-05.2005>
- Kuo, T., McQueen, A., Chen, T.-C., & Wang, J.-C. (2015a). Regulation of Glucose Homeostasis by Glucocorticoids. W J.-C. Wang & C. Harris (Red.), *Glucocorticoid Signaling* (T. 872, s. 99–126). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2895-8_5
- Kuo, T., McQueen, A., Chen, T.-C., & Wang, J.-C. (2015b). Regulation of Glucose Homeostasis by Glucocorticoids. W J.-C. Wang & C. Harris (Red.), *Glucocorticoid Signaling* (T. 872, s. 99–126). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2895-8_5
- Kurek, A., Kucharczyk, M., Detka, J., Ślusarczyk, J., Trojan, E., Głombik, K., Bojarski, B., Ludwikowska, A., Lason, W., & Budziszewska, B. (2016). Pro-apoptotic Action of Corticosterone in Hippocampal

Organotypic Cultures. *Neurotoxicity Research*, 30(2), 225–238. <https://doi.org/10.1007/s12640-016-9630-8>

Kutiyanawalla, A., Terry, A. V., & Pillai, A. (2011). Cysteamine Attenuates the Decreases in TrkB Protein Levels and the Anxiety/Depression-Like Behaviors in Mice Induced by Corticosterone Treatment. *PLoS ONE*, 6(10), e26153. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026153>

Kvarta, M. D., Bradbrook, K. E., Dantrassy, H. M., Bailey, A. M., & Thompson, S. M. (2015). Corticosterone mediates the synaptic and behavioral effects of chronic stress at rat hippocampal temporoammonic synapses. *Journal of Neurophysiology*, 114(3), 1713–1724. <https://doi.org/10.1152/jn.00359.2015>

Lai, K.-O., Wong, A. S. L., Cheung, M.-C., Xu, P., Liang, Z., Lok, K.-C., Xie, H., Palko, M. E., Yung, W.-H., Tessarollo, L., Cheung, Z. H., & Ip, N. Y. (2012). TrkB phosphorylation by Cdk5 is required for activity-dependent structural plasticity and spatial memory. *Nature Neuroscience*, 15(11), 1506–1515. <https://doi.org/10.1038/nn.3237>

Lambert, J. T., Hill, T. C., Park, D. K., Culp, J. H., & Zito, K. (2017). Protracted and asynchronous accumulation of PSD95-family MAGUKs during maturation of nascent dendritic spines. *Developmental Neurobiology*, 77(10), 1161–1174. <https://doi.org/10.1002/dneu.22503>

Le Coq, J., Acebrón, I., Rodrigo Martin, B., López Navajas, P., & Lietha, D. (2022). New insights into FAK structure and function in focal adhesions. *Journal of Cell Science*, 135(20), jcs259089. <https://doi.org/10.1242/jcs.259089>

Lee, J. B., Wei, J., Liu, W., Cheng, J., Feng, J., & Yan, Z. (2012). Histone deacetylase 6 gates the synaptic action of acute stress in prefrontal cortex. *The Journal of Physiology*, 590(7), 1535–1546. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.224907>

Lee, S.-J. R., Escobedo-Lozoya, Y., Szatmari, E. M., & Yasuda, R. (2009). Activation of CaMKII in single dendritic spines during long-term potentiation. *Nature*, 458(7236), 299–304. <https://doi.org/10.1038/nature07842>

Lefort, C. T., Wojciechowski, K., & Hocking, D. C. (2011). N-cadherin Cell-Cell Adhesion Complexes Are Regulated by Fibronectin Matrix Assembly. *Journal of Biological Chemistry*, 286(4), 3149–3160. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.115733>

Levy, A. D., Omar, M. H., & Koleske, A. J. (2014). Extracellular matrix control of dendritic spine and synapse structure and plasticity in adulthood. *Frontiers in Neuroanatomy*, 8. <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00116>

Lietha, D., Cai, X., Ceccarelli, D. F. J., Li, Y., Schaller, M. D., & Eck, M. J. (2007). Structural Basis for the Autoinhibition of Focal Adhesion Kinase. *Cell*, 129(6), 1177–1187. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.041>

Lightman, S. L., Birnie, M. T., & Conway-Campbell, B. L. (2020). Dynamics of ACTH and Cortisol Secretion and Implications for Disease. *Endocrine Reviews*, 41(3), bnaa002. <https://doi.org/10.1210/endrev/bnaa002>

- Lightman, S. L., Wiles, C. C., Atkinson, H. C., Henley, D. E., Russell, G. M., Leendertz, J. A., McKenna, M. A., Spiga, F., Wood, S. A., & Conway-Campbell, B. L. (2008). The significance of glucocorticoid pulsatility. *European Journal of Pharmacology*, 583(2–3), 255–262. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.11.073>
- Lim, H.-W., Uhlenhaut, N. H., Rauch, A., Weiner, J., Hübner, S., Hübner, N., Won, K.-J., Lazar, M. A., Tuckermann, J., & Steger, D. J. (2015). Genomic redistribution of GR monomers and dimers mediates transcriptional response to exogenous glucocorticoid in vivo. *Genome Research*, 25(6), 836–844. <https://doi.org/10.1101/gr.188581.114>
- Lim, S.-T., Miller, N. L. G., Chen, X. L., Tancioni, I., Walsh, C. T., Lawson, C., Uryu, S., Weis, S. M., Cheresch, D. A., & Schlaepfer, D. D. (2012). Nuclear-localized focal adhesion kinase regulates inflammatory VCAM-1 expression. *Journal of Cell Biology*, 197(7), 907–919. <https://doi.org/10.1083/jcb.201109067>
- Lim, Y., Han, I., Jeon, J., Park, H., Bahk, Y.-Y., & Oh, E.-S. (2004). Phosphorylation of Focal Adhesion Kinase at Tyrosine 861 Is Crucial for Ras Transformation of Fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 279(28), 29060–29065. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401183200>
- Lin, C.-Y., Hilgenberg, L. G. W., Smith, M. A., Lynch, G., & Gall, C. M. (2008). Integrin regulation of cytoplasmic calcium in excitatory neurons depends upon glutamate receptors and release from intracellular stores. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 37(4), 770–780. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2008.01.001>
- Liston, C., Cichon, J. M., Jeanneteau, F., Jia, Z., Chao, M. V., & Gan, W.-B. (2013). Circadian glucocorticoid oscillations promote learning-dependent synapse formation and maintenance. *Nature Neuroscience*, 16(6), 698–705. <https://doi.org/10.1038/nn.3387>
- Liston, C., & Gan, W. B. (2011). Glucocorticoids are critical regulators of dendritic spine development and plasticity in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(38), 16074–16079. <https://doi.org/10.1073/pnas.1110444108>
- Liu, B., Zhang, H., Xu, C., Yang, G., Tao, J., Huang, J., Wu, J., Duan, X., Cao, Y., & Dong, J. (2011). Neuroprotective effects of icariin on corticosterone-induced apoptosis in primary cultured rat hippocampal neurons. *Brain Research*, 1375, 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.12.053>
- Luisi, B. F., Xu, W. X., Otwinowski, Z., Freedman, L. P., Yamamoto, K. R., & Sigler, P. B. (1991). Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature*, 352(6335), 497–505. <https://doi.org/10.1038/352497a0>
- Maehama, T., & Dixon, J. E. (1998). The Tumor Suppressor, PTEN/MMAC1, Dephosphorylates the Lipid Second Messenger, Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate. *Journal of Biological Chemistry*, 273(22), 13375–13378. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.22.13375>
- Magariños, A. M., & McEwen, B. S. (1995). Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: Involvement of glucocorticoid secretion and excitatory amino acid receptors. *Neuroscience*, 69(1), 89–98. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(95\)00259-L](https://doi.org/10.1016/0306-4522(95)00259-L)

- Matsuda, S., Fujita, T., Kajiya, M., Takeda, K., Shiba, H., Kawaguchi, H., & Kurihara, H. (2012). Brain-derived neurotrophic factor induces migration of endothelial cells through a TrkB–ERK–integrin $\alpha_V \beta_3$ – FAK cascade. *Journal of Cellular Physiology*, *227*(5), 2123–2129. <https://doi.org/10.1002/jcp.22942>
- Matsuzaki, M., Honkura, N., Ellis-Davies, G. C. R., & Kasai, H. (2004). Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature*, *429*(6993), 761–766. <https://doi.org/10.1038/nature02617>
- Melander, J. B., Nayebi, A., Jongbloets, B. C., Fortin, D. A., Qin, M., Ganguli, S., Mao, T., & Zhong, H. (2021). Distinct in vivo dynamics of excitatory synapses onto cortical pyramidal neurons and parvalbumin-positive interneurons. *Cell Reports*, *37*(6), 109972. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109972>
- Midzak, A., & Papadopoulos, V. (2016). Adrenal Mitochondria and Steroidogenesis: From Individual Proteins to Functional Protein Assemblies. *Frontiers in Endocrinology*, *7*. <https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00106>
- Mifsud, K. R., Kennedy, C. L. M., Salatino, S., Sharma, E., Price, E. M., Haque, S. N., Gialeli, A., Goss, H. M., Panchenko, P. E., Broxholme, J., Engledow, S., Lockstone, H., Cordero Llana, O., & Reul, J. M. H. M. (2021a). Distinct regulation of hippocampal neuroplasticity and ciliary genes by corticosteroid receptors. *Nature Communications*, *12*(1), 4737. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24967-z>
- Mifsud, K. R., Kennedy, C. L. M., Salatino, S., Sharma, E., Price, E. M., Haque, S. N., Gialeli, A., Goss, H. M., Panchenko, P. E., Broxholme, J., Engledow, S., Lockstone, H., Cordero Llana, O., & Reul, J. M. H. M. (2021b). Distinct regulation of hippocampal neuroplasticity and ciliary genes by corticosteroid receptors. *Nature Communications*, *12*(1), 4737. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24967-z>
- Mingardi, J., La Via, L., Tornese, P., Carini, G., Trontti, K., Seguni, M., Tardito, D., Bono, F., Fiorentini, C., Elia, L., Hovatta, I., Popoli, M., Musazzi, L., & Barbon, A. (2021a). miR-9-5p is involved in the rescue of stress-dependent dendritic shortening of hippocampal pyramidal neurons induced by acute antidepressant treatment with ketamine. *Neurobiology of Stress*, *15*, 100381. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2021.100381>
- Mingardi, J., La Via, L., Tornese, P., Carini, G., Trontti, K., Seguni, M., Tardito, D., Bono, F., Fiorentini, C., Elia, L., Hovatta, I., Popoli, M., Musazzi, L., & Barbon, A. (2021b). miR-9-5p is involved in the rescue of stress-dependent dendritic shortening of hippocampal pyramidal neurons induced by acute antidepressant treatment with ketamine. *Neurobiology of Stress*, *15*, 100381. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2021.100381>
- Mitra, S. K., Hanson, D. A., & Schlaepfer, D. D. (2005). Focal adhesion kinase: In command and control of cell motility. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *6*(1), 56–68. <https://doi.org/10.1038/nrm1549>
- Miyamoto, Y., Yamauchi, J., Tanoue, A., Wu, C., & Mobley, W. C. (2006). TrkB binds and tyrosine-phosphorylates Tiam1, leading to activation of Rac1 and induction of changes in cellular morphology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(27), 10444–10449. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603914103>
- Moda-Sava, R. N., Murdock, M. H., Parekh, P. K., Fetcho, R. N., Huang, B. S., Huynh, T. N., Witztum, J., Shaver, D. C., Rosenthal, D. L., Alway, E. J., Lopez, K., Meng, Y., Nellissen, L., Grosenick, L., Milner,

- T. A., Deisseroth, K., Bitto, H., Kasai, H., & Liston, C. (2019). Sustained rescue of prefrontal circuit dysfunction by antidepressant-induced spine formation. *Science*, *364*(6436), eaat8078. <https://doi.org/10.1126/science.aat8078>
- Moeller, M. L., Shi, Y., Reichardt, L. F., & Ethell, I. M. (2006a). EphB Receptors Regulate Dendritic Spine Morphogenesis through the Recruitment/Phosphorylation of Focal Adhesion Kinase and RhoA Activation. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(3), 1587–1598. <https://doi.org/10.1074/jbc.M511756200>
- Moeller, M. L., Shi, Y., Reichardt, L. F., & Ethell, I. M. (2006b). EphB receptors regulate dendritic spine morphogenesis through the recruitment/phosphorylation of focal adhesion kinase and RhoA activation. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(3), 1587–1598. <https://doi.org/10.1074/jbc.M511756200>
- Momin, A. A., Mendes, T., Barthe, P., Faure, C., Hong, S., Yu, P., Kadaré, G., Jaremko, M., Girault, J.-A., Jaremko, Ł., & Arold, S. T. (2022). PYK2 senses calcium through a disordered dimerization and calmodulin-binding element. *Communications Biology*, *5*(1), 800. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03760-8>
- Moutin, E., Hemonnot, A.-L., Seube, V., Linck, N., Rassendren, F., Perroy, J., & Compan, V. (2020). Procedures for Culturing and Genetically Manipulating Murine Hippocampal Postnatal Neurons. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, *12*, 19. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2020.00019>
- Munck, A., & Brinck-Johnsen, T. (1968). Specific and Nonspecific Physicochemical Interactions of Glucocorticoids and Related Steroids with Rat Thymus Cells in Vitro. *Journal of Biological Chemistry*, *243*(21), 5556–5565. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)91904-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)91904-6)
- Murakoshi, H., Wang, H., & Yasuda, R. (2011). Local, persistent activation of Rho GTPases during plasticity of single dendritic spines. *Nature*, *472*(7341), 100–104. <https://doi.org/10.1038/nature09823>
- Myers, J. P., & Gomez, T. M. (2011a). Focal Adhesion Kinase Promotes Integrin Adhesion Dynamics Necessary for Chemotropic Turning of Nerve Growth Cones. *The Journal of Neuroscience*, *31*(38), 13585–13595. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2381-11.2011>
- Myers, J. P., & Gomez, T. M. (2011b). Focal Adhesion Kinase Promotes Integrin Adhesion Dynamics Necessary for Chemotropic Turning of Nerve Growth Cones. *The Journal of Neuroscience*, *31*(38), 13585–13595. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2381-11.2011>
- Nakahata, Y., & Yasuda, R. (2018). Plasticity of spine structure: Local signaling, translation and cytoskeletal reorganization. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, *10*(AUG), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2018.00029>
- Naskar, S., Datta, S., & Chattarji, S. (2022). Riluzole prevents stress-induced spine plasticity in the hippocampus but mimics it in the amygdala. *Neurobiology of Stress*, *18*, 100442. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2022.100442>
- Nestler, E. J., & Russo, S. J. (2024). Neurobiological basis of stress resilience. *Neuron*, *112*(12), 1911–1929. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2024.05.001>

- Nikonenko, I., Boda, B., Steen, S., Knott, G., Welker, E., & Muller, D. (2008). PSD-95 promotes synaptogenesis and multiinnervated spine formation through nitric oxide signaling. *The Journal of Cell Biology*, *183*(6), 1115–1127. <https://doi.org/10.1083/jcb.200805132>
- Noddings, C. M., Johnson, J. L., & Agard, D. A. (2023). Cryo-EM reveals how Hsp90 and FKBP immunophilins co-regulate the glucocorticoid receptor. *Nature Structural & Molecular Biology*, *30*(12), 1867–1877. <https://doi.org/10.1038/s41594-023-01128-y>
- Nuñez, F. J., Johnstone, T. B., Corpuz, M. L., Kazarian, A. G., Mohajer, N. N., Tliba, O., Panettieri, R. A., Koziol-White, C., Roosan, M. R., & Ostrom, R. S. (2020). Glucocorticoids rapidly activate cAMP production via G_{αs} to initiate non-genomic signaling that contributes to one-third of their canonical genomic effects. *The FASEB Journal*, *34*(2), 2882–2895. <https://doi.org/10.1096/fj.201902521R>
- Oakley, R. H., & Cidlowski, J. A. (2013). The biology of the glucocorticoid receptor: New signaling mechanisms in health and disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *132*(5), 1033–1044. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.09.007>
- O'Brien, J., & Unwin, N. (2006). Organization of spines on the dendrites of Purkinje cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(5), 1575–1580. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507884103>
- O'Brien, S., Golubovskaya, V. M., Conroy, J., Liu, S., Wang, D., Liu, B., & Cance, W. G. (2014). FAK inhibition with small molecule inhibitor Y15 decreases viability, clonogenicity, and cell attachment in thyroid cancer cell lines and synergizes with targeted therapeutics. *Oncotarget*, *5*(17), 7945–7959. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2381>
- Ofer, N., Benavides-Piccione, R., DeFelipe, J., & Yuste, R. (2022). Structural Analysis of Human and Mouse Dendritic Spines Reveals a Morphological Continuum and Differences across Ages and Species. *Eneuro*, *9*(3), ENEURO.0039-22.2022. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0039-22.2022>
- Oh, W. C., Hill, T. C., & Zito, K. (2013a). Synapse-specific and size-dependent mechanisms of spine structural plasticity accompanying synaptic weakening. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(4). <https://doi.org/10.1073/pnas.1214705110>
- Oh, W. C., Hill, T. C., & Zito, K. (2013b). Synapse-specific and size-dependent mechanisms of spine structural plasticity accompanying synaptic weakening. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(4). <https://doi.org/10.1073/pnas.1214705110>
- Oncel, S., Gupta, R., Wang, Q., & Basson, M. D. (2021). ZINC40099027 Promotes Gastric Mucosal Repair in Ongoing Aspirin-Associated Gastric Injury by Activating Focal Adhesion Kinase. *Cells*, *10*(4), 908. <https://doi.org/10.3390/cells10040908>
- Ostrander, M. M., Richtand, N. M., & Herman, J. P. (2003). Stress and amphetamine induce Fos expression in medial prefrontal cortex neurons containing glucocorticoid receptors. *Brain Research*, *990*(1–2), 209–214. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2003.07.001>
- Oyamada, N., Sone, M., Miyashita, K., Park, K., Taura, D., Inuzuka, M., Sonoyama, T., Tsujimoto, H., Fukunaga, Y., Tamura, N., Itoh, H., & Nakao, K. (2008). The Role of Mineralocorticoid Receptor

- Expression in Brain Remodeling after Cerebral Ischemia. *Endocrinology*, 149(8), 3764–3777. <https://doi.org/10.1210/en.2007-1770>
- Ozcan, A. S. (2017). Filopodia: A Rapid Structural Plasticity Substrate for Fast Learning. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 9, 12. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2017.00012>
- Pandya, C., Kutiyawalla, A., Turecki, G., & Pillai, A. (2014a). Glucocorticoid regulates TrkB protein levels via c-Cbl dependent ubiquitination: A decrease in c-Cbl mRNA in the prefrontal cortex of suicide subjects. *Psychoneuroendocrinology*, 45, 108–118. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2014.03.020>
- Pandya, C., Kutiyawalla, A., Turecki, G., & Pillai, A. (2014b). Glucocorticoid regulates TrkB protein levels via c-Cbl dependent ubiquitination: A decrease in c-Cbl mRNA in the prefrontal cortex of suicide subjects. *Psychoneuroendocrinology*, 45, 108–118. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2014.03.020>
- Patel, R., Williams-Dautovich, J., & Cummins, C. L. (2014). Minireview: New Molecular Mediators of Glucocorticoid Receptor Activity in Metabolic Tissues. *Molecular Endocrinology*, 28(7), 999–1011. <https://doi.org/10.1210/me.2014-1062>
- Payne, A. H., & Hales, D. B. (2004). Overview of Steroidogenic Enzymes in the Pathway from Cholesterol to Active Steroid Hormones. *Endocrine Reviews*, 25(6), 947–970. <https://doi.org/10.1210/er.2003-0030>
- Pchitskaya, E., & Bezprozvanny, I. (2020). Dendritic Spines Shape Analysis—Classification or Clusterization? Perspective. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 12, 31. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2020.00031>
- Peng, X., Wu, X., Druso, J. E., Wei, H., Park, A. Y.-J., Kraus, M. S., Alcaraz, A., Chen, J., Chien, S., Cerione, R. A., & Guan, J.-L. (2008). Cardiac developmental defects and eccentric right ventricular hypertrophy in cardiomyocyte focal adhesion kinase (FAK) conditional knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(18), 6638–6643. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802319105>
- Penzes, P., Cahill, M. E., Jones, K. A., VanLeeuwen, J.-E., & Woolfrey, K. M. (2011). Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nature Neuroscience*, 14(3), 285–293. <https://doi.org/10.1038/nn.2741>
- Peters, A., & Kaiserman-Abramof, I. R. (1970). The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines. *American Journal of Anatomy*, 127(4), 321–355. <https://doi.org/10.1002/aja.1001270402>
- Petridou, N. I., Stylianou, P., & Skourides, P. A. (2013). A dominant-negative provides new insights into FAK regulation and function in early embryonic morphogenesis. *Development*, 140(20), 4266–4276. <https://doi.org/10.1242/dev.096073>
- Pierce, J. P., Mayer, T., & McCarthy, J. B. (2001). Evidence for a satellite secretory pathway in neuronal dendritic spines. *Current Biology*, 11(5), 351–355. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00077-X](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00077-X)
- Ping, Y.-Q., Mao, C., Xiao, P., Zhao, R.-J., Jiang, Y., Yang, Z., An, W.-T., Shen, D.-D., Yang, F., Zhang, H., Qu, C., Shen, Q., Tian, C., Li, Z., Li, S., Wang, G.-Y., Tao, X., Wen, X., Zhong, Y.-N., ... Sun, J.-P. (2021). Structures of the glucocorticoid-bound adhesion receptor GPR97–Go complex. *Nature*, 589(7843), 620–626. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-03083-w>

- Playford, M., Vadali, K., Cai, X., Burridge, K., & Schaller, M. (2008). Focal Adhesion Kinase regulates cell–cell contact formation in epithelial cells via modulation of Rho. *Experimental Cell Research*, *314*(17), 3187–3197. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.08.010>
- Prange, O., & Murphy, T. H. (2001a). Modular Transport of Postsynaptic Density-95 Clusters and Association with Stable Spine Precursors during Early Development of Cortical Neurons. *The Journal of Neuroscience*, *21*(23), 9325–9333. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-23-09325.2001>
- Prange, O., & Murphy, T. H. (2001b). Modular Transport of Postsynaptic Density-95 Clusters and Association with Stable Spine Precursors during Early Development of Cortical Neurons. *The Journal of Neuroscience*, *21*(23), 9325–9333. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-23-09325.2001>
- Pujo, J. M., Fitriani, D. Y., Ben Saad, H., Ghariani, M., Dghim, A., Mellouli, M., Burin, A., Mutricy, R., Houcke, S., Roujansky, A., Mansyur, M., Nkontcho, F., De Toffol, B., Ben Amara, I., & Kallel, H. (2023). The effects of prolonged stress exposure on the brain of rats and insights to understand the impact of work-related stress on caregivers. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *17*, 1288814. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2023.1288814>
- Radley, J. J., Rocher, A. B., Miller, M., Janssen, W. G. M., Liston, C., Hof, P. R., McEwen, B. S., & Morrison, J. H. (2006). Repeated Stress Induces Dendritic Spine Loss in the Rat Medial Prefrontal Cortex. *Cerebral Cortex*, *16*(3), 313–320. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhi104>
- Radley, J. J., Rocher, A. B., Rodriguez, A., Douglas, B., Dammann, M., McEwen, B. S., Morrison, J. H., Susan, L., & Hof, P. R. (2009). Repeated Stress Alters Dendritic Spine Morphology. *Journal of Comparative Neurology*, *507*(1), 1141–1150. <https://doi.org/10.1002/cne.21588>. REPEATED
- Rafa-Zabłocka, K., Zelek-Molik, A., Tepper, B., Chmielarz, P., Kreiner, G., Wilczkowski, M., & Nalepa, I. (2021). Chronic restraint stress induces changes in the cerebral Galpha 12/13 and Rho-GTPase signaling network. *Pharmacological Reports*, *73*(4), 1179–1187. <https://doi.org/10.1007/s43440-021-00294-4>
- Raponi, E., Agenes, F., Delphin, C., Assard, N., Baudier, J., Legraverend, C., & Deloulme, J. (2007). S100B expression defines a state in which GFAP-expressing cells lose their neural stem cell potential and acquire a more mature developmental stage. *Glia*, *55*(2), 165–177. <https://doi.org/10.1002/glia.20445>
- Rashmi, More, S. K., Wang, Q., Vomhof-DeKrey, E. E., Porter, J. E., & Basson, M. D. (2021). ZINC40099027 activates human focal adhesion kinase by accelerating the enzymatic activity of the FAK kinase domain. *Pharmacology Research & Perspectives*, *9*(2), e00737. <https://doi.org/10.1002/prp2.737>
- Reul, J. M. H. M., & Kloet, E. R. D. (1985a). Two Receptor Systems for Corticosterone in Rat Brain: Microdistribution and Differential Occupation. *Endocrinology*, *117*(6), 2505–2511. <https://doi.org/10.1210/endo-117-6-2505>
- Reul, J. M. H. M., & Kloet, E. R. D. (1985b). Two Receptor Systems for Corticosterone in Rat Brain: Microdistribution and Differential Occupation. *Endocrinology*, *117*(6), 2505–2511. <https://doi.org/10.1210/endo-117-6-2505>

- Rico, B., Beggs, H. E., Schahin-Reed, D., Kimes, N., Schmidt, A., & Reichardt, L. F. (2004). Control of axonal branching and synapse formation by focal adhesion kinase. *Nature Neuroscience*, *7*(10), 1059–1069. <https://doi.org/10.1038/nm1317>
- Riggs, D. L., Roberts, P. J., Chirillo, S. C., Cheung-Flynn, J., Prapapanich, V., Ratajczak, T., Gaber, R., Picard, D., & Smith, D. F. (2003). The Hsp90-binding peptidylprolyl isomerase FKBP52 potentiates glucocorticoid signaling in vivo. *The EMBO Journal*, *22*(5), 1158–1167. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg108>
- Rodrigues, B., Leitão, R. A., Santos, M., Trofimov, A., Silva, M., Inácio, Â. S., Abreu, M., Nobre, R. J., Costa, J., Cardoso, A. L., Milosevic, I., Peça, J., Oliveiros, B., Pereira De Almeida, L., Pinheiro, P. S., & Carvalho, A. L. (2025). MiR-186-5p inhibition restores synaptic transmission and neuronal network activity in a model of chronic stress. *Molecular Psychiatry*, *30*(3), 1034–1046. <https://doi.org/10.1038/s41380-024-02715-1>
- Rosser, A. E., Tyers, P., Ter Borg, M., Dunnett, S. B., & Svendsen, C. N. (1997). Co-expression of MAP-2 and GFAP in cells developing from rat EGF responsive precursor cells. *Developmental Brain Research*, *98*(2), 291–295. [https://doi.org/10.1016/s0165-3806\(96\)00189-7](https://doi.org/10.1016/s0165-3806(96)00189-7)
- Roy, B., Dunbar, M., Shelton, R. C., & Dwivedi, Y. (2017). Identification of MicroRNA-124-3p as a Putative Epigenetic Signature of Major Depressive Disorder. *Neuropsychopharmacology*, *42*(4), 864–875. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.175>
- Ruszczycski, B., Szepesi, Z., Wilczynski, G. M., Bijata, M., Kalita, K., Kaczmarek, L., & Wlodarczyk, J. (2012). Sampling issues in quantitative analysis of dendritic spines morphology. *BMC Bioinformatics*, *13*(1), 213. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-213>
- Sala, N., Paoli, C., Bonifacino, T., Mingardi, J., Schiavon, E., La Via, L., Milanese, M., Tornese, P., Datusalia, A. K., Rosa, J., Facchinetti, R., Frumento, G., Carini, G., Salerno Scarzella, F., Scuderi, C., Forti, L., Barbon, A., Bonanno, G., Popoli, M., & Musazzi, L. (2022). Acute Ketamine Facilitates Fear Memory Extinction in a Rat Model of PTSD Along With Restoring Glutamatergic Alterations and Dendritic Atrophy in the Prefrontal Cortex. *Frontiers in Pharmacology*, *13*, 759626. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.759626>
- Samarasinghe, R. A., Di Maio, R., Volonte, D., Galbiati, F., Lewis, M., Romero, G., & DeFranco, D. B. (2011). Nongenomic glucocorticoid receptor action regulates gap junction intercellular communication and neural progenitor cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(40), 16657–16662. <https://doi.org/10.1073/pnas.1102821108>
- Sanchez-Arias, J. C., Candlish, R. C., Van Der Slagt, E., & Swayne, L. A. (2020). Pannexin 1 Regulates Dendritic Protrusion Dynamics in Immature Cortical Neurons. *Eneuro*, *7*(4), ENEURO.0079-20.2020. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0079-20.2020>
- Saneyoshi, T., Matsuno, H., Suzuki, A., Murakoshi, H., Hedrick, N. G., Agnello, E., O’Connell, R., Stratton, M. M., Yasuda, R., & Hayashi, Y. (2019). Reciprocal Activation within a Kinase-Effector Complex Underlying Persistence of Structural LTP. *Neuron*, *102*(6), 1199-1210.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.04.012>

- Sarabdjitsingh, R. A., Spiga, F., Oitzl, M. S., Kershaw, Y., Meijer, O. C., Lightman, S. L., & De Kloet, E. R. (2010). Recovery from Disrupted Ultradian Glucocorticoid Rhythmicity Reveals a Dissociation Between Hormonal and Behavioural Stress Responsiveness. *Journal of Neuroendocrinology*, *22*(8), 862–871. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2010.02004.x>
- Sarnat, H. B., Nochlin, D., & Born, D. E. (1998). Neuronal nuclear antigen (NeuN): A marker of neuronal maturation in the early human fetal nervous system. *Brain and Development*, *20*(2), 88–94. [https://doi.org/10.1016/s0387-7604\(97\)00111-3](https://doi.org/10.1016/s0387-7604(97)00111-3)
- Schaller, M. D., Borgman, C. A., & Parsons, J. T. (1993). Autonomous Expression of a Noncatalytic Domain of the Focal Adhesion-Associated Protein Tyrosine Kinase pp125^{FAK}. *Molecular and Cellular Biology*, *13*(2), 785–791. <https://doi.org/10.1128/mcb.13.2.785-791.1993>
- Schaller, M. D., Hildebrand, J. D., Shannon, J. D., Fox, J. W., Vines, R. R., & Parsons, J. T. (1994a). Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src. *Molecular and Cellular Biology*, *14*(3), 1680–1688. <https://doi.org/10.1128/MCB.14.3.1680>
- Schaller, M. D., Hildebrand, J. D., Shannon, J. D., Fox, J. W., Vines, R. R., & Parsons, J. T. (1994b). Autophosphorylation of the Focal Adhesion Kinase, pp125^{FAK}, Directs SH2-Dependent Binding of pp60^{src}. *Molecular and Cellular Biology*, *14*(3), 1680–1688. <https://doi.org/10.1128/mcb.14.3.1680-1688.1994>
- Scharf, S. H., Liebl, C., Binder, E. B., Schmidt, M. V., & Müller, M. B. (2011). Expression and Regulation of the Fkbp5 Gene in the Adult Mouse Brain. *PLoS ONE*, *6*(2), e16883. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016883>
- Scheswohl, D. M., Harrell, J. R., Rajfur, Z., Gao, G., Campbell, S. L., & Schaller, M. D. (2008). Multiple paxillin binding sites regulate FAK function. *Journal of Molecular Signaling*, *3*, 1. <https://doi.org/10.1186/1750-2187-3-1>
- Schlaepfer, D. D., & Hunter, T. (1998). Integrin signalling and tyrosine phosphorylation: Just the FAKs? *Trends in Cell Biology*, *8*(4), 151–157. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(97\)01172-0](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(97)01172-0)
- Schlaepfer, D. D., Jones, K. C., & Hunter, T. (1998). Multiple Grb2-Mediated Integrin-Stimulated Signaling Pathways to ERK2/Mitogen-Activated Protein Kinase: Summation of Both c-Src- and Focal Adhesion Kinase-Initiated Tyrosine Phosphorylation Events. *Molecular and Cellular Biology*, *18*(5), 2571–2585. <https://doi.org/10.1128/MCB.18.5.2571>
- Schubert, V., Da Silva, J. S., & Dotti, C. G. (2006). Localized recruitment and activation of RhoA underlies dendritic spine morphology in a glutamate receptor-dependent manner. *The Journal of Cell Biology*, *172*(3), 453–467. <https://doi.org/10.1083/jcb.200506136>
- Seah, C., Breen, M. S., Rusielewicz, T., Bader, H. N., Xu, C., Hunter, C. J., McCarthy, B., Deans, P. J. M., Chattopadhyay, M., Goldberg, J., Dobariya, S., Desarnaud, F., Makotkine, I., Flory, J. D., Bierer, L. M., Staniskyte, M., NYSCF Global Stem Cell Array® Team, Bauer, L., Brenner, K., ... Yehuda, R. (2025). Author Correction: Modeling gene × environment interactions in PTSD using human neurons reveals diagnosis-specific glucocorticoid-induced gene expression. *Nature Neuroscience*, *28*(1), 214–214. <https://doi.org/10.1038/s41593-024-01854-6>

- Sheng, J. A., Bales, N. J., Myers, S. A., Bautista, A. I., Roueifar, M., Hale, T. M., & Handa, R. J. (2021). The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis: Development, Programming Actions of Hormones, and Maternal-Fetal Interactions. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *14*, 601939. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2020.601939>
- Sheng, M., & Kim, E. (2011). The Postsynaptic Organization of Synapses. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *3*(12), a005678–a005678. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005678>
- Shi, C.-S., & Kehrl, J. H. (2001). PYK2 Links Gq α and G13 α Signaling to NF- κ B Activation. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(34), 31845–31850. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101043200>
- Shi, Y., Pontrello, C. G., DeFea, K. A., Reichardt, L. F., & Ethell, I. M. (2009). Focal Adhesion Kinase Acts Downstream of EphB Receptors to Maintain Mature Dendritic Spines by Regulating Cofilin Activity. *Journal of Neuroscience*, *29*(25), 8129–8142. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4681-08.2009>
- Shih, C.-H., Lacagnina, M., Leuer-Bisciotti, K., & Pröschel, C. (2014). Astroglial-Derived Periostin Promotes Axonal Regeneration after Spinal Cord Injury. *The Journal of Neuroscience*, *34*(7), 2438–2443. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2947-13.2014>
- Shiraki, H., Segi-Nishida, E., & Suzuki, K. (2025). Effect of chronic corticosterone administration on acute stress-mediated gene expression in the cortex and hippocampus of male mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *762*, 151729. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2025.151729>
- Shoji, H., Maeda, Y., & Miyakawa, T. (2024a). Chronic corticosterone exposure causes anxiety- and depression-related behaviors with altered gut microbial and brain metabolomic profiles in adult male C57BL/6J mice. *Molecular Brain*, *17*(1), 79. <https://doi.org/10.1186/s13041-024-01146-x>
- Shoji, H., Maeda, Y., & Miyakawa, T. (2024b). Chronic corticosterone exposure causes anxiety- and depression-related behaviors with altered gut microbial and brain metabolomic profiles in adult male C57BL/6J mice. *Molecular Brain*, *17*(1), 79. <https://doi.org/10.1186/s13041-024-01146-x>
- Siciliano, J. C., Toutant, M., Derkinderen, P., Sasaki, T., & Girault, J.-A. (1996). Differential Regulation of Proline-rich Tyrosine Kinase 2/Cell Adhesion Kinase β (PYK2/CAK β) and pp125FAK by Glutamate and Depolarization in Rat Hippocampus. *Journal of Biological Chemistry*, *271*(46), 28942–28946. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.46.28942>
- Sieg, D. J., Hauck, C. R., Ilic, D., Klingbeil, C. K., Schaefer, E., Damsky, C. H., & Schlaepfer, D. D. (2000a). FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nature Cell Biology*, *2*(5), 249–256. <https://doi.org/10.1038/35010517>
- Sieg, D. J., Hauck, C. R., Ilic, D., Klingbeil, C. K., Schaefer, E., Damsky, C. H., & Schlaepfer, D. D. (2000b). FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nature Cell Biology*, *2*(5), 249–256. <https://doi.org/10.1038/35010517>
- Soleimani, A. A., Mohammadi, A., Ghasempour, G., Abkenar, B. R., Shokri, N., & Najafi, M. (2022). Dexamethasone suppresses the proliferation and migration of VSMCs by FAK in high glucose conditions. *BMC Pharmacology and Toxicology*, *23*(1), 63. <https://doi.org/10.1186/s40360-022-00604-3>

- Soltani, M. H., Pichardo, R., Song, Z., Sangha, N., Camacho, F., Satyamoorthy, K., Sanguenza, O. P., & Setaluri, V. (2005). Microtubule-Associated Protein 2, a Marker of Neuronal Differentiation, Induces Mitotic Defects, Inhibits Growth of Melanoma Cells, and Predicts Metastatic Potential of Cutaneous Melanoma. *The American Journal of Pathology*, *166*(6), 1841–1850. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)62493-5](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)62493-5)
- Sousa, C. N. S. D., Meneses, L. N., Vasconcelos, G. S., Silva, M. C. C., Silva, J. C. D., Macêdo, D., De Lucena, D. F., & Vasconcelos, S. M. M. (2015). Reversal of corticosterone-induced BDNF alterations by the natural antioxidant alpha-lipoic acid alone and combined with desvenlafaxine: Emphasis on the neurotrophic hypothesis of depression. *Psychiatry Research*, *230*(2), 211–219. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2015.08.042>
- Srikanth, K. D., Meirson, T., Sams, D. S., & Gil-Henn, H. (2018). FAK family kinases in brain health and disease. *Journal of Molecular and Clinical Medicine*, *1*(3), 177. <https://doi.org/10.31083/j.jmcm.2018.03.007>
- Stechschulte, L. A., & Sanchez, E. R. (2011). FKBP51—A selective modulator of glucocorticoid and androgen sensitivity. *Current Opinion in Pharmacology*, *11*(4), 332–337. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2011.04.012>
- Sterlemann, V., Ganea, K., Liebl, C., Harbich, D., Alam, S., Holsboer, F., Müller, M. B., & Schmidt, M. V. (2008). Long-term behavioral and neuroendocrine alterations following chronic social stress in mice: Implications for stress-related disorders. *Hormones and Behavior*, *53*(2), 386–394. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2007.11.001>
- Sun, Y., Smirnov, M., Kamasawa, N., & Yasuda, R. (2021). Rapid Ultrastructural Changes in the PSD and Surrounding Membrane after Induction of Structural LTP in Single Dendritic Spines. *The Journal of Neuroscience*, *41*(33), 7003–7014. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1964-20.2021>
- Suwanjang, W., Holmström, K. M., Chetsawang, B., & Abramov, A. Y. (2013). Glucocorticoids reduce intracellular calcium concentration and protects neurons against glutamate toxicity. *Cell Calcium*, *53*(4), 256–263. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2012.12.006>
- Sze, Y., & Brunton, P. J. (2021). Effects of prenatal stress on neuroactive steroid responses to acute stress in adult male and female rats. *Journal of Neuroendocrinology*, *33*(1), e12916. <https://doi.org/10.1111/jne.12916>
- Takahashi, T., Kimoto, T., Tanabe, N., Hattori, T., Yasumatsu, N., & Kawato, S. (2002). Corticosterone acutely prolonged N-methyl-D-aspartate receptor-mediated Ca²⁺ elevation in cultured rat hippocampal neurons. *Journal of Neurochemistry*, *83*(6), 1441–1451. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.01251.x>
- Takei, N., Inamura, N., Kawamura, M., Namba, H., Hara, K., Yonezawa, K., & Nawa, H. (2004). Brain-Derived Neurotrophic Factor Induces Mammalian Target of Rapamycin-Dependent Local Activation of Translation Machinery and Protein Synthesis in Neuronal Dendrites. *The Journal of Neuroscience*, *24*(44), 9760–9769. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1427-04.2004>

- Tan, S., Wang, P., Hu, J., Wang, X., & Li, H. (2022). NEDD9 Mediates the FAK/Src Signaling Pathway to Promote the Adhesion of Human Trabecular Meshwork Cells after Dexamethasone Treatment. *Current Eye Research*, 47(8), 1156–1164. <https://doi.org/10.1080/02713683.2022.2071945>
- Tan, X., Yan, Y., Song, B., Zhu, S., Mei, Q., & Wu, K. (2023). Focal adhesion kinase: From biological functions to therapeutic strategies. *Experimental Hematology & Oncology*, 12(1), 83. <https://doi.org/10.1186/s40164-023-00446-7>
- Tanaka, J., Horiike, Y., Matsuzaki, M., Miyazaki, T., Ellis-Davies, G. C. R., & Kasai, H. (2008). Protein Synthesis and Neurotrophin-Dependent Structural Plasticity of Single Dendritic Spines. *Science*, 319(5870), 1683–1687. <https://doi.org/10.1126/science.1152864>
- Tanokashira, D., Morita, T., Hayashi, K., Mayanagi, T., Fukumoto, K., Kubota, Y., Yamashita, T., & Sobue, K. (2012). Glucocorticoid suppresses dendritic spine development mediated by down-regulation of caldesmon expression. *Journal of Neuroscience*, 32(42), 14583–14591. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2380-12.2012>
- Tashiro, A., & Yuste, R. (2004). Regulation of dendritic spine motility and stability by Rac1 and Rho kinase: Evidence for two forms of spine motility. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 26(3), 429–440. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2004.04.001>
- Taylor, J. M., Hildebrand, J. D., Mack, C. P., Cox, M. E., & Parsons, J. T. (1998). Characterization of Graf, the GTPase-activating Protein for Rho Associated with Focal Adhesion Kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 273(14), 8063–8070. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.14.8063>
- Taylor, W. W., Imhoff, B. R., Sathi, Z. S., Liu, W. Y., Garza, K. M., & Dias, B. G. (2021). Contributions of glucocorticoid receptors in cortical astrocytes to memory recall. *Learning & Memory*, 28(4), 126–133. <https://doi.org/10.1101/lm.053041.120>
- Thomas, J. W., Ellis, B., Boerner, R. J., Knight, W. B., White, G. C., & Schaller, M. D. (1998). SH2- and SH3-mediated Interactions between Focal Adhesion Kinase and Src. *Journal of Biological Chemistry*, 273(1), 577–583. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.1.577>
- Tønnesen, J., Katona, G., Rózsa, B., & Nägerl, U. V. (2014). Spine neck plasticity regulates compartmentalization of synapses. *Nature Neuroscience*, 17(5), 678–685. <https://doi.org/10.1038/nn.3682>
- Toutant, M., Costa, A., Studler, J.-M., Kadaré, G., Carnaud, M., & Girault, J.-A. (2002). Alternative Splicing Controls the Mechanisms of FAK Autophosphorylation. *Molecular and Cellular Biology*, 22(22), 7731–7743. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.22.7731-7743.2002>
- Toutant, M., Studler, J.-M., Burgaya, F., Costa, A., Ezan, P., & Girault, J.-A. (2000). *Autophosphorylation of Tyr397 and its phosphorylation by Src-family kinases are altered in focal-adhesion-kinase neuronal isoforms.*
- Tremblay, M.-È., Lowery, R. L., & Majewska, A. K. (2010). Microglial Interactions with Synapses Are Modulated by Visual Experience. *PLoS Biology*, 8(11), e1000527. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000527>

- Tu, H., Xu, C., Zhang, W., Liu, Q., Rondard, P., Pin, J.-P., & Liu, J. (2010). GABA_B Receptor Activation Protects Neurons from Apoptosis via IGF-1 Receptor Transactivation. *The Journal of Neuroscience*, *30*(2), 749–759. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2343-09.2010>
- Turrigiano, G. (2012). Homeostatic Synaptic Plasticity: Local and Global Mechanisms for Stabilizing Neuronal Function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *4*(1), a005736–a005736. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005736>
- Uemura, T., Mori, T., Kurihara, T., Kawase, S., Koike, R., Satoga, M., Cao, X., Li, X., Yanagawa, T., Sakurai, T., Shindo, T., & Tabuchi, K. (2016). Fluorescent protein tagging of endogenous protein in brain neurons using CRISPR/Cas9-mediated knock-in and in utero electroporation techniques. *Scientific Reports*, *6*(1), 35861. <https://doi.org/10.1038/srep35861>
- Ulrich-Lai, Y. M., & Herman, J. P. (2009). Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nature Reviews Neuroscience*, *10*(6), 397–409. <https://doi.org/10.1038/nrn2647>
- Vallés, A. M., Beuvin, M., & Boyer, B. (2004). Activation of Rac1 by Paxillin-Crk-DOCK180 Signaling Complex Is Antagonized by Rap1 in Migrating NBT-II Cells. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(43), 44490–44496. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405144200>
- Van Den Berg, G., Frölich, M., Veldhuis, J. D., & Roelfsema, F. (1995). Combined amplification of the pulsatile and basal modes of adrenocorticotropin and cortisol secretion in patients with Cushing's disease: Evidence for decreased responsiveness of the adrenal glands. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *80*(12), 3750–3757. <https://doi.org/10.1210/jcem.80.12.8530629>
- Velling, T., Nilsson, S., Stefansson, A., & Johansson, S. (2004). β 1-Integrins induce phosphorylation of Akt on serine 473 independently of focal adhesion kinase and Src family kinases. *EMBO Reports*, *5*(9), 901–905. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400234>
- Viho, E. M. G., Buurstede, J. C., Berkhout, J. B., Mahfouz, A., & Meijer, O. C. (2022). Cell type specificity of glucocorticoid signaling in the adult mouse hippocampus. *Journal of Neuroendocrinology*, *34*(2), e13072. <https://doi.org/10.1111/jne.13072>
- Vitillo, L., & Kimber, S. J. (2017). Integrin and FAK Regulation of Human Pluripotent Stem Cells. *Current Stem Cell Reports*, *3*(4), 358–365. <https://doi.org/10.1007/s40778-017-0100-x>
- Waheed, F., Speight, P., Kawai, G., Dan, Q., Kapus, A., & Szászi, K. (2010). Extracellular signal-regulated kinase and GEF-H1 mediate depolarization-induced Rho activation and paracellular permeability increase. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *298*(6), C1376–C1387. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00408.2009>
- Wan, D., Lu, T., Li, C., & Hu, C. (2024). Glucocorticoids Rapidly Modulate Cav 1.2-Mediated Calcium Signals through Kv2.1 Channel Clusters in Hippocampal Neurons. *The Journal of Neuroscience*, *44*(45), e0179242024. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0179-24.2024>
- Wang, Q., Gallardo-Macias, R., Vomhof-DeKrey, E. E., Gupta, R., Golovko, S. A., Golovko, M. Y., Oncel, S., Gurvich, V. J., & Basson, M. D. (2023). A novel drug-like water-soluble small molecule Focal

- Adhesion Kinase (FAK) activator promotes intestinal mucosal healing. *Current Research in Pharmacology and Drug Discovery*, 4, 100147. <https://doi.org/10.1016/j.crphar.2022.100147>
- Wang, Q., More, S. K., Vomhof-DeKrey, E. E., Golovko, M. Y., & Basson, M. D. (2019). Small molecule FAK activator promotes human intestinal epithelial monolayer wound closure and mouse ulcer healing. *Scientific Reports*, 9(1), 14669. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51183-z>
- Wang, X.-Q., Zhang, L., Xia, Z.-Y., Chen, J.-Y., Fang, Y., & Ding, Y.-Q. (2021). PTEN in prefrontal cortex is essential in regulating depression-like behaviors in mice. *Translational Psychiatry*, 11(1), 185. <https://doi.org/10.1038/s41398-021-01312-y>
- Wellman, C. L. (2001). Dendritic reorganization in pyramidal neurons in medial prefrontal cortex after chronic corticosterone administration. *Journal of Neurobiology*, 49(3), 245–253. <https://doi.org/10.1002/neu.1079>
- Wiegert, J. S., & Oertner, T. G. (2013). Long-term depression triggers the selective elimination of weakly integrated synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(47). <https://doi.org/10.1073/pnas.1315926110>
- Wiktorowska, L., Bilecki, W., Tertel, M., Kudla, L., Szumiec, L., Mackowiak, M., & Przewlocki, R. (2021). Knockdown of the astrocytic glucocorticoid receptor in the central nucleus of the amygdala diminishes conditioned fear expression and anxiety. *Behavioural Brain Research*, 402, 113095. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.113095>
- Windle, R. J., Wood, S. A., Lightman, S. L., & Ingram, C. D. (1998). The Pulsatile Characteristics of Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Activity in Female Lewis and Fischer 344 Rats and Its Relationship to Differential Stress Responses*. *Endocrinology*, 139(10), 4044–4052. <https://doi.org/10.1210/endo.139.10.6238>
- Włodarczyk, J., Mukhina, I., Kaczmarek, L., & Dityatev, A. (2011). Extracellular matrix molecules, their receptors, and secreted proteases in synaptic plasticity. *Developmental Neurobiology*, 71(11), 1040–1053. <https://doi.org/10.1002/dneu.20958>
- Wochnik, G. M., Rüegg, J., Abel, G. A., Schmidt, U., Holsboer, F., & Rein, T. (2005). FK506-binding Proteins 51 and 52 Differentially Regulate Dynein Interaction and Nuclear Translocation of the Glucocorticoid Receptor in Mammalian Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 280(6), 4609–4616. <https://doi.org/10.1074/jbc.M407498200>
- Woo, S., Rowan, D. J., & Gomez, T. M. (2009). Retinotopic Mapping Requires Focal Adhesion Kinase-Mediated Regulation of Growth Cone Adhesion. *The Journal of Neuroscience*, 29(44), 13981–13991. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4028-09.2009>
- Woolley, C. S., Gould, E., & McEwen, B. S. (1990). Exposure to excess glucocorticoids alters dendritic morphology of adult hippocampal pyramidal neurons. *Brain Research*, 531(1–2), 225–231. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)90778-A](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)90778-A)

Wu, Y., Li, N., Ye, C., Jiang, X., Luo, H., Zhang, B., Zhang, Y., & Zhang, Q. (2021). Focal adhesion kinase inhibitors, a heavy punch to cancer. *Discover Oncology*, *12*(1), 52. <https://doi.org/10.1007/s12672-021-00449-y>

Wyrwoll, C. S., Holmes, M. C., & Seckl, J. R. (2011). 11β -Hydroxysteroid dehydrogenases and the brain: From zero to hero, a decade of progress. *Frontiers in Neuroendocrinology*, *32*(3), 265–286. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2010.12.001>

Xia, H., Nho, R. S., Kahm, J., Kleidon, J., & Henke, C. A. (2004a). Focal Adhesion Kinase Is Upstream of Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt in Regulating Fibroblast Survival in Response to Contraction of Type I Collagen Matrices via a $\beta 1$ Integrin Viability Signaling Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(31), 33024–33034. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313265200>

Xia, H., Nho, R. S., Kahm, J., Kleidon, J., & Henke, C. A. (2004b). Focal Adhesion Kinase Is Upstream of Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt in Regulating Fibroblast Survival in Response to Contraction of Type I Collagen Matrices via a $\beta 1$ Integrin Viability Signaling Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(31), 33024–33034. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313265200>

Xie, Z., Photowala, H., Cahill, M. E., Srivastava, D. P., Woolfrey, K. M., Shum, C. Y., Haganir, R. L., & Penzes, P. (2008). Coordination of Synaptic Adhesion with Dendritic Spine Remodeling by AF-6 and Kalirin-7. *Journal of Neuroscience*, *28*(24), 6079–6091. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1170-08.2008>

Xu, J., Wang, B., & Ao, H. (2025). Corticosterone effects induced by stress and immunity and inflammation: Mechanisms of communication. *Frontiers in Endocrinology*, *16*, 1448750. <https://doi.org/10.3389/fendo.2025.1448750>

Yaneva, M., Mosnier-Pudar, H., Dugué, M.-A., Grabar, S., Fulla, Y., & Bertagna, X. (2004). Midnight Salivary Cortisol for the Initial Diagnosis of Cushing's Syndrome of Various Causes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *89*(7), 3345–3351. <https://doi.org/10.1210/jc.2003-031790>

Yang, S., Roselli, F., Patchev, A. V., Yu, S., & Almeida, O. F. X. (2013). Non-receptor-tyrosine Kinases Integrate Fast Glucocorticoid Signaling in Hippocampal Neurons. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(33), 23725–23739. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.470146>

Yang, Y. C., Ma, Y. L., Chen, S. K., Wang, C. W., & Lee, E. H. Y. (2003a). Focal Adhesion Kinase Is Required, But Not Sufficient, for the Induction of Long-Term Potentiation in Dentate Gyrus Neurons *In Vivo*. *The Journal of Neuroscience*, *23*(10), 4072–4080. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-10-04072.2003>

Yang, Y. C., Ma, Y. L., Chen, S. K., Wang, C. W., & Lee, E. H. Y. (2003b). Focal Adhesion Kinase Is Required, But Not Sufficient, for the Induction of Long-Term Potentiation in Dentate Gyrus Neurons *In Vivo*. *The Journal of Neuroscience*, *23*(10), 4072–4080. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-10-04072.2003>

Yano, H., Mazaki, Y., Kurokawa, K., Hanks, S. K., Matsuda, M., & Sabe, H. (2004). Roles played by a subset of integrin signaling molecules in cadherin-based cell–cell adhesion. *The Journal of Cell Biology*, *166*(2), 283–295. <https://doi.org/10.1083/jcb.200312013>

- Yao, H. K., Mazza, F., Prevot, T. D., Sibille, E., & Hay, E. (2025). Spine loss in depression impairs dendritic signal integration in human cortical microcircuit models. *iScience*, *28*(5), 112136. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2025.112136>
- Yasumatsu, N., Matsuzaki, M., Miyazaki, T., Noguchi, J., & Kasai, H. (2008). Principles of Long-Term Dynamics of Dendritic Spines. *The Journal of Neuroscience*, *28*(50), 13592–13608. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0603-08.2008>
- Yau, S.-Y., Li, A., Tong, J.-B., Bostrom, C., Christie, B. R., Lee, T. M. C., & So, K.-F. (2016). Chronic corticosterone administration reduces dendritic complexity in mature, but not young granule cells in the rat dentate gyrus. *Restorative Neurology and Neuroscience*, *34*(5), 849–857. <https://doi.org/10.3233/RNN-160662>
- Yuen, E. Y., Liu, W., Karatsoreos, I. N., Ren, Y., Feng, J., McEwen, B. S., & Yan, Z. (2011). Mechanisms for acute stress-induced enhancement of glutamatergic transmission and working memory. *Molecular Psychiatry*, *16*(2), 156–170. <https://doi.org/10.1038/mp.2010.50>
- Yusifov, R., Tippmann, A., Staiger, J. F., Schlüter, O. M., & Löwel, S. (2021). Spine dynamics of PSD-95-deficient neurons in the visual cortex link silent synapses to structural cortical plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *118*(10), e2022701118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2022701118>
- Yuste, R. (2010). *Dendritic spines*. MIT Press.
- Yuste, R. (2011a). Dendritic Spines and Distributed Circuits. *Neuron*, *71*(5), 772–781. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.07.024>
- Yuste, R. (2011b). Dendritic Spines and Distributed Circuits. *Neuron*, *71*(5), 772–781. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.07.024>
- Yuste, R., & Bonhoeffer, T. (2001). Morphological Changes in Dendritic Spines Associated with Long-Term Synaptic Plasticity. *Annual Review of Neuroscience*, *24*(1), 1071–1089. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.1071>
- Yuste, R., & Bonhoeffer, T. (2004a). Genesis of dendritic spines: Insights from ultrastructural and imaging studies. *Nature Reviews Neuroscience*, *5*(1), 24–34. <https://doi.org/10.1038/nrn1300>
- Yuste, R., & Bonhoeffer, T. (2004b). Genesis of dendritic spines: Insights from ultrastructural and imaging studies. *Nature Reviews Neuroscience*, *5*(1), 24–34. <https://doi.org/10.1038/nrn1300>
- Zachary, I. (1997). Focal adhesion kinase. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *29*(7), 929–934. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(97\)00008-3](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(97)00008-3)
- Zhang, H., Ben Zablah, Y., Zhang, H., & Jia, Z. (2021). Rho Signaling in Synaptic Plasticity, Memory, and Brain Disorders. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *9*, 729076. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.729076>
- Zhang, M., Zhang, Y., Sun, H., Ni, H., Sun, J., Yang, X., Chen, W., Zhao, W., Zhong, X., He, C., Ao, H., & He, S. (2021). Sinisan Protects Primary Hippocampal Neurons Against Corticosterone by Inhibiting

Autophagy via the PI3K/Akt/mTOR Pathway. *Frontiers in Psychiatry*, 12, 627056. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2021.627056>

Zhang, R.-X., Han, Y., Chen, C., Xu, L.-Z., Li, J.-L., Chen, N., Sun, C.-Y., Chen, W.-H., Zhu, W.-L., Shi, J., & Lu, L. (2016). EphB2 in the Medial Prefrontal Cortex Regulates Vulnerability to Stress. *Neuropsychopharmacology*, 41(10), 2541–2556. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.58>

Zheng, F., Soellner, D., Nunez, J., & Wang, H. (2008). The basal level of intracellular calcium gates the activation of phosphoinositide 3-kinase-Akt signaling by brain-derived neurotrophic factor in cortical neurons. *Journal of Neurochemistry*, 106(3), 1259–1274. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05478.x>

Zheng, J., Suo, L., Zhou, Y., Jia, L., Li, J., Kuang, Y., Cui, D., Zhang, X., & Wu, Q. (2022). Pyk2 suppresses contextual fear memory in an autophosphorylation-independent manner. *Journal of Molecular Cell Biology*, 13(11), 808–821. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjab057>

Zhu, Z.-H., Yang, R., Fu, X., Wang, Y.-Q., & Wu, G.-C. (2006). Astrocyte-conditioned medium protecting hippocampal neurons in primary cultures against corticosterone-induced damages via PI3-K/Akt signal pathway. *Brain Research*, 1114(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.07.070>

Spis rycin

1.1 Uproszczony schemat synapsy chemicznej	16
1.2 Klasyczne kategorie morfologiczne kolców dendrytycznych	18
1.3 Uproszczony schemat, przedstawiający molekularną budowę kolca dendrytycznego.....	19
1.4 Uproszczony schemat wydzielania i dystrybucji CORT	24
1.5 Uproszczony schemat, przedstawiający FAK jako białko adaptorowe	31
1.6 Uproszczony schemat budowy białka FAK oraz wskazanie jego potencjalnych interakcji. 33	
3.1 Schemat przebiegu wymiany medium oraz podsumowanie składu mediów wykorzystywanych na etapie wysiewania oraz procedury eksperymentalnej.....	40
3.2 Sposób analizy morfologii neuronów pierwotnych.	44
3.3 Sposób analizy morfologii kolców dendrytycznych neuronów pierwotnych.....	46
4.1 Charakterystyka hodowli pierwotnych komórek korykalnych i hipokampalnych, pochodzących z mysich embrionów.....	59
4.2 Stężenie CORT w medium hodowlanym oraz odpowiedź pierwotnych komórek korykalnych i hipokampalnych, na różne stężenia CORT, w zakresie uwalniania LDH oraz ekspresji genów FKBP5 i NR3C1.	62
4.3 Zmiany morfologiczne korykalnych neuronów pierwotnych, wywołane na skutek inkubacji hodowli pierwotnych z różnymi stężeniami CORT przez 72 godziny.	64
4.4 Zmiany morfologiczne hipokampalnych neuronów pierwotnych, wywołane na skutek inkubacji hodowli pierwotnych z różnymi stężeniami CORT przez 72 godziny.	66
4.5 Zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych korykalnych neuronów pierwotnych, wywołane przez różne stężenia CORT, w następstwie 72-godzinnej ekspozycji.....	68
4.6 Zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych hipokampalnych neuronów pierwotnych, wywołane przez różne stężenia CORT, w następstwie 72-godzinnej ekspozycji.....	70

4.7 Gęstość i średnia intensywności fluorescencji punktów PSD95 w kolcach dendrytycznych i dendrytach korykalnych neuronów pierwotnych, inkubowanych z 0.25 μ M CORT przez 72 godziny. ...	72
4.8 Gęstość i średnia intensywności fluorescencji punktów PSD95 w kolcach dendrytycznych i dendrytach hipokampalnych neuronów pierwotnych, inkubowanych z 0.25 μ M CORT przez 72 godziny. 73	73
4.9 Wpływ manipulacji aktywnością białka FAK na zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych korykalnych neuronów pierwotnych, wywołane przez 72-godziną inkubację z 0.25 μ M CORT...78	78
4.10 Wpływ manipulacji aktywnością białka FAK na zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych hipokampalnych neuronów pierwotnych, wywołane przez 72-godziną inkubację z 0.25 μ M CORT...82	82
4.11 Charakterystyka wpływu różnych czasów inkubacji korykalnych hodowli pierwotnych z 0.25 μ M CORT, na poziom mRNA genu PTK2, kodującego białko FAK.....	85
4.12 Charakterystyka wpływu 48 i 72-godzinnej inkubacji korykalnych hodowli pierwotnych z 0.25 μ M CORT, na profil ekspresji białka FAK	86
4.13 Charakterystyka wpływu różnych czasów inkubacji hipokampalnych hodowli pierwotnych z 0.25 μ M CORT, na poziom mRNA genu PTK2, kodującego białko FAK.....	88
4.14 Charakterystyka wpływu 48 i 72-godzinnej inkubacji hipokampalnych hodowli pierwotnych z 0.25 μ M CORT, na profil ekspresji białka FAK	89
4.15 Charakterystyka wpływu 72 i 48-godzinnej inkubacji korykalnych hodowli pierwotnych z 0.25 μ M CORT, na zmiany w poziomie mRNA genów kodujących białka związane z plastycznością synaptyczną i/lub wchodzące w interakcję z białkiem FAK.....	92
4.16 Charakterystyka wpływu 72-godzinnej inkubacji hipokampalnych hodowli pierwotnych z 0.25 μ M CORT, na zmiany w poziomie mRNA genów kodujących białka związane z plastycznością synaptyczną i wchodzące w interakcję z białkiem FAK	94

Spis tabel

1 Nazwa, skład i numer katalogowy najczęściej wykorzystywanych roztworów	38
2 Przeciwciała pierwszorzędowe wykorzystywane w procedurze barwienia immunofluorescencyjnego, wraz z informacją o użytym rozcieńczeniu, a także firmie i numerze katalogowym	47
3 Składniki mieszaniny reakcji RT-PCR	49
4 Warunki reakcji RT-PCR.....	49
5 Składniki mieszaniny reakcji qRT-PCR	50
6 Warunki reakcji qRT-PCR.....	50
7 Wykaz genów, których ekspresja została zbadana w przeprowadzonych eksperymentach qRT-PCR, wraz z numerami katalogowymi wykorzystywanych sond TaqMan.....	50
8 Przebieg oraz warunki reakcji elektroforezy kapilarnej oraz procedury immunodetekcji w sprzęcie Simple Jess.....	53
9 Przeciwciała pierwszo- oraz drugorzędowe wykorzystywane w reakcji kapilarnej immunodetekcji poziomu białka.....	53
10 Porównanie zmian morfologicznych kolców dendrytycznych, zachodzących w wyniku działania różnych stężeń CORT w hodowlach korykalnych oraz hipokampalnych.	110