

Wewnątrzkomórkowa ekspresja wybranych białek wiążących wapń w neuronach hipokampa u szynszyli

RADOSŁAW SZALAK, JADWIGA JAWORSKA-ADAMU

Katedra Anatomii i Histologii Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

Szalak R., Jaworska-Adamu J.

Intracellular expression of selected calcium-binding proteins in the neurons of a chinchilla's hippocampus

Summary

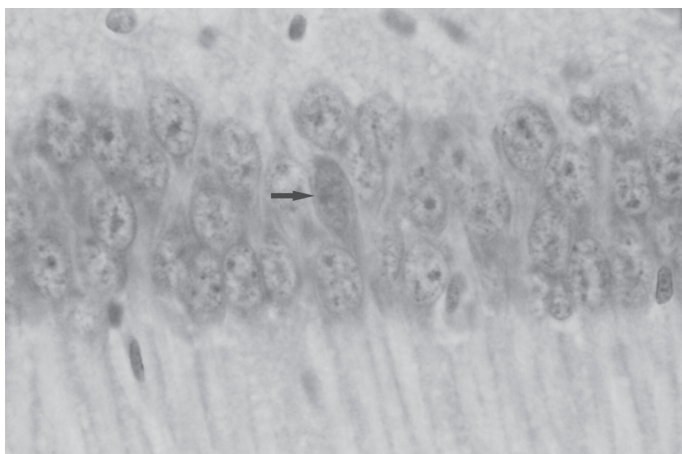
The main aim of the study was to investigate the intracellular localization of the following calcium-binding proteins: parvalbumin, calbindin and calretinin. 15 sexually mature chinchilla males (about 1.5 years old) were used in the examination. The hippocampus was collected from each immediately after the slaughter, fixed and properly prepared for immunohistochemical examinations. Peroxidase-anti-peroxidase (PAP) reaction was carried out using specific antibodies against parvalbumin and calbindin D28k, as well as calretinin.

Our own examination results have shown cytoplasmic as well as nuclear reactions in the examined regions of the hippocampal areas (CA1-CA4) and dentate gyrus. Only in the CA2 area was no nuclear reaction observed for the examined proteins, as well as in the CA1 area for calretinin. Intracellular localization of calcium-binding proteins proves that regulatory functions of parvalbumin, calbindin and calretinin lead to neuronal plasticity, i.e. to a change of their activity. Therefore, calcium-binding proteins may be indirectly involved in the regulation of metabolic processes affecting basic vital functions of neurons.

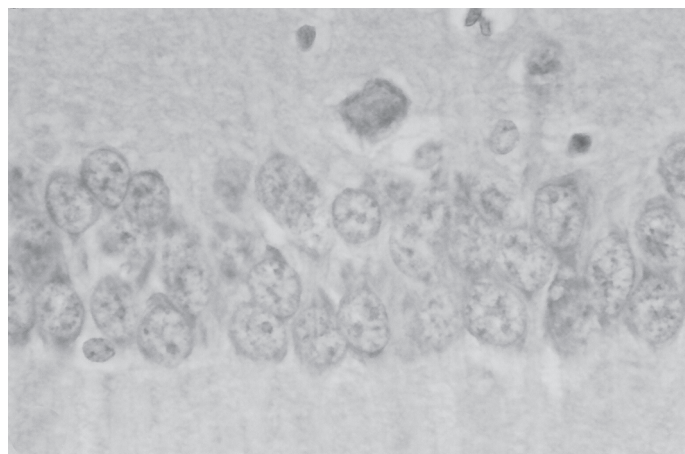
Keywords: hippocampus, calcium-binding proteins, chinchilla, PAP

Hipokamp określany „sercem” układu limbicznego, składa się z hipokampa właściwego (*hippocampus proper*) oraz pola zębatego (*area dentata*), które oddziela od siebie bruzda hipokampa (*sulcus hippocampi*). W skład pola zębatego wchodzi: zakręt zębaty (*gyrus dentatus*) i wnęka zakrętu zębatego (*hilus fasciae dentate*). Hipokamp tworzy łukowate wpuklenie do komory bocznej mózgowia i wyróżnia się w nim trzy podstawowe części: brzuszna, środkowa oraz grzbietowa (8, 34, 48). Najczęściej stosowany jest podział hipokampa wg Lorente de Nó (33) na: róg Amona – odpowiednik hipokampa właściwego, składający się z 4 pól: CA1, CA3a, CA3b, CA3c, oraz na zakręt zębaty z wnęką. Podział ten zmodyfikowano i pole CA3a określono polem CA2, CA3b polem CA3, zaś pole CA3c polem CA4, które stanowi odpowiednik wnęki zakrętu zębatego (38). Pola hipokampa budują: warstwa początkowa (*stratum oriens*), warstwa piramidalna (*stratum pyramidale*), warstwa promienista (*stratum radiatum*) oraz warstwa jamisto-drobinowa (*stratum lacunosum-moleculare*). Zakręt zębaty wykazuje prostszą, dwuwarstwową budowę, tj.: warstwę drobinową (*stratum moleculare*) oraz warstwę ziarnistą (*stratum granulosum*) (9, 14, 51). Podobnie jak w innych obszarach mózgowia ssaków w hipokam-

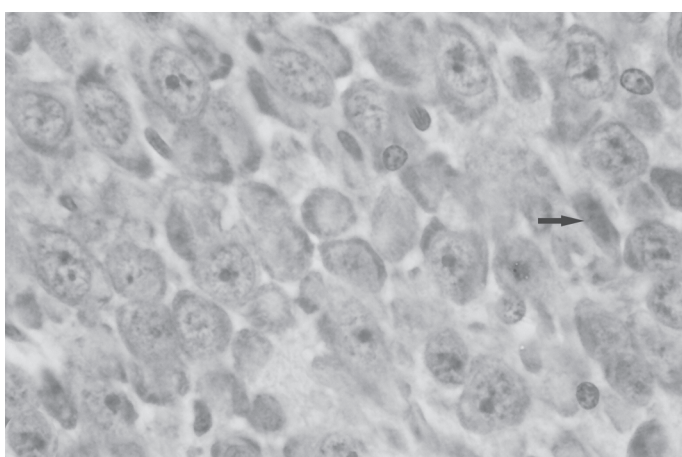
pie i zakręcie zębatym występują dwa rodzaje neuronów: neurony główne i interneurony. Wzajemne połączenia tych neuronów tworzą neuronalne sieci włączające w funkcje hipokampa (5, 32, 38, 39, 45, 46). Jony Ca^{2+} pełnią istotną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu neuronów. Regulują przemiany metaboliczne, przenoszą informacje pomiędzy organellami, wpływają na ekspresję genów w jądrze komórkowym. Nadmiar stężenia tych jonów prowadzić może do poważnych uszkodzeń, a nawet śmierci neuronów, stąd muszą istnieć w cytoplazmie odpowiednie systemy zabezpieczające neurony przed ekscytotoksycznością jonów wapnia. Tymi systemami są białka wiążące wapń: parwalbumina, kalbindyna D28k oraz kalretynina należące do rodziny białek EF-hand (26). Wspólną cechą tych białek jest obecność domen „EF” odpowiedzialnych za wiązanie jonów wapnia (3, 23). Obecnie wzrasta zainteresowanie wspomnianymi białkami, ponieważ zabezpieczają one neurony przed nadmiernym wzrostem stężenia jonów wapnia, zapobiegając ich śmierci, a funkcje tych białek są w dalszym ciągu wyjaśniane. Dobrze poznano ekspresję i rozmieszczenie parwalbuminy (PV), kalbindyny D28k (CB) oraz kalretyniny (CR) w wielu obszarach ośrodkowego układu nerwowego (OUN), włączając hipokamp i zakręt



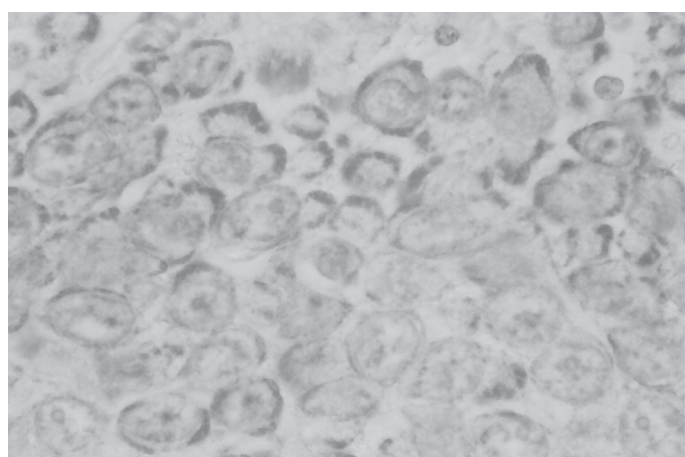
Ryc. 1. Cytoplazmatyczna i jądrowa immunoreaktywność parwalbuminy w polu CA1 hipokampa (pow. ok. 1000 ×)



Ryc. 2. Cytoplazmatyczna immunoreaktywność kalretyniny w polu CA1 hipokampa (pow. ok. 1000 ×)



Ryc. 3. Cytoplazmatyczna i jądrowa immunoreaktywność w polu CA2 hipokampa (pow. ok. 1000 ×)



Ryc. 4. Cytoplazmatyczna immunoreaktywność kalbindyny w polu CA2 hipokampa (pow. ok. 1000 ×)

zębaty u człowieka, małpy, świni, psa, szczura i myszokoczka (2, 4, 7, 11, 12, 15, 16, 28-32, 36, 37, 43, 44, 47). Dotychczas nie badano białek wiążących wapń w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) u szynszyli, jedynie w badaniach własnych przedstawiono ekspresję PV, CB i CR w niektórych obszarach OUN u tego gatunku (17-20).

Dlatego też celem była kontynuacja wcześniejszych badań rozszerzona o wewnątrzkomórkową lokalizację trzech wybranych białek wiążących wapń w neuronach hipokampa.

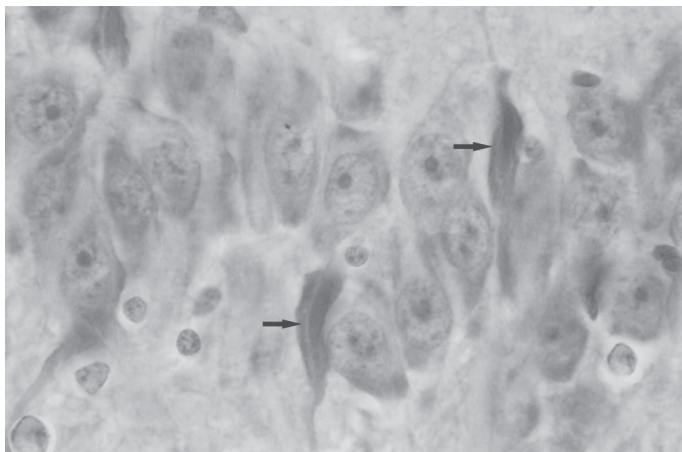
Materiał i metody

Do badań użyto mózgowia 15 dojrzałych płciowo (ok. 1,5-rocnych) samców szynszyli małej (*Chinchilla lanigera*) pochodzących z fermy „Raba” w Myślenicach. Mózgowia wypreparowano natychmiast po uboju. Materiał utrwalało w świeżej, buforowanej 10% formalinie o pH 7,0, przez 12 h w temperaturze 4°C. Po utrwaleniu materiału wykonano parafinowe bloczki rutynową techniką histologiczną. Bloczki tkankowe zawierające hipokampy skrawano w mikrotomie (MIKROM HMB40) na czołowe skrawki o grubości 6 μm na wysokości jądra grzbietowego ciała kolankowatego bocznego (*nucleus dorsalis corporis geniculatis*

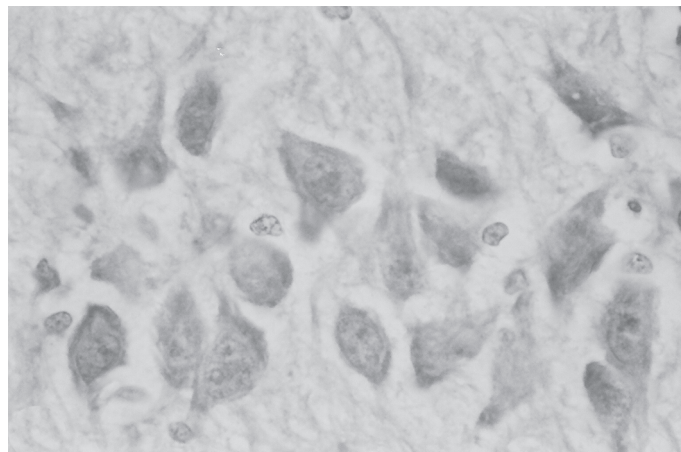
lateralis), zgodnie z atlasem stereotaktycznym (25). Następnie skrawki odparafinowano w świeżym ksylenie i nawodniono w alkoholach o malejącym stężeniu. W celu zahamowania aktywności endogennej peroksydazy inkubowano w 0,4% H₂O₂ w buforze fosforanowym, w temperaturze pokojowej przez 30 min. Następnie płukano w świeżym 0,5 M buforze trisowym (TBS-Tris Buffered Saline) o pH = 7,6. Dla usunięcia podbarwienia tła skrawki traktowano w temperaturze pokojowej przez 20 min. normalną surowicą kozią.

W celu prześledzenia wewnątrzkomórkowej lokalizacji wybranych białek wiążących wapń użyto skrawków od 5 zwierząt dla każdego białka. Przeprowadzono immunohistochemiczną reakcję peroksydaza-antyperoksydaza (PAP) z wykorzystaniem specyficznych przeciwciał skierowanych przeciwko: parwalbuminie, kalbindynie D-28k i kalretyninie (6). Do immunobarwienia użyto zestawu przeciwciał i odczynników rozcieńczanych w tym samym buforze 0,5 M TBS, w którym także dokonywano płukania preparatów po zastosowaniu każdego przeciwciała.

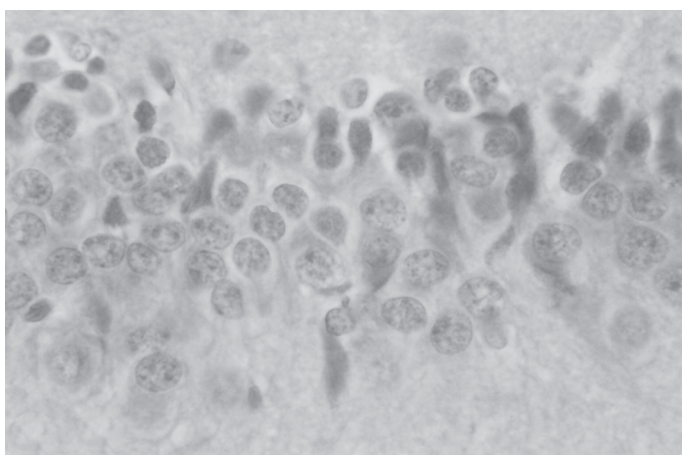
Następnie skrawki traktowano odpowiednimi monoklonalnymi immunoglobulinami (IgG), po czym przeprowadzono inkubację w monoklonalnym kompleksie peroksydaza-antyperoksydaza (PAP) rozwiniętym na odpowiednim gatunku zwierząt.



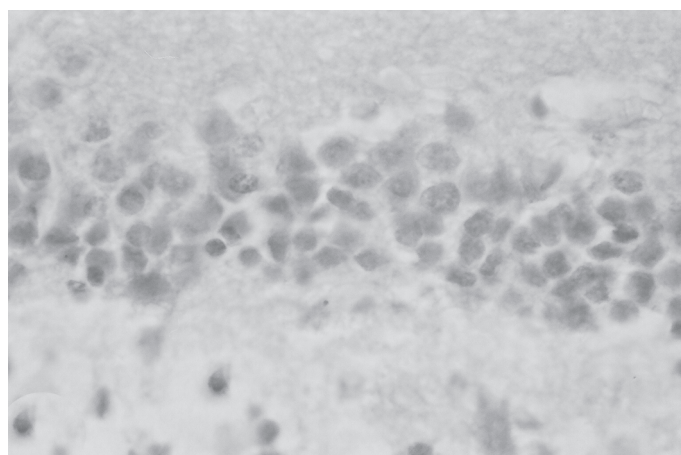
Ryc. 5. Cytoplazmatyczna i jądrowa immunoreaktywność parwalbuminy w polu CA3 hipokampa (pow. ok. 1000 ×)



Ryc. 6. Cytoplazmatyczna i jądrowa immunoreaktywność kalretyniny w polu CA4 hipokampa (pow. ok. 1000 ×)



Ryc. 7. Cytoplazmatyczna i jądrowa immunoreaktywność parwalbuminy w zakręcie zębatym (pow. ok. 1000 ×)



Ryc. 8. Cytoplazmatyczna i jądrowa immunoreaktywność kalretyniny w zakręcie zębatym (pow. ok. 1000 ×)

Dla wszystkich badanych białek jako chromogenu użyto dwuaminobenzyny (DAB, 3,3' - diaminobenzidine tetrahydrochloride, prod. Aldrich). Inkubację z DAB przeprowadzono w temperaturze pokojowej przez 30 min. i otrzymano nierozpuszczalny produkt reakcji o brązowym zabarwieniu. Następnie skrawki płukano w H₂O destylowanej, odwadniano, prześwietlano i zamykano w DPX (prod. Fluka). Dla użytej techniki immunohistochemicznej wykonano kontrolę specyficzności, w której ominięto pierwsze przeciwciało. Immunopoztywne neurony obserwowano i fotografowano w mikroskopie świetlnym Axio-lab, firmy Zeiss.

Wyniki i omówienie

Immunoreaktywność PV, CB i CR stwierdzono w neuronach pól CA1, CA2, CA3, CA4 hipokampa i zakrętu zębatego. W polu CA1 hipokampa zaobserwowano ekspresję parwalbuminy i kalbindyny w neuropłazmie, jak również w jądrach komórek nerwowych (ryc. 1). Wyłącznie cytoplazmatyczną lokalizację obserwowano dla kalretyniny (ryc. 2). Neurony pola CA2 hipokampa wykazywały cytoplazmatyczną immunoreaktywność dla parwalbuminy, kalbindyny D28k i kalretyniny (ryc. 4). Jedynie parwalbumina lokalizowała

się w jądrach komórkowych pojedynczych neuronów (ryc. 3).

Cytoplazmatyczną oraz jądrową lokalizacją parwalbuminy, kalbindyny D28k oraz kalretyniny cechowały się neurony pól CA3, CA4 hipokampa oraz zakrętu zębatego (ryc. 5, 6, 7, 8), (tab. 1). Wyniki badań własnych po raz pierwszy ujawniły jądrową lokalizację parwalbuminy, kalbindyny D28k i kalretyniny w neuronach analizowanych pól hipokampa i zakrętu zębatego szynszyli.

Do niedawna opisywano wyłącznie cytoplazmatyczną dystrybucję tych białek. Podobną jądrową lokalizację kalbindyny D28k w neuronach przedstawiono tylko w jednej dostępnej pracy (10). Inni autorzy (10, 42) sugerują możliwość występowania trzech badanych białek wiążących wapń z rodziny EF-hand w jądrze komórkowym. Zakładają, że ze względu na małą masę cząsteczkową PV, CB, CR mogą wędrować transportem biernym przez pory jądrowe i wpływać na ekspresję genów w jądrze. W związku z brakiem podobnych wyników jądrowej lokalizacji PV, CB, CR w neuronach mózgowia u innych gatunków zwierząt nie jest możliwe ich porównanie. Badane białka EF hand zabezpieczają neurony przed ekscytotoksycznością

Tab. 1. Wewnątrzkomórkowa lokalizacja parwalbuminy (PV), kalbindyny D28k (CB), kalretyniny (CR) w neuronach hipokampa (CA1-CA4) i zakrętu zębatego

Badane białka	Pola hipokampa								Zakręt zębata (GD)	
	CA1		CA2		CA3		CA4		cytoplazmatyczna	jądrowa
	cytoplazmatyczna	jądrowa	cytoplazmatyczna	jądrowa	cytoplazmatyczna	jądrowa	cytoplazmatyczna	jądrowa		
PV	+	+	+	brak/+	+	+	+	+	+	+
CB	+	+	+	brak	+	+	+	+	+	+
CR	+	brak	+	brak	+	+	+	+	+	+

jonów Ca^{2+} , chroniąc je tym samym przed zwyrodnieniem, a nawet śmiercią. Kontrola wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia przemawia za regulatorowymi funkcjami parwalbuminy, kalbindyny oraz kalretyniny prowadzącymi do plastyczności neuronów, czyli do zmiany ich aktywności. W związku z tym białka wiążące wapń są pośrednio włączone w regulację procesów metabolicznych wpływających na podstawowe funkcje życiowe neuronów. Białka wiążące wapń PV, CB i CR także uznano za neurochemiczne markery poszczególnych podklas interneuronów. Podobnie jak w korze mózgu, w hipokampie i zakręcie zębatym stanowią one trzy nie pokrywające się populacje komórkowe (1, 13, 21, 22, 24, 27, 35, 40, 41, 50). Wykazano, że interneurony z ekspresją CB i PV rządziej z CR tworzą połączenia z neuronami głównymi. Ich dojścia hamujące kończą się na ciałach komórkowych, początkowych segmentach aksonów oraz na dalszych odcinkach dendrytów komórek piramidalnych i ziarnistych. GABAergiczne neurony tworząc połączenia w postaci synaps hamujących, w konsekwencji powodują odhamowanie neuronów piramidalnych. W ten sposób interneurony zawierające trzy badane białka włączone są w modulację przekazywania synaptycznego, zwanego plastycznością synaps.

Badania własne dostarczyły nowych informacji o wewnątrzkomórkowej lokalizacji parwalbuminy, kalbindyny D28k i kalretyniny w neuronach hipokampa i zakrętu zębatego dorosłego samca szynszyli małej. Dalsze badania są niezbędne w celu określenia kolo-kalizacji badanych białek wiążących wapń z neuroprzekaznikami i neuropeptydami w neuronach pół hipokampa i zakrętu zębatego, co pozwoli na lepsze zrozumienie czynności komórek nerwowych.

Piśmienictwo

- Acsády L., Arabadzisz D., Freund T. F.: Correlated morphological and neurochemical features identify different subsets of vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive interneurons in rat hippocampus. *Neurosci.* 1996, 73, 299-315.
- Alcantara S., Soriano E., Ferrer I.: Thalamic and basal forebrain afferents modulate the development of parvalbumin and calbindin D28K immunoreactivity in the barrel cortex of the rat. *Eur. J. Neurosci.* 1996, 7, 1522-1534.
- Baimbridge K. G., Celio M. R., Rogers J. H.: Calcium-binding proteins in the nervous system. *Trends Neurosci.* 1992, 15, 303-308.
- Baimbridge K. G., Miller J. J., Parkes C. O.: Calcium binding protein distribution in the rat brain. *Brain Res.* 1982, 239, 519-525.
- Beckstead R. M.: Afferent connections of the entorhinal area in the rats as demonstrated by retrograde cell-labeling with horseradish peroxidase. *Brain Res.* 1978, 152, 249-264.
- Bergman I., Nitsch R., Frotscher M.: Area-specific morphological and neurochemical maturation of non-pyramidal neurons in the rat hippocampus as revealed by parvalbumin immunocytochemistry. *Anat. Embryol. (Berl.)* 1991, 184, 403-409.
- Celio M. R.: Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neurosci.* 1990, 35, 375-475.
- El-Falougy H., Benuska J.: History, anatomical nomenclature, comparative anatomy and functions of the hippocampal formation. *Bratisl. Lek. Listy* 2006, 107, 103-106.
- Eustachiewicz R.: Topografia i cytoarchitektonika tworów hipokampa (formatio hippocampi) u krowy. *Annales UMCS, DD* 1996, 21, 4-25.
- German D. C., Ng M. C., Liang C.-L., McMahon A., Iacopino A. M.: Calbindin-D28k in nerve cell nuclei. *Neurosci.* 1997, 81, 735-743.
- Gulyás A. I., Hájos N., Freund T. F.: Interneurons containing calretinin are specialized to control other interneurons in the rat hippocampus. *J. Neurosci.* 1996, 16, 3397-3411.
- Gulyás A. I., Miettinen R., Jacobowitz D. M., Freund T. F.: Calretinin is present non-pyramidal cells of the rat hippocampus – I. A new type of neuron specifically associated with the mossy fibre system. *Neurosci.* 1992, 48, 1-27.
- Hájos N., Acsády L., Freund T. F.: Target selectivity and neurochemical characteristics of VIP-immunoreactive interneurons in the rat dentate gyrus. *Eur. J. Neurosci.* 1996, 8, 1415-1431.
- Hereć S.: Budowa zawoju pławikonika i rogu Ammona świni. *Annales UMCS, DD* 1974, 29, 11-17.
- Hof P. R., Rosenthal R. E., Fiskum G.: Distribution of neurofilament protein and calcium-binding proteins parvalbumin, calbindin, and calretinin in the canine hippocampus. *J. Chem. Neuroanat.* 1996, 11, 1-12.
- Holm I. E., Geneser F. A., Zimmer J., Baimbridge K. G.: Immunocytochemical demonstration of the calcium binding proteins calbindin-D28k and parvalbumin in the subiculum, hippocampus and dentate area of the domestic pig. *Progr. Brain Res.* 1990, 83, 85-97.
- Jaworska-Adamu J., Szalak R.: Parvalbumin and calbindin D28k in the dorsal raphe nucleus of the chinchilla. *Bull. Vet. Inst. Puławy* 2009, 53, 791-794.
- Jaworska-Adamu J., Szalak R.: Calretinin examinations in dorsal raphe nucleus (DRN) of the chinchilla. *Bull. Vet. Inst. Puławy* 2010, 54, 247-249.
- Jaworska-Adamu J., Szalak R., Matyszek M., Szewerniak R.: Immunoreaktywność kalretyniny w istocie szarej środkowej śródmózgowia u szynszyli. *Medycyna Wet.* 2009, 65, 419-421.
- Jaworska-Adamu J., Szalak R., Szewerniak R.: Localization of parvalbumin and calbindin D28k in the periaqueductal gray matter (PAG) of chinchilla. *Bull. Vet. Inst. Puławy* 2009, 53, 309-312.
- Kawaguchi Y., Kubota Y.: Neurochemical features and synaptic connections of large physiologically- identified GABAergic cells in the rat frontal cortex. *Neurosci.* 1998, 85, 677-701.
- Kawaguchi Y., Kubota Y.: Physiological and morphological identification of somatostatin- or vasoactive intestinal polypeptide-containing cells among GABAergic cell subtypes in rat frontal cortex. *J. Neurosci.* 1996, 16, 2701-2715.
- Kawasaki H., Nakayama S., Kretsinger R. H.: Classification and evolution of EF-hand proteins. *Biometals* 1998, 11, 277-295.
- Kosaka T., Katsumaru H., Hama K., Wu J. Y., Heizmann C. W.: GABAergic neurons containing Ca^{2+} binding protein parvalbumin in the rat hippocampus and dentate gyrus. *Brain Res.* 1987, 419, 119-130.
- König J. F. R., Klippel R. A.: The rat brain. A stereotaxic atlas of the forebrain and lower parts of the brain stem. The Williams and Wilkins Company, Baltimore 1963.
- Kretsinger R. H., Nockolds C. E.: Carp muscle calcium-binding protein. II. Structure determination and general description. *J. Biol. Chem.* 1973, 248, 3313-3326.

27. Kubota Y., Kawaguchi Y.: Dependence of GABAergic synaptic areas on the interneuron type and target size. *J. Neurosci.* 2000, 20, 375-386.
28. Lee C. H., Hwang I. K., Yoo K.-Y., Choi J. H., Park O. K., Lee I. S., Won M.-H.: Parvalbumin immunoreactivity and protein level are altered in the gerbil hippocampus during normal aging. *Neurochem. Res.* 2008, 33, 2222-2228.
29. Lee C. H., Hwang I. K., Yoo K.-Y., Choi J. H., Park O. K., Lee J. C.H., Jeong Y.-G., Lee I. S., Won M.-H.: Calbindin d-28k immunoreactivity and its protein level in hippocampal subregions during normal aging in gerbils. *Cell Mol. Neurobiol.* 2009, 29, 665-672.
30. Lee Ch. H., Hwang I. K., Choi J. H., Yoo K.-Y., Park O. K., Huh S.-O., Lee Y. L., Shin H.-C.H., Won M.-H.: Age-dependent changes in calretinin immunoreactivity and its protein level in the gerbil hippocampus. *Neurochem. Res.* 2010, 35, 122-129.
31. Lee E. Y.: Distribution of parvalbumin – immunoreactive neurons in the rat hippocampus. *Chungbuk Med. J.* 1994, 4, 71-80.
32. Leranthe C., Hajszan T.: Extrinsic afferent systems to the dentate gyrus. *Prog. Brain Res.* 2007, 163, 63-84.
33. Lorente de Nó R.: Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. *J. Psychol. Neurol. (Lpz)* 1934, 46, 113-117.
34. MacLean P. D.: The limbic system and its hippocampal formation; studies in animals and their possible application to man. *J. Neurosurg.* 1954, 11, 29-44.
35. Maier D. L., McCasland J. S.: Calcium-binding protein phenotype defines metabolically distinct groups of neurons in barrel cortex of behaving hamsters. *Exp. Neurol.* 1997, 145, 71-80.
36. Müller M., Felmy F., Schwaller B., Schneggenburger R.: Parvalbumin is a mobile presynaptic Ca^{2+} buffer in the calyx of held that accelerates the decay of Ca^{2+} and short-term facilitation. *J. Neurosci.* 2007, 27, 2261-2271.
37. Nitsch R., Ohm T. G.: Calretinin immunoreactive structures in the human hippocampal formation. *J. Comp. Neurol.* 1995, 360, 475-487.
38. Raisman G., Cowan W. M., Powell T. P. S.: An experimental analysis of the efferent projections of the hippocampus. *Brain* 1966, 89, 83-107.
39. Raisman G., Cowan W. M., Powell T. P. S.: The extrinsic afferent, commissural and association fibers of the hippocampus. *Brain* 1965, 88, 963-966.
40. Ren J. Q., Aika Y. A., Heizmann C. W., Kosaka T.: Quantitative analysis of neurons and glial cells in the rat somatosensory cortex, with special reference to GABAergic neurons and parvalbumin-containing neurons. *Exp. Brain Res.* 1992, 92, 1-14.
41. Rogers J. H.: Immunohistochemical markers in cortex: co-localization of calretinin and calbindin-D28K with neuropeptides and GABA. *Brain Res.* 1992, 587, 147-157.
42. Schwaller B., Meyer M., Schiffmann S.: „New” functions for „old” proteins: the role of the calcium-binding proteins calbindin D-28k, calretinin and parvalbumin, in cerebellar physiology. Studies with knockout mice. *Cerebellum* 2002, 1, 241-258.
43. Seress L., Guliás A. I., Ferrer I., Tunon T., Soriano E., Freund T. F.: Distribution, morphological features, and synaptic connections of parvalbumin- and calbindin D28k – immunoreactive neurons in the human hippocampal formation. *J. Comp. Neurol.* 1993, 337, 208-230.
44. Seress L., Gulyás A. I., Freund T. F.: Parvalbumin- and calbindin D28k-immunoreactive neurons in the hippocampal formation of the macaque monkey. *J. Comp. Neurol.* 1991, 313, 162-177.
45. Siegel A., Edinger H., Oghami S.: The topographical organisation of the hippocampal projection to the septal area: a comparative neuroanatomical analysis in the gerbil, rat, rabbit and cat. *J. Comp. Neurol.* 1974, 157, 359-377.
46. Siegel A., Oghami S., Edinger H.: Projections of the hippocampus to the septum in the squirrel monkey. *Brain Res.* 1975, 99, 247-260.
47. Sloviter R. S.: Calcium-binding proteins (calbindin-D28k) and parvalbumin immunocytochemistry: localization in the rat hippocampus with specific reference to the selective vulnerability of hippocampal neurons to seizure activity. *J. Comp. Neurol.* 1989, 280, 183-196.
48. Sobociński M.: Układ nerwowy zwierząt domowych. PWN, Warszawa 1982, 194-196.
49. Solbach S., Celio M. R.: Ontogeny of the calcium binding protein parvalbumin in the rat nervous system. *Anat. Embryol. (Berl.)* 1991, 184, 103-124.
50. Staiger J. F., Zilles K., Freund T. F.: Distribution of GABAergic elements postsynaptic to ventroposteromedial thalamic projections in layer IV of rat barrel cortex. *Eur. J. Neurosci.* 1996, 11, 2273-2285.
51. Szalak M.: Budowa rogu Ammona i zawoju zębatego u krowy. *Annales UMCS DD* 1973, 27, 27-36.

Adres autora: dr Radosław Szalak, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin;
e-mail: radek.szalak@up.lublin.pl