

**SEMMELWEIS EGYETEM**  
**DOKTORI ISKOLA**

**Ph.D. értekezések**

**2427.**

**VARGA ZOLTÁN KRISTÓF**

**Neuroendokrinológia**

című program

Programvezető: Dr. Liposits Zsolt, kutató, osztályvezető

Témavezető: Dr. Aliczki Manó, tudományos főmunkatárs

# A defenzív viselkedés szerotonerg szabályozása gerincesekben – A zebradánió (*Danio rerio*) modell

Doktori értekezés

**Varga Zoltán Kristóf**

Semmelweis Egyetem

Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Aliczki Manó, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Gyertyán István, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Dr. Topál József, Ph.D., D.Sc., tudományos tanácsadó

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Rihmer Zoltán, D.Sc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Zachar Gergely, Ph.D., tudományos munkatárs  
Dr. Kovács Krisztina, Ph.D., kutató

Budapest

2020

## Tartalomjegyzék

<b>1. Rövidítések jegyzéke .....</b>	<b>5</b>
<b>2. Bevezetés.....</b>	<b>7</b>
2.1. Háttér .....	7
2.2. Irodalmi Áttekintés.....	8
2.2.1. A stresszkutatás jelentősége az idegtudományban és a viselkedési stressz-válasz....	8
2.2.2. A defenzív viselkedésformák mint modellek .....	9
2.2.3. A defenzív viselkedésmodellek rágcslókban és azok kiegészítései .....	13
2.2.4. A defenzív viselkedés funkcionális neuroanatómiai alapjai emlősökben .....	16
2.2.5. A defenzív viselkedés szerotonerg szabályozása emlősökben .....	18
2.2.5.1. A szerotonerg rendszer anatómiája .....	18
2.2.5.2. A szerotonin jelátvitel komponensei.....	19
2.2.5.3. A szerotonerg rendszer szerepe a defenzív viselkedésben.....	21
2.2.5.4. A szerotonerg rendszer és a viselkedési stresszválaszt irányító területek anatómiai kapcsolatai .....	21
2.2.5.5. A szerotonerg jelátvitel és a viselkedés korrelációja stresszmodellekben .....	22
2.2.5.6. A szerotonerg jelátvitel és a viselkedés kauzális kapcsolatai.....	25
2.2.6. A zebradánió modell helye a biológiában, a neurobiológiában és a stressz- kutatásban .....	30
2.2.7. A zebradánió viselkedésrepertoárja és annak fejlődése .....	32
2.2.8. A defenzív viselkedésmodellek zebradánióban és azok kiegészítései .....	34
2.2.9. A defenzív viselkedés funkcionális neuroanatómiai alapjai zebradánióban .....	39
2.2.10. A defenzív viselkedés szerotonerg szabályozása zebradánióban.....	42
2.2.10.1. A szerotonerg rendszer anatómiája .....	42
2.2.10.2. A szerotonin jelátvitel komponensei.....	44
2.2.10.3. A szerotonerg rendszer szerepe a defenzív viselkedésben.....	46
2.2.10.4. A szerotonerg rendszer és a viselkedési stressz-választ irányító területek anatómiai kapcsolatai .....	46
2.2.10.5. A szerotonerg jelátvitel és a viselkedés korrelációja stresszmodellekben .....	47

2.2.10.6. A szerotonerg jelátvitel és a viselkedés kauzális kapcsolatai.....	49
2.2.11. A gerincesek szerotonerg stressz-válaszát befolyásoló tényezők összefoglalása ....	51
<b>3. Célkitűzések .....</b>	<b>56</b>
<b>4. Módszerek .....</b>	<b>58</b>
4.1. Kísérleti alanyok .....	58
4.2. Környezeti manipulációk.....	58
4.3. Farmakológiai manipulációk .....	59
4.4. Viselkedésteszték és analízis .....	59
4.4.1. Sötét/világos preferencia teszt (LDT) .....	59
4.4.2. Nyílt-tér teszt (OT).....	61
4.4.3. Úszó keresztpalló teszt (SPM).....	61
4.4.4. Szociális preferencia teszt (SP).....	62
4.4.5. Szenzori-motoros válaszkészség teszt (SMR) .....	63
4.5. Nagy teljesítményű folyadékkromatográfia-tandem tömegspektrometria (HPLC/MS/MS).....	64
4.5.1. Minták előkészítése .....	64
4.5.2. Nagy teljesítményű folyadékkromatográfia.....	64
4.5.3. Tandem tömegspektrometria .....	65
4.6. Immunhisztokémia és konfokális mikroszkópia .....	65
4.6.1. Minták előkészítése .....	66
4.6.2. Fagyasztva metszés .....	66
4.6.3. Immunhisztokémia .....	66
4.6.4. Konfokális mikroszkópia.....	67
4.6.5. Analízis .....	67
4.7. Kísérleti elrendezések.....	68
4.7.1. korai védekező viselkedésrepertoár jellemzése, tesztek validálása (Kísérlet 1-4.)..	68
4.7.2. A viselkedési metamorfózis jellemzése (Kísérlet 5-6.).....	70
4.7.3. A peri-metamorf környezeti hatások szerepe a védekező viselkedés és a szerotonerg rendszer kapcsolatára.....	71
4.8. Adatelemzés.....	74

<b>5. Eredmények .....</b>	<b>75</b>
5.1. Korai védekező viselkedésrepertoár jellemzése, tesztek validálása (Kísérlet 1-4.).....	75
5.2. A viselkedési metamorfózis jellemzése (Kísérlet 5-6.).....	85
5.3. A peri-metamorf környezeti hatások szerepe a védekező viselkedés és a szerotonerg rendszer kapcsolatára .....	89
<b>6. Megbeszélés .....</b>	<b>100</b>
<b>7. Következtetések.....</b>	<b>109</b>
<b>8. Összefoglalás .....</b>	<b>110</b>
<b>9. Summary .....</b>	<b>111</b>
<b>10. Irodalomjegyzék .....</b>	<b>112</b>
<b>11. Saját publikációk jegyzéke .....</b>	<b>149</b>
<b>12. Köszönetnyilvánítás .....</b>	<b>150</b>

## 1. Rövidítések jegyzéke

5-HIAA	....	5-hidroxi-indolecetsav
5-HT	.....	5-hidroxi-triptamin/szerotonin
AADC	.....	aromás-aminosav-dekarboxiáláz
AS	.....	veszélyt jelző anyag (alarm substance)
CDP	.....	klórdiazepoxid (chlordiazepoxide)
CPG	.....	központi mintázat generátor (central pattern generator)
CRH	.....	kortikotropin felszabadító faktor/hormon
DA	.....	dopamin
DHC	.....	dorzális hippocampusz
DRN	.....	dorzális raphe mag
Dpa	.....	dorzális pallium (anterior rész)
DPc	.....	dorzális pallium (kaudális rész)
dpf	.....	fertilizációtól számított napok (days post-fertilisation)
EPM	.....	megemelt keresztpalló (elevated plus-maze)
FSGD	.....	halspecifikus genom duplikáció (fish-specific genome duplication)
HPI	.....	hipotalamusz-hipofízis-mellékvese tengely
IL	.....	infralimbikus kéreg
KI	.....	gén beültetett (knock-in)
KO	.....	gén kiütött (knock-out)
LDT	.....	sötét/világos preferencia (light/dark preference)
LFB	.....	oldalsó előagyi köteg (lateral forebrain bundle)
MAO	.....	monoaminoxidáz enzim
mPFC	.....	mediális prefrontális kéreg

MRN..... mediális raphe mag  
NA..... noradrenalin  
OKR ..... optokinetikus válasz (optokinetic response)  
OMT ..... optomotoros válasz (optomotor response)  
OT ..... nyílt tartály (open tank)  
PEA ..... feniletilamin  
PFC ..... prefrontális kéreg  
PGZ ..... periventrikuláris szürkeállomány  
PL..... prelimbikus kéreg  
PVO..... periventrikuláris szerv  
RVLM ..... rosztroventrolaterális velő  
SERT ..... szerotonin transzporter  
SMR ..... szenzorimotoros válaszkészség (sensory-motor response)  
SPM..... úszó keresztpalló (swimming plus-maze)  
SSRI ..... szelektív szerotonin visszavétel gátló (selective serotonin reuptake inhibitor)  
TeO ..... tektum optikum  
TH..... tirozin-hidroxiláz enzim  
TPH..... triptofán-hidroxiláz enzim  
UCMS ..... krónikus kiszámíthatatlan enyhe stressz (chronic unpredictable mild stress)  
VHC ..... ventrális hippocampusz  
VMAT ..... vezikuláris monoamin transzporter  
Vpa..... ventrális pallium (anterior rész)  
VTA ..... ventrális tegmentális area

## 2. Bevezetés

### 2.1. Háttér

A viselkedési válaszok speciális aleteit képezik a stressz-kutatás fókuszában álló, a környezet kihívásaira adott védekező viselkedésformák. Adekvát megjelenésük elengedhetetlen az egyed túléléséhez és jóllétéhez, ugyanakkor patológiás formában számos pszichiátriai betegségben megjelenhetnek. Ezzel szoros összefüggésben, azok laborállatokban való kiváltása, manipulálása és vizsgálata az elsőszámú modellezési lehetősége az ilyen jellegű humán zavaroknak. Mind a klinikai, mind a preklinikai vizsgálatokból ismert, hogy a védekező viselkedésformák a szerotonerg rendszer irányítása alatt állnak. Erre egyrészt korrelatív bizonyítékok utalnak; 1) a szerotonerg rendszer a védekező viselkedés kialakításának minden fontos anatómiai szintjén reprezentált, valamint 2) a védekező viselkedés megjelenésével párhuzamosan szerotonerg változások is megjelennek. Másrészt kauzális természetű kapcsolatra utal, hogy 3) a szerotonerg rendszer jelátviteli vagy anatómiai komponenseinek manipulálásával a viselkedési válasz is befolyásolható. A klasszikus rágcsáló modellek tanulságai szerint a rendszer szabályozó szerepe rendkívül komplex, működése erősen függ mind a környezeti tapasztalattól, mind az aktuális környezeti kihívástokól, illetve számos élettani és viselkedési dimenziót érinthet. Ezek miatt szabályozó szerepének vizsgálatára kiemelkedően alkalmas lehet egy redukcionista megközelítésű modell, ahol a tényezők limitált száma mellett erős környezeti kontrolra van lehetőségünk és megfelelő fiziológiás és magatartási fenotípusizálási eszköztár áll a rendelkezésünkre.

Ilyen, az utóbbi évek orvosi biológiai kutatásaiban rohamosan teret nyerő zebra danió (*Danio rerio*) modell. Ez a trópusi halfaj sikerét az emlősökéhez hasonló, de egyszerűbb felépítésű idegrendszerének, valamint a fajra alkalmazható élettani vizsgálmódszerek egyedülálló idő-, és térbeli felbontásának köszönheti. Azonban mivel a zebra danió viselkedésneurobiológiai alkalmazása még nagyon gyerekcipőben jár, kevés a fajt alkalmazó, etiológiai faktorokat kamatoztató modell áll rendelkezésünkre, ráadásul ezek ritkán veszik figyelembe a rágcsáló irodalom tanulságait. Azon kevés esetben, ahol a környezeti tapasztalat befolyásoló hatásait vizsgálják, jellemzően nem a fejlődés



szempontjából kritikus ablakokra helyezik a hangsúlyt, pedig a zebraadanió különleges egyedfejlődése és a viselkedési metamorfózis jelenléte indokolná azt. Ezen felül igen limitált számú olyan teszt áll a rendelkezésünkre, amelyben az elkerülő viselkedést fejlődési stádiumtól függetlenül vizsgálhatjuk. A zebraadanió egyszerűbb felépítésű idegrendszeréből és sokoldalú élettani vizsgálómódszereiből származó előnyöket összekapcsolva a rágcsálóknál alkalmazott etiológiai és viselkedési megközelítéssel, a korábbiaknál sok szempontból hatékonyabb modelleket hozhatunk létre. Ilyen modellekben vizsgálva a szerotonerg rendszer védekező viselkedésben betöltött komplex szerepét értékes információkat nyerhetünk annak adekvát és inadekvát, patológiás működéséről egyaránt, ezzel közelebb kerülve potenciális terápiák fejlesztéséhez.

Munkánk során a célul tűztük ki egy olyan etiológiai modell fejlesztését zebraadanióban, amelyben, a rágcsáló irodalom tanulságait alapul véve vizsgálhatók a szerotonerg rendszer defenzív viselkedési fenotípusra gyakorolt hatásai. Ehhez 1) korai fejlődési stádiumban lévő, lárva és juvenilis stádiumú zebraadaniók védekező viselkedésrepertoárját jellemeztük korábban publikált, valamint általunk fejlesztett tesztek validálásával és alkalmazásával. Ezen felül 2) olyan fejlődési periódus után kutattunk, amely a környezeti ingerekre kiemelkedően érzékeny, ennél fogva kritikus a későbbi védekező viselkedés kialakulásának szempontjából. Célunk volt továbbá 3) a legmagasabb érzékenységu időszakban környezeti zavarásokat alkalmazni, majd annak hatását vizsgálni a juvenilis védekező viselkedésformákra. Végül 4) a megalkotott modellben vizsgálni kívántuk az adekvát és inadekvát védekező viselkedés szerotonerg szabályozásának részleteit farmakológiai, hisztológiai, illetve molekuláris módszerekkel a lehető legnagyobb anatómiai specificitással és környezeti kontrol mentén.

## **2.2. Irodalmi Áttekintés**

### **2.2.1. A stresszkutatás jelentősége az idegtudományban és a viselkedési stressz-válasz**

A stressz, a kifejezés túlhasználata és ennél fogva jelentéktelenné válása ellenére is, az egyik, ha nem a legjelentősebb egészségünket befolyásoló tényező. A stresszor jellemzően valamely olyan környezet, vagy inger, ami belső homeosztázisunkat megváltoztatja, míg

maga a stressz kifejezés, szervezetünk annak visszaállítására tett törekvését jelöli. Mivel ennek a törekvésnek, vagyis az adekvát stressz-válasznak létrejötte alapvető feltétele az egyed túlélésének és jóllétének, az ezt befolyásoló tényezők ismerete, illetve az azt létrehozó fiziológiai működések, idegrendszeri mechanizmusok ismerete kiemelkedő fontosságú. Ezen tényezők karakterizálása hozzájárulhat a stresszasszociált betegségek, különös tekintettel a pszichiátriai zavarok kialakulásának megelőzéséhez és azok sikeres kezeléséhez egyaránt.

Egy stresszor megjelenésére, a kihívástól függően, az egyed sok esetben valamely viselkedési változással válaszol, ami a számos, egyed alatti szerveződési szinteken létrejövő stresszasszociált változás eredményeként áll elő. A viselkedési stresszválasz vizsgálata több szempontból is releváns lehet számunkra. Egyrészt i) egy szervi, szöveti, sejtes és molekuláris szinteken vizsgált jelenség funkciója gyakran csak a viselkedési fenotípus leírásával válik értelmezhetővé, ii) a stresszasszociált viselkedés abnormális megjelenése fontos tünete számos humán idegrendszeri elváltozásnak, illetve iii) sok közvetlenül nem mérhető, a pszichiátriai zavarokban sérülő belső állapot csak annak viselkedési korrelátumán keresztül számszerűsíthető<sup>1,2</sup>.

### **2.2.2. A defenzív viselkedésformák mint modellek**

A viselkedési válaszok speciális aleteit képezik a stressz-kutatás fókuszában álló, a környezet kihívásaira adott védekező viselkedésformák. Relevanciájuk többértű; 1) egyrészt a védekező viselkedés mindig valamely vélt vagy valós fenyegetésre adott válasz, így annak adekvát megjelenése kiemelkedően fontos az egyed túléléséhez. Ezen felül, 2) ezek kiváltása, manipulálása és vizsgálata az elsőszámú modellezési lehetősége a humán stressz-és kihívás-asszociált válaszoknak, valamint ezzel szoros összefüggésben a normális és kóros éberségi-, félelmi-, illetve szorongásos jelenségeknek. A defenzív válaszokat modellező megközelítések fenomenológiai, konstrukciós és prediktív validitását a fenti humán jelenségekre nézve a következőkben tárgyalom.

*Fenomenológiai hasonlóság.* A különböző humán stresszasszociált rendellenességek, például az egyes szorongásos zavarok, számos védekező viselkedést érintő deficittel járhatnak együtt, gyakran azok magtüneteként van jelen a nem adekvát elkerülési vagy menekülési válasz, nem-verbális vokalizáció vagy hipervigilancia<sup>3</sup>. Ezek a viselkedési válaszok éppúgy megfigyelhetők az állatvilágban, beleértve a laboratóriumi gyakorlatban alkalmazott modellfajokat is. Bár az egyes fajok számos védekező viselkedésformáját gyakran jellemzik faj-specifikus viselkedésként, ez több szempontból is helytelen megfogalmazás. Egyrészt egy-egy fajspecifikusnak bélyegzett etológiai változó gyakran nem a faj, hanem egy tágabb értelemben vett állatcsoport jellemzője, így például a patkányoknál karakterizált kockázatfelmérő magatartásformák megjelennek egyéb rágcsálóknál, illetve más fajoknál is. Másrészt, a megjelenésükben az ember viselkedéséhez kevésbé hasonló védekező válaszok gyakran visszavezethetők néhány alapvető, jól körülhatárolható funkcióval rendelkező magatartásra, például elkerülésre, menekülésre, rejtőzködésre, védekező fenyegetésre vagy védekező támadásra, így a látszólagos különbözőség ellenére nincs okunk ezeket kizárni a potenciális modellek sorából.

*Közös eredet.* A védekező viselkedésformák konzervált jellegére számos, az evolúcióbiológia eszköztárával is jól magyarázható adat utal. Ilyen például, hogy a fentebb tárgyalt hasonló megjelenésen felül, az egyes inger-válasz párok is hasonló képet mutatnak a fajok, a fajokon belüli egyes alpopulációk, valamint az egyedek között. Sok év, főleg patkányokat alkalmazó vizsgálataiból láthatjuk, hogy a megfelelő védekező válasz széles viselkedésrepertoárból való kiválasztását a fenyegetés típusa, annak bizonyossága, közelsége, valamint a környezet egyes befolyásoló tényezői, például kiút vagy búvóhely jelenléte határozza meg<sup>4</sup>. Az ilyen befolyásoló tényezők viselkedés-választó szerepére később számos példát láthattunk vadállatoknál, más rágcsálóknál vagy akár csontoshalagnál<sup>5,6</sup>. Ami azonban a transzlációs idegtudomány szempontjából talán a legfontosabb, hasonló párosításokat írtak le az ember esetében is. Blanchard és munkatársai egy kérdőív segítségével vizsgálták, mik lehetnek a tipikus emberi védekező válaszok adott típusú veszélyhelyzetre<sup>7</sup>. A lehetséges fenyegetések, válaszok, valamint az azt befolyásoló tényezők tartalmazták a rágcsálóknál leírt szituáció-válasz párok legtöbbszörét, valamint vélten

emberspecifikus viselkedéseket is, például könyörgést vagy tárgyalást. A vizsgálatból kiderül, hogy az emberek legnagyobb részben (75%-ban) a patkányoknál megfigyelt szituáció-válasz párokat választották, illetve hogy a válaszok típusát vagy intenzitását befolyásoló tényezők is a rágcsálókhoz hasonlóan hatnak a viselkedés választására. Ugyan ezt a kérdőívet használva más kutatócsoportok más populációkon is elvégezték a vizsgálatot, hasonló, a legtöbb esetben még erősebb rágcsáló-humán összefüggéseket találva. Ez tovább erősíti az elképzelést, hogy a védekezőviselkedés biológiailag predisponált és kisebb mértékben szocio-ökonómiai tényezők által formált válasz<sup>4</sup>. Perkins és Corr<sup>8</sup> a kérdőívet pszichometriai változókkal is kiegészítette és erős korrelációkat fedezett fel a vizsgálatba bevont emberek védekezési típusai és azok szorongásos vonása között (Spielberger State-Trait Anxiety Inventory), tehát a rágcsálókhoz hasonló humán válaszok háttérében potenciálisan jelen lehet a szorongás komponens is. Ezeknek a viselkedésformáknak, illetve háttérüknek egyedenként, populációnként és fajonként megjelenő állandósága, robosztus jellege jól értelmezhető, ha számba vesszük, hogy a válaszok adekvát megjelenésére a legtöbb esetben nagyon erős környezeti szelekció hat, hiszen közvetlen módon szolgálja az életben maradást. Ezt megerősítendő, a válaszokban megjelenő variancia a fenyegetés mértékének csökkenésével nő, például míg egy hirtelen megjelenő, adott típusú ragadozó elkerülésére nincs sok féle adaptív válasz, addig egy nem teljes bizonyosságú, vélt fenyegetésre többféle stratégia és válaszintenzitás megjelenése is adaptívnek bizonyulhat. Ennek megfelelően a fenyegetés mértéke és bizonyossága nem csak a választípusra, de a válasz plasztikusságára és tanulhatóságára nézve is meghatározó lehet, amit fontos észben tartanunk az egyes viselkedésformák vizsgálatánál és modellek alkotásánál egyaránt.

*Közös neurokémiai háttér.* A közös evolúciós eredet homológ háttérmechanizmust is feltételez, aminek anatómiai aspektusait különböző képalkotó eljárások eredményeivel, míg neurokémiai aspektusait molekuláris, hisztológiai és farmakológiai bizonyítékokkal tudjuk igazolni. A védekező viselkedésformák kiváltásán alapuló szorongás modelleknek definíció szerint reagálniuk kell a humán szorongást befolyásoló drogokra, történeti okokból első sorban a „golden standard”-nak számító benzodiazepin származékokra<sup>9,10</sup>. Bár a klasszikus szorongásteszték ilyen irányú validációját az évek során sok kritika érte, a farmakológiai

validáció még jelenleg is egy fontos eszköz egy módszer beállítására. A kritikákra reagálva fontos megjegyezni, hogy ma már sokkal összetettebb módon dönthetünk egy szorongás-teszt funkcionálásáról, mint hogy az érzékeny-e egy benzodiazepin készítményre; érdemes azt több humán szorongást befolyásoló készítménnyel tesztelni, illetve ezek hatását minél részletesebben karakterizált viselkedési fenotípusra vizsgálni. Különböző tesztek és az azokban mért különböző változók, csak úgy mint a különböző szorongás zavarok, eltérő érzékenységgel rendelkeznek egyes drogokra. Ennek jó példája a humán klinikai populációban szorongásoldóként sikeresen alkalmazott buspiron, aminek preklinikai tesztelése sokszor hozott ellentmondásos eredményeket<sup>11-13</sup>. Ismert jelenség továbbá, hogy az egyes tesztekben mért menekülési válaszok érzékenyebbek a humán pánikzavarban alkalmazott kezelésekre, illetve pánikkeltő ágensekre, míg az elkerülést vagy a kockozatfelmérő viselkedést számszerűsítő kimenetek a generalizált szorongás-zavarra alkalmazott kezelésekre reagálnak jobban<sup>14,15</sup>. Ezzel összhangban, adott viselkedés befolyásolására (preklinikum), illetve azzal asszociált humán zavarra (klinikum) alkalmazott drog, gyakran hatástalan egy másik ilyen párra. Ugyanakkor a tény, hogy ez a specificitási kérdés egyaránt jelen van a humán és a laborállat populációkban, valójában csak a viselkedési válaszok és hátterükben álló belső állapotok hasonlóságát támogatja, és így azok modellként való alkalmazását validálja.

Látható tehát, hogy az ember, illetve más, filogenetikai értelemben kevésbé levezetett fajok védekező válaszai külsőre hasonlóak, egy töről eredeztethetők és, ezzel szoros összefüggésben, hasonló mechanizmusok által irányítottak. Ezen felül ezek a védekező viselkedésformák az ember esetében közvetlen kapcsolatba hozhatók adekvát, illetve patológiás esetben inadekvát félelmi és szorongás jellegű vonásokkal, tünetekkel. A két állítást összekötve láthatjuk, hogy a laborállatok védekező viselkedésformáinak vizsgálatával számos hasznos információt nyerhetünk az ember stresszasszociált válaszainak, éberségének, szorongásának és félelmének, valamint az ezeket abnormális formában mutató mentális zavarok hátterének megértéséhez.

### 2.2.3. A defenzív viselkedésmodellek rágcsálókban és azok kiegészítései

A fentebb tárgyalt védekező viselkedésformák modellezése nélkülözhetetlen eszköz a humán stresszasszociált magatartás és belső állapotok működésének megértésében, azonban fontos megjegyezni, hogy ezek elsősorban az egészséges populáció, természetes kihívásokra adott válaszaikra nézve hordoznak információt. Ez az adat már önmagában is érdekes, de csak az első lépés a kóros fenotípusokban, vagy szélsőséges mértékű stressz hatására megjelenő viselkedésformák hátterének megismeréséhez. Ennek okai, hogy 1) a védekező viselkedést befolyásoló szerek, például szorongásoldó gyógyszerek sokszor a megszokottnál nagyobb „alapi válaszkészségre” fejtik csak ki hatásukat, vagyis azok teszteléséhez szükséges egy stressz-asszociált belső állapot kísérletes eszközökkel való előidézése<sup>3,12,13,16,17</sup>. A jelenséget eredetileg klinikai populációban írták le, ahol megfigyelték, hogy a béta adrenerg receptor blokkoló oxprenolol a környezeti stressz által kiváltott szorongás kezelésében hatékony<sup>18,19</sup>, majd preklinikai vizsgálatokkal igazolták, hogy a benzodiazepinek szorongásoldó hatása is stresszindukált noradrenalin válaszhoz köthető<sup>20</sup>. Ezen felül, 2) ennek a kihívásindukált alapi válaszkészségnek az elhúzódó, állandó jelenléte sokszor része egy pszichiátriai zavar tünetegyüttesének, így ennek modellezése értékes információt hordozhat a patológiás állapotokra nézve is. Ezen megfontolások nyomán születtek az egyszerű védekezési reakciót kiváltó megközelítés-elkerülés alapú tesztek, valamely stresszonnal kiegészítő megközelítések. Ezeket, több más mellett, *etiológiai modelleknek* nevezzük, mivel a humán stressz-asszociált zavarokat ismert módon kiváltó vagy befolyásoló faktorokat prezentálnak az állatoknak. A modelleket csoportosíthatjuk például az alkalmazott stresszor típusa, fennállási időtartama vagy a fejlődés során való megjelenése szerint.

A klasszikus megközelítés-elkerülés alapú szorongástesztek előtt alkalmazott akut stresszorok többségében beváltották a hozzájuk fűződő reményeket. A korábban említett béta receptor blokkolókhöz és benzodiazepinekhez hasonlóan, a preklinikai teszteléseken sokszor ellentmondásos eredményt hozó buspiron kezelés is, csak előzetes immobilizációs stresszt követően<sup>21</sup>, illetve szociális instabilitást előidézve bizonyult szorongásoldó hatásúnak<sup>11</sup>. Az előzetes stresszt alkalmazó modellek számos egyéb esetben is hatékonynak bizonyultak neurobiológiai faktorok szorongásban betöltött szerepének tisztázásában, többek között a

kolecisztokinin (CCK) receptor agonista<sup>22</sup>, CCK2 receptor antagonist<sup>23</sup>, neuroszteroid<sup>24</sup>, vazopresszin 1b receptor antagonist<sup>25</sup>, 1-es típusú kortikotropinfelszabadító faktor receptor (CRH1) antagonist<sup>26</sup>, valamint 2/3 típusú metabotrop glutamát receptor agonisták<sup>27</sup> tekintetében. Rodgers és munkatársai később egy manipulált megemelt kereszt-palló tesztet („*open elevated plus-maze*”, oEPM) is létrehozta és alkalmazta a további klasszikus kereszt-palló tesztelés („*standard elevated plus-maze*”, sEPM) helyett vagy azt megelőzően. Az oEPM, ellentétben az sEPM-el, nem rendelkezik a védelmet jelentő zárt karokkal, így az eredetihez hasonló platform szélsőséges mértékű kitettséget prezentálva hoz létre felfokozott belső állapotot a kísérleti alanyoknál<sup>28</sup>, ami a védekező viselkedések fokozásán túl stressz-indukált antinocicepciót is eredményez.

A krónikus stresszorokat jellemzően a depresszió modellek részeként alkalmazzák, de azok káros hatással lehetnek a teljes viselkedési fenotípusra nézve, beleértve a védekező válaszokat és a szorongás-szerű állapotokat. Gyakran alkalmazott krónikus stresszorok például az ismételt leszorítás, vagy a kényszerített úszás teszt, illetve a széles körben használt krónikus kiszámíthatatlan enyhe stressz („*chronic unpredictable mild stress*”, UCMS)<sup>29–31</sup>. Ezeknek bár robosztus, a védekező viselkedést gyakran drasztikusan felerősítő hatásuk lehet etiológiai szempontból nem feltétlenül állják meg a helyüket, mivel az állat számára természetellenes helyzetet teremtenek, ami aztán a viselkedési végpont interpretálását is nagyban megnehezíti. Ebből a szempontból realisabb szituáció a társas fajok számára az egyedek szociális környezetének megzavarása. Ilyen megközelítések a szociális vereség, a szociális izoláció vagy az anyai szeparáció modellek. A szociális környezet bolygatásának etológiai relevanciáján felül, a modellek erős fenomenológiai validitással is rendelkeznek, mivel mind a szociális vereség, például „csicskáztatás”, mind a korai izoláció vagy szeparáció, például elhanyagolás, nagy prevalenciával bírnak a humán populációban<sup>32</sup>. Állatmodellekben a szociális vereség védekező viselkedésre gyakorolt hatásai mutatják a legkoherensebb képet, a legtöbb esetben erősen fokozzák az elkerülő viselkedés mértékét, lassítják az explorációt és szinte minden esetben szociális averziót váltanak ki<sup>33–40</sup>. A szociális izoláció defenzív fenotípusra gyakorolt hatásai ennél jóval összetettebbek és gyakran ellentmondásosak. Az ellentmondások feloldására számos javaslat érkezett, a

különböző állattörzseket, az alkalmazott tesztek különböző averzivitását, illetve az izolációs periódus hosszát, mint befolyásoló tényezőt megnevezve, azonban a variabilitást leginkább talán az izoláció fejlődés során való fennállása magyarázza. Arakawa és munkatársai több vizsgálatban is megnőtt elkerülést, illetve elhúzódó felfedező viselkedést, valamint nagyobb mozgási látenciákat figyeltek meg az izolált állatoknál, de csak abban az esetben, ha az izoláció pre-, és mid-adolescens kor között állt fenn. Később kezdődő izoláció semmilyen, vagy épp elkerülést csökkentő hatást fejtett ki a rágcsálókra<sup>41,42</sup>. Hasonló erős elkerülést találtak további, az izolációt ugyanebben a korai időszakban végző vizsgálatokban is<sup>43-48</sup>, továbbá az izolációt későbbi periódusban alkalmazó vizsgálatok a hatás elmaradásáról, vagy ellentétes hatásról számoltak be<sup>49-51</sup>. A megnőtt elkerüléssel párhuzamban, vagy annak komponenseként több csoport tapasztalt megnőtt hiponeofágiát új típusú ételre, valamint ismeretlen tárgy, illetve ismeretlen környezet megkésett vizsgálatát<sup>43,45,46</sup>. Elmondható ugyanakkor, hogy az izolációs időszak hossza nem, csak annak kezdete, illetve a felölelt pre-adolescens időszak volt meghatározó a védekező viselkedés kialakításában. Ezen felül, a viselkedési fenotípust, Einon vizsgálatait kivéve re-szocializáció után mérték fel, tehát a látott hatások nem tekinthetők az izoláltság egy aktuális, ideiglenes állapotának. A fenti eredmények alapján úgy tűnik, hogy ez a korai fejlődési szakasz egy kritikus periódus a viselkedési fenotípus kialakulásának szempontjából. Az izoláció leginkább konzisztens, fejlődési szakasztól független, defenzív viselkedésre gyakorolt hatásai, hogy szinte minden esetben szociális averziót eredményez, míg a félelmi válaszokat jellemzően nem befolyásolja<sup>45,47,52,53</sup>. Szintén a szociális kontaktus korai fejlődés során való fontosságára hívják fel a figyelmet az anyai szeparációs modellek. Ezek esetében a rágcsálókat, jellemzően patkányokat, a születésük utáni első két hétben elválasztják anyuktól, protokolltól függően 1-24 órára, 1-14 napon át<sup>54</sup>. A szeparációnak kitett állatok megnőtt szorongás-asszociált viselkedést<sup>55-57</sup>, félelmi választ<sup>58</sup>, későn megjelenő<sup>59</sup> és csökkent explorációt<sup>60</sup>, valamint csökkent újdonságra adott lokomotoros választ<sup>61</sup> mutatnak. Látható tehát, hogy a korai fejlődési periódusok megzavarása jellemzően a védekező viselkedési fenotípus szétkapcsolódásával, a válaszok lassabb megjelenésével, illetve azok elmaradásával jár együtt.



#### 2.2.4. A defenzív viselkedés funkcionális neuroanatómiai alapjai emlősökben

A defenzív viselkedési választ mérő modellek egyik legfontosabb translációs célja, hogy általuk megismerjük a fenti viselkedések idegrendszeri hátterét. A szorongásasszociált defenzív viselkedés vizsgálatára fejlesztett modellek egy jelentős része újdonság helyzetet kínál az állatnak, aminek viselkedését a környezet kiszámíthatatlanságából adódó megközelítés-elkerülés konfliktus irányítja. Ebből következően az adekvát viselkedés idegrendszeri hátterében a megközelítést vagy elkerülést irányító körökön felül, meg kell jelenjenek a konfliktust valamilyen módon feloldó, magasabb szintű mechanizmusok is. Ehhez szükséges a lehetséges viselkedési stratégiák kimenetelének megjósolása, és a prediktált és valós kimenetek közti eltérés büntetése. A szepto-hippokampális összehasonlító modell szerint a ventrális hippokampusz (VHC) az entorhinális kérgen át érkező multimodális szenzoros információk alapján veti össze a viselkedés várt és valós kimenetelét. Egy ismeretlen helyzetben megjelenő inger szinte mindig eltér az elvárttól, aminek nyomán a VHC bazolaterális amigdalaba (BLA) projiciáló sejtjei aktiválódnak, így kódolva a kihívás újdonságát. A BLA emocionális tartalmat társít az ingerhez és a centrális amigdalán (CeA), valamint a BNST-n keresztül az autonóm és viselkedési válaszokat szabályozva az elkerülési viselkedés felé billenti a mérleg nyelvét<sup>62-67</sup>. A VHC, a BLA, illetve a köztük lévő kapcsolat központi szerepére az újdonsághelyzet kódolásában és arra adott válasz kialakításában számos adat utal. Az állatot egy számára ismeretlen kihívásnak, a nyílt tér tesztnek alávetve a VHC BLA-ba vetítő sejtjei aktiválódnak, ami aktivitás a viselkedésben is mérhető habituációs folyamat során, azzal párhuzamosan alábbhagy<sup>68</sup>. A hippokampusz funkcionális strukturáltságot és a VHC szorongás szabályozásában kiemelt szerepét mutatja, hogy annak léziója csökkenti a szorongáshoz köthető viselkedésformákat különböző típusú újdonságingert prezentáló kihívások során, így a szociális interakció tesztben<sup>69</sup>, a megemelt kereszt-palló tesztben<sup>70</sup>, valamint az újdonság-indukált hipofágia tesztben<sup>69</sup>, míg a dorzális hippokampusz (DHC) elirtása ezeket nem befolyásolja. Ezzel összhangban, a terület farmakológiai gátlása nátrium csatorna blokkolókkal, például tetrodotoxinnal vagy lidokainnal, vagy az N-metil-D-aszpartát (NMDA) receptor antagonistá 2-amino-5-foszopentássavval (AP-5) szintén csökkenti az újdonság-asszociált elkerülést a megemelt

kereszt-palló tesztben, míg a DHC kezelése nincs arra hatással<sup>71–73</sup>. A BLA központi szerepére utal a szorongás-asszociált viselkedés szabályozásában és kialakításában, a neuronális aktivitást jelző korai géntermékek megjelenése a BLA sejtekben szorongásos helyzetben<sup>68,74</sup>. Ezzel összhangban, a BLA neuronok gátlása NMDA receptor antagonistával, vagy benzodiazepin receptor agonistával a szorongás-asszociált viselkedés csökkenését<sup>75</sup>, míg azok aktiválása GABA<sub>A</sub> receptor antagonistával, vagy stressz-asszociált neuropeptidekkel (CRH, urokortin 1) a szorongási markerek felerősödését váltotta ki<sup>76–78</sup>.

A defenzív viselkedés egy másik, pánik-asszociált formája a menekülés, aminek adekvát megjelenése az előző példához hasonlóan a menekülés motoros kivitelezésén túl felsőbb információfeldolgozó központokat igényel. Erre utal az is, hogy olyan integráló területek érzékenyítése, mint az amigdala vagy a dorzomediális hipotalamusz krónikus diszinhibíciója lehetővé teszi a menekülő válasz nátrium-laktáttal, egy nyugalmi körülmények között ártalmatlan ágenssel, való indukálását<sup>76,79</sup>. A pánikszerű válaszok közvetlen kialakításában végrehajtó szerepű a menekülési választ kiváltó dorzális periakvaduktális szűkreállomány (dPAG)<sup>80</sup>, illetve a jelenségre jellemző vegetatív aspektus, a kardiovaszkuláris változásokért felelős szimpatikus választ irányító rostromentrolaterális velő (RVLM)<sup>81</sup>. Korai géntermék expressziós adatok alapján a dPAG menekülés során aktív, míg lokális farmakológiai gátlása a benzodiazepin midazolánnal<sup>82</sup>, GABA<sup>83,84</sup>, vagy GABA<sub>B</sub> receptor agonistával<sup>83</sup> a menekülési válasz gátlását okozza. Ezzel szemben elektromos stimulációj<sup>85</sup>, valamint GABA<sub>A</sub> receptor antagonistával való diszinhibíciója<sup>86</sup> a menekülő választ facilitálja.

A fenti, a szorongás és védekező viselkedés szabályozásában csomópont szerepű területek, jobban levezetett gerinces csoportokban, így az emberekben és a rágcsálókban egyaránt a mediális prefrontális kéreg (mPFC) szabályozása alatt állnak. Az mPFC számos, a fenti szabályozásban fontos területtel áll kapcsolatban, többek között léteznek az anteriomediális thalamuszon keresztüli reciprok összeköttetések a hippokamusszal<sup>65,87,88</sup>, valamint közvetlen kapcsolatok mind a BLA-val<sup>89</sup>, mind a VHC-val<sup>90,91</sup>. Ezen felül az mPFC közvetlenül beidegzi a viselkedési válasz kivitelezésében fontos hipotalamikusan és agytörzsi magvakat<sup>92–98</sup>, valamint reciprok kapcsolatban áll a szerotonerg dorzális raphe maggal<sup>99</sup>. Az

mPFC szabályozó szerepe sokrétű és alterület specifikus módon jelenik meg. A szorongással és félelemmel asszociált ingerek, illetve viselkedési válaszok negatívan korrelálnak az anterior cinguláris kéreg (ACC) aktivitásával mind emberben<sup>100,101</sup>, mind rágcsálókban<sup>102,103</sup>, míg az infralimbikus (IL) és prelimbikus (PRL) kérgi területek valószínűleg ezek szabályozásában egymással ellentétes módon vehetnek részt<sup>104</sup>.

### **2.2.5. A defenzív viselkedés szerotonerg szabályozása emlősökben**

A szerotonerg rendszer vizsgálata több okból is kiemelt szereppel bír a stressz-kutatásban. Egyrészt a védekező viselkedések kialakításában fentebb leírt csomópont szerepű agyterületek a rendszer fontos projekciós területei közé tartoznak, másrészt, ezzel szoros összefüggésben a szerotonerg rendszer különösen érzékeny a környezeti ingerekre, stresszre, különösképpen a korai fejlődési periódusban. Ezekből következik továbbá, hogy a szerotonerg jelátvitel, illetve annak zavarai számos stresszasszociált pszichiátriai betegségben megjelennek, valamint hogy a leghatékonyabb terápiás szerek is ezen a rendszeren keresztül fejtik ki hatásukat. Ezen hatások hátterében álló mechanizmusok ismerete különösen fontos a létező szerek új indikációinak és új terápiás szerek fejlesztésének szempontjából egyaránt.

#### **2.2.5.1. A szerotonerg rendszer anatómiája**

Emlősökben szerotonerg neuronok kizárólag a raphe magvakban találhatóak. Az itt fekvő kis számú szerotonerg neuron számos agyterületre vetít, beleértve a fentiekben tárgyalt, a védekező viselkedés szabályozásában fontos központokat is. Megkülönböztetjük a raphe pallidusz (B1), obszkurusz (B2) és magnusz (B3) magvakat, a vesztibuláris magot (B4), a hídi raphe magot (B5), a mediális longitudinális köteg szerotonerg sejtjeit magába foglaló magot (B6), illetve a közepagy dorzális (B7)(DRN), valamint mediális raphe magvakat (B8-B)(MRN). Azok viselkedés szabályozásában domináns szerepe miatt a továbbiakban a közepagy DRN és MRN magvakat tárgyalom. Az ezekben található eltérő számú szerotonerg idegsejt projekciós mintázatukon felül még számos tulajdonságában eltér egymástól, így például azok rost morfológiájában, receptor expressziós profiljában, ezzel

szoros összefüggésben neurotranszmitterekre és farmakológiai ágensekre való érzékenységében<sup>105–109</sup>, ezeket számba véve pedig számos funkciójában<sup>110</sup>.

### **2.2.5.2. A szerotonin jelátvitel komponensei**

A szerotonerg rendszer komplex összetétele teszi lehetővé a szerotonin (5-hidroxi-triptamin, 5-HT) időben és térben finoman hangolt jelenlétét, hogy az precíz módon elláthassa széleskörű szabályozó szerepét a teljes szervezetben. A rendszer komponensei az 5-HT ligand, az azt szintetizáló és metabolizáló enzimek, a molekulát szállító és visszavételét végző transzporterek, valamint az 5-HT receptorok.

Az 5-HT kétlépéses szintézise során először a triptamin 5-hidroxi-triptofánná alakul a triptofán-hidroxiláz (TPH) katalizálta folyamatban, amit végül az aromás-aminosav-dekarboxiláz (AADC) alakít 5-HT-vé. A folyamat mennyiségmeghatározó komponense a TPH enzim<sup>111,112</sup>. Emlősökben a TPH két izoformája van jelen; a TPH1, illetve TPH2. Az izoformák külön kromoszómán elhelyezkedő kópiákról íródnak át, előbbi első sorban a perifériás, utóbbi a központi 5-HT szintézisért felelős<sup>113</sup>. Az enzimek mennyisége és aktivitása több szinten szabályozott; számottevő tényezők kofaktorának<sup>114</sup>, kosubsztrátjának<sup>115</sup>, valamint foszforiláló enzimének jelenléte és mennyisége<sup>116</sup>. Mennyisége prediktív a szerotonerg sejtek tüzelésére<sup>117</sup>, aktivitása különböző stresszorok<sup>118</sup>, illetve a CRH jelátvitel által facilitálódhat<sup>119</sup>.

A szintézist követően az 5-HT molekulák a vezikuláris monoamin transzporter 2 (VMAT2) transzporterén át szekréción vezikulákba csomagolódnak, és így szállítódnak a preszinaptikus terminálisokhoz, ahol a szinaptikus részbe ürülnek<sup>120</sup>. Fontos megjegyezni azonban, hogy a VMAT2 más monoaminok transzportjéért is felelős, így az ezt célzó viselkedésfarmakológiai és viselkedésgenetikai megközelítések eredményeit e szerint lehet csak interpretálni.

A szinaptikus részből az 5-HT visszavétele, és így biológiai rendelkezésre állásának megszüntetése legkevesebb két mechanizmus révén jöhet létre, amiből a legjobban feltérképezett a szerotonin transzporter (SERT) működéséhez kötött, domináns szerepű

folyamat<sup>121,122</sup>. A nátrium- és kloridion függő SERT viselkedésszabályozásban betöltött szerepe a preklinikai kutatások fókuszában áll, mivel 1) a jelenleg legszélesebb körben alkalmazott antidepresszáns és szorongásoldó ún. szelektív szerotonin visszavétel gátló (SSRI) készítmények ennek manipulálásán keresztül fejtik ki hatásukat; továbbá 2) a SERT-et kódoló gén promóter régiójában delécio révén keletkezett rövid allél a humán populációban jelenlévő stabil polimorfizmus, ami csökkent SERT expresszióval és depresszív tünetekkel hozható összefüggésbe.

Az 5-HT visszavételét követően, annak lebontását elsősorban a monoamin oxidáz A (MAOA) enzim végzi oxidatív deamináció révén. Elsődleges bomlásterméke az 5-hidroxi-3-indolacetaldehid (5-HIAL), ami körülbelül 95%-ban 5-hidroxi-indolacetil savvá (5-HIAA) és kisebb részben 5-hidroxi-triptofollá (5-HTOL) bomlik tovább. A legstabilabb, és az 5-HT anyagforgalmára legtöbb információt hordozó molekula tehát az 5-HIAA, amit jellemzően az 5-HT arányában adnak meg, ezzel jellemezve az 5-HT kicserélődést<sup>123</sup>. A MAOA enzim másik izoformája a MAOB, ami a szerotoninhoz kisebb affinitással köt és a terminálisokban lokalizálódó MAOA-val szemben a sejtestek mitokondriumjainak membránjában jelenik meg. A szómában zajló 5-HT szintézis a MAOA a fenti kompartmentalizációja révén, és a MAOB kisebb affinitása miatt működhet jó hatásfokkal<sup>124</sup>. A MAOB-t egyébként újabban az explorációban és védekező viselkedésben fontos szerepet játszó feniletülin (PEA) lebontásában játszott szerepe révén vizsgálják<sup>124,125</sup>. A MAOA a többi monoamin lebontását is katalizálja, de annak hiánya vagy gátlása az 5-HT szinteket emeli meg legnagyobb mértékben, azonban annak manipulációja során ezt fontos figyelembe venni.

Az 5-HT széleskörű élettani hatásaiért számos különböző receptor típus felel. Emberben eddig 7 receptorcsalád (5-HT<sub>1-7</sub>), 14 receptorát klónozták, amelyek különböző szerkezetükön, biokémiai tulajdonságaikon és funkciójukon túl, idegrendszeri eloszlásukban is eltérőek lehetnek<sup>126</sup>. A receptorcsaládok egyes variánsai főként poszt-transzlációs és heterodimerizációs folyamatok révén érik el változatos formájukat<sup>127,128</sup>. A védekező viselkedésformák és szorongás szabályozásában betöltött szerepük miatt jelen disszetációban az 5HT<sub>1A</sub>, 5HT<sub>1B</sub>, 5HT<sub>2A</sub>, 5HT<sub>2C</sub>, 5HT<sub>3</sub> receptorokkal foglalkozunk bővebben a továbbiakban.

### **2.2.5.3. A szerotonerg rendszer szerepe a defenzív viselkedésben**

A szerotonerg rendszer viselkedési stressz-válaszban betöltött szerepére számos bizonyíték utal. Ilyen adat, hogy 1) a szorongás-asszociált állapotok és védekező viselkedés szabályozásában szerepet játszó idegrendszeri struktúrák és a szerotonerg magok között számos, gyakran kétirányú anatómiai kapcsolatot ismerünk. Ezen felül 2) a különböző stresszorokat prezentáló stressz-modellek befolyásolják a szerotonerg jelátvitelt, elektrofiziológiai, mikrodialízis és immunhisztokémiai adatok alapján. Végül pedig, 3) a szerotonerg jelátvitel komponenseit manipuláló genetikai és farmakológiai kezelések befolyásolják a szorongás-asszociált állapotokat és a védekező viselkedést.

### **2.2.5.4. A szerotonerg rendszer és a viselkedési stresszválaszt irányító területek anatómiai kapcsolatai**

Az agytörzsi raphe komplex szerotonerg neuronjai beidegzik a szorongás-asszociált állapotok, valamint ezzel szoros összefüggésben a védekező viselkedés szabályozásában fontos agyterületeket, így például a limbikus rendszert. A DRN projekcióját küld a frontális és prefrontális kéregbe, a VHC-be, az amigdala több területére, míg az MRN beidegzi a DHC-t, a szeptumot, az accumbens magot és a hipotalamusz több területét<sup>129</sup>. A felsőbb központok mellett a védekező viselkedésformák, például a menekülő választ közvetlenül irányító struktúrák, is fogadnak szerotonerg bemenetet, például a DRN laterális szárnyában és a ventrolaterális PAG-ban szórtan elhelyezkedő multipoláris szerotonerg sejtek a Szimpatomotoros Irányító Központ fontos részét képezik. Az itt lokalizálódó multipoláris sejtek közvetlen kapcsolatban állnak az RVLM-mel, illetve multiszinaptikus kapcsolatban állnak a mellékvesevelővel, így modulálva a „fight-or-flight” választ<sup>130</sup>. Sok esetben ugyanazok sejtek kollaterálisokat adnak le a védekező válasz szabályozásában fontos több különböző területre is, például a DRN ugyan azon sejtcsoportja vetít a VHC-be és a BLA-ba is<sup>131</sup>, ami a területek összehangolt működésére gyakorolt moduláló hatásra utal. A defenzív válaszokat közvetlenül befolyásoló körökön felül, a raphe komplex szerotonerg sejtjei a viselkedést megengedő mechanizmusokat, szenzoros integrációt és motoros működést irányító területekre is vetítenek, így szerepet játszhatnak a viselkedési válaszkészség kialakításában is<sup>132–135</sup>. A viselkedést befolyásoló területekkel való direkt kapcsolatokon

felül a szerotonerg rendszer vetít más, a stressz-választ befolyásoló neuromodulátoros monoaminerg magvakba is. Közvetlenül, illetve az mPFC-n keresztül közvetetten is befolyásolja a noradrenerg rendszer központjaként ismert locus coeruleust (LC)<sup>98,136–140</sup>, valamint vetít a dopaminerg központokba és azok projekciós területeire egyaránt (substantia nigra, ventrális tegmentális area, accumbens mag, mPFC)<sup>141–145</sup>. Elmondható ugyanakkor, hogy sok területtel reciprok kapcsolatot is alkot, így például BLA-DRN kapcsolat mellett, DRN-BLA projekció is ismert.

### **2.2.5.5. A szerotonerg jelátvitel és a viselkedés korrelációja stresszmodellekben**

A stresszasszociált viselkedés és a szerotonerg rendszer kapcsolataira, azok fizikai összeköttetésén túl, számos egyéb adat utal. Erre fontos példák, hogy stresszorok alkalmazásával, vagy a stresszor fiziológiai hatását utánozó kezeléssel a védekező viselkedésformák és a szerotonerg jelátvitel paralel módon változhat. A DRH CRH kezelésével például szorongásszerű állapot és viselkedési válasz indukálható<sup>146</sup>, továbbá a viselkedési stresszválasz gyakran a szerotonerg rendszer működésének megváltozásával jár együtt<sup>147–149</sup>.

Macskákön végzett *in vivo* elektrofiziológiai mérések során nem találtak alapaktivitástól eltérő válaszokat a lassú, ritmikus tüzelési mintázatuk alapján szerotonergnek definiált sejtekben emelkedő környezeti hőmérséklet, gyulladáskeltő anyagok, farmakológiai vérnyomáscsökkentés vagy növelés, inzulin-indukált hipoglikémia, fázikus vagy tónusos fájdalominger, hangos zaj, immobilizáció, vagy egy potenciális predátor (kutya) jelenlétének hatására<sup>150</sup>. A szerzők az erős stresszasszociált viselkedési változás ellenére elmaradó hatást azzal magyarázzák, hogy bár a stresszorok képesek aktiválni ezeket a sejteket, de nem jobban, mint bármilyen más ébrenlét alatt megélt inger, az aktivitás tehát nem stressz-specifikus. Ennek ellenére léteznek stresszasszociált szerotonerg viselkedési hatások, azonban azok csak más jelátviteli folyamatokkal együtt, például CRH elválasztással összhangban jelennek meg, vagyis az 5-HT tónusnak egy viselkedést megengedő szerepe lehet. Az elméletet alátámasztja, hogy 5-HT amigdalára kifejtett elektrofiziológiai hatásai CRH hiányában nem jelennek meg<sup>151</sup>. Szerotonerg neuronok viselkedés-asszociált

elektrofiziológiai válaszaira jó példa a központi mintázat generátorok („central pattern generator”, CPG) aktiválódása és elcsendesedése. A fentiekkel megegyező tüzelési mintázatú DRN neuronok számos ritmikus viselkedés, például rágás, nyalás, tisztálkodás előtt aktiválódnak, majd a viselkedés végeztével elcsendesednek. Fontos ugyanakkor megjegyezni, hogy amennyiben a ritmikus viselkedés valamilyen újdonság ingerre való reakció miatt marad abba, a neuronok aktivitása azonnal, gyakran az alapaktivitás alatti szintre esik vissza. Ez a hirtelen aktivitáscsökkenés együtt jár a megszakító inger felé orientálódással, szemmozgással és az attól független viselkedések gátlásával, vagyis egy általános „figyelemfókuszálás” reakcióval<sup>152</sup>. Nem kizárható tehát, hogy a fenti sejtek alapaktivitása, ritmikus viselkedéssel asszociált aktivitása, illetve a megszakító ingerre adott aktivitáscsökkenése mind külön funkciót szolgál ki, így az aktivitásnövekedés figyelmet nem igénylő motoros működéssel, az aktivitáscsökkenés a figyelem orientálásával lehet összefüggésben.

Az akut viselkedési stressz-válasz szerotonerg mechanizmusainak leírására rágcsálókban a legelterjedtebb módszerek az agyterület specifikus mikrodialízissel való mintavétel és folyadékromatográfiás és/vagy tömegspektrometriás kvatifikálás, illetve a *post mortem* immunhisztokémiai vizsgálat. Előbbi esetében viselkedő állatból mérhető az idegsejtekből az extracelluláris térbe ürülő ingerület átvívó anyagok koncentrációja, míg utóbbinál szövetből határozhatunk meg aktivitást gyengébb időbeli, de erősebb térbeli felbontásban. A megközelítéseket alkalmazva számos, a védekező viselkedés irányításában fontos agyterületen megjelenő akut stresszindukált 5-HT választ mértek ki, első sorban a hippokampuszt, az amigdalát és a PFC-t vizsgálva. Egérben és patkányban végzett mikrodialízises vizsgálatokkal leírták, hogy ragadozó stressz hatására az 5-HT koncentráció megnő a hippokampuszban, az amigdalában és a PFC-ben egyaránt<sup>147-149</sup>. Jobb felbontású mintavételezéssel ugyanakkor az is meghatározható volt, hogy az 5-HT szint a ragadozó megjelenésével azonnal megemelkedik és körülbelül 10 percen át stabil marad, majd csökkenni kezd. Az 5-HT szintekkel párhuzamosan a viselkedést is vizsgálva látható, hogy a magas 5-HT koncentrációval a teszt első felében a szélsőséges óvatosság, illetve a lassan megjelenő kockázatfelmérő magatartás fejeződik ki, majd a csökkenő szakaszban a nem



predátor orientált viselkedés kerül előtérbe<sup>153</sup>. Hasonlóan a fentiekhez, 5-HT szint emelkedést detektáltak a hippocampusban és az amigdalában a farokcsípés, illetve a kényszerített úszás-tesztet követően, azonban azok dinamikája eltért a predátor-stressz által kiváltott választól. Előbbi esetében a hatás a tesztet követően is elhúzódott, amit a szerzők a csipesz levétele utáni megnövekedett tisztálkodással, illetve az azt irányító CPG aktivitással magyaráztak<sup>149</sup>. A kényszerített úszás teszt esetében ugyanakkor időben kétszűcsű 5-HT növekedés volt megfigyelhető. A tesztben a vízhőmérsékletet manipulálva, illetve az állatok testhőmérsékletét folyamatosan mérve a szerzők megfigyelték, hogy míg az egyik csúcs a teszt szituáció eredménye, addig a másik a lezuhanó testhőmérsékletéhez köthető<sup>154</sup>, vagyis 5-HT ürülés követi a pszichológiai és a fiziológiai stresszt egyaránt. Immunhisztokémiai vizsgálatokból ismert, hogy a rágsálók hippocampális 5-HT növekedéssel reagálhatnak még újdonsághelyzet kihívásra<sup>155</sup>, félelmi kondicionálást követően a veszéllyel asszociált kontextusra<sup>156</sup>, valamint lábsokk stresszre is, utóbbira csak abban az esetben, ha a stresszor nem elkerülhető, vagyis kontrolálhatatlan<sup>157,158</sup>. Ezek alapján az eredmények alapján az akut kihívásokra adott válaszokban az 5-HT tónus jelenléte a viselkedést megengedő szerepű, annak fázikus csökkenése a figyelmet orientáló és viselkedésgátló szerepű, míg annak fázikus megemelkedése egy viselkedés megjelenésével asszociált hatású lehet.

A krónikus stressz szerotonerg jelátvitelre gyakorolt hatásait főleg immunhisztokémiai vizsgálatok eredményeiből ismerjük, a változások dinamikáját mutató mikrodialízis adatok jóval ritkábbak. Utóbbira példa, hogy krónikus enyhe stressz hatására szétkapcsolódik az éberségi állapot és a szerotonerg tónus erős korrelációja, beleértve az alvás-ébrenlét ciklust, illetve alapi és stressz-indukált éberséget<sup>159</sup>. Ezen felül, krónikus immobilizációs stressznek kitett állatoknak megnő az akut immobilizációra adott szerotonerg válaszkészsége, míg a krónikus kezelést nem kapott állatok nem válaszolnak az akut kihívásra, addig az előzetes stresszelt egyedek magasabb 5-HT tónusa lezuhan<sup>160</sup>. Egy merőben más típusú krónikus stresszt, szociális izolációt követően ugyanakkor, az 5-HT válaszkészség csökkenhet, vagy területspecifikusan át is rendeződhet. Szociálisan izolált patkányoknál elmarad a lábsokkra, illetve az újdonság-kihívásra adott 5-HT szintemelkedés a VHC-ban<sup>155,161</sup>, illetve az újdonságkihívás hatására megnőtt 5-HT kicserélődés az mPFC-ben<sup>162,163</sup>. Azonban több

agyterületet vizsgálata nyugalmi, majd stresszindukált állapotban, szociálisan tartott és izolált állatoknál már ennél összetettebb képet mutat. Míg nyugalmi körülmények között az izolált állatok VHC-jában magasabb, BLA-jukban alacsonyabb 5-HT koncentráció mérhető, addig immobilizációs stressz hatására az izolált állatok 5-HT szintje erősebben megemelkedik számos előagyi területen, így a DHC-ban, valamint a frontális kéreg, az amigdala és a PAG számos területén<sup>155</sup>. Ezt a kettősséget támogatja számos immunhisztokémiai eredmény, amik szerint a korai, viselkedés fejlődése szempontjából kritikus periódusban történő izoláció a hippocampusban csökkent 5-HT elválasztást<sup>49,50,155,164</sup> és rost-denzitást<sup>165</sup>, míg az amigdalában megnőtt szerotonerg rost-sűrűséget eredményez<sup>166,167</sup>. Ezek alapján az eredmények alapján arra következtethetünk, hogy a krónikus stressz, különösképpen a korai fejlődést érintő perturbációk, mind a nyugalmi, mind a stresszindukált állapotok szerotonerg rendszerét befolyásolhatják. Ebből következően, a rendszer fenotípusra gyakorolt hatását, csak ezen állapotokat együtt vizsgálva érthetjük meg. Látható továbbá, hogy a szerotonerg rendszer adekvát szabályozó szerepe erős környezeti befolyás alatt áll az állat egész élete során, de kiemelkedően érzékeny annak korai fejlődése alatt.

#### **2.2.5.6. A szerotonerg jelátvitel és a viselkedés kauzális kapcsolatai**

Belátható, hogy viselkedés és a szerotonerg rendszer kapcsolatát az anatómiai összeköttetésből, illetve azok stresszorokra adott paralel válaszaiból csak feltételezhetjük, a funkcionális kapcsolat meglétét, illetve annak kauzális természetét csak a komponensek eliminálásával vagy szerepük csillapításával, felerősítésével vizsgálhatjuk. Ilyen megközelítések a rendszer jelátviteli komponenseinek gátlása/aktiválása genetikai vagy farmakológiai eszközökkel, a rendszer anatómiai komponenseinek gátlása/aktiválása léziós, elektromos stimulációs, farmakogenetikai, valamint optogenetikai módszerekkel, illetve az anatómiai és jelátviteli megközelítés kombinációja, vagyis a területspecifikus farmakológiai gátlás vagy aktiváció. Az ilyen vizsgálatokat feldolgozó irodalom nagy terjedelme miatt, a továbbiakban csak a védekező viselkedési válaszokra, illetve szorongásra gyakorolt hatásokat tárgyalom.

## Jelátviteli komponensek

*Szintézis.* Bár az 5-HT szintézisének teljes ellehetetlenítése letális az állatok számára, léteznek olyan stabil polimorfizmusok, amelyek csökkentett 5-HT jelátvitelt eredményeznek. Ilyenre példa a TPH2 humán populációban unipoláris depresszióval kapcsolatba hozható R441H variánsát kifejező transzgenikus egértörzs („knock-in” technológia, KI), amely előagyi 5-HT szintje 40-80%-al kevesebb a vad típusénál. Ezek az állatok szorongás-asszociált viselkedést, megnőtt világos kompartmentbe való belépési latenciát mutatnak sötét-világos teszt kihívás során<sup>168</sup>. Egy másik példa a TPH2 enzim csökkent funkciójára és ennek nyomán kialakuló alacsony központi 5-HT koncentrációra, a BALB/cJ egértörzs, amit leggyakrabban annak erős szorongásos vonásai miatt alkalmaznak<sup>169</sup>. További példa, a szerotonerg neuronok egy fontos fejlődési faktorának, a TPH2 transzkripciót elősegítő PET1-nek kiütése, ami a normális 20%-ára csökkenti a központi szerotonerg sejtek számát. Ez a mutáció szintén szélsőséges szorongással jár együtt újdonság kihívást prezentáló tesztekben<sup>170</sup>. Egy másik fontos fejlődési faktor, az Lmx1b PET1+ sejtekből való feltételes kiütése a TPH expresszió drasztikus csökkenését és erősebb kondicionált félelmi választ eredményez<sup>171</sup>. Az 5-HT szintézis genetikai blokkolása tehát minden esetben megemelkedett szorongást eredményez. Érdekes módon, az 5-HT szintézis akut serkentése vagy gátlása, az 5-HT valamely prekursorának adagolásával, vagy a TPH enzim gátlásával, a viselkedési fenotípus egy másik dimenziójában okoz változásokat. Régóta boncolgatott jelenség az 5-HT jelenléte és a viselkedési válaszkészség közti kapcsolat, amelyet az állatok spontán, illetve amfetamin vagy dopamin-indukált lokomóciójára, valamint újdonsághelyzetben való explorációjára gyakorolt 5-HT hatásokkal jártak körül<sup>172-174</sup>. Míg az állatok központi 5-HT szintje és spontán mozgása között nem mindig egyértelmű a megfeleltethetőség, az amfetamin vagy dopamin-indukált mozgást felerősíti a DL-Pcpa-val előidézett TPH gátlás, míg az 5-HT vagy 5-HT prekursorok adagolása azt elmossa. Ezzel párhuzamosan, az 5-HT szintézis gátlása jellemzően kedvez az explorációnak, míg maga az 5-HT gyakran gátolja a viselkedés kifejeződését, a környezet újdonság függvényében<sup>173-175</sup>. Ezen felül az 5-HT depletált állatok szenzoros érzékenysége megnőhet, erősebb lokomotoros választ adnak fény és hanghatásokra egyaránt, egy újdonság-kihívás során<sup>176-178</sup>. Ezek alapján az 5-HT szintézis

tartós hiánya drasztikusan alacsony 5-HT jelátvitelt és erősen szorongó fenotípust hoz létre, míg annak akut változásai az explorációt, valamint az új környezeti ingerek befogadását támogató, illetve azt megengedő funkcióval rendelkezhetnek.

*Szállítás és visszavétel.* A monoaminok sejten belüli szállítását végző VMAT2 gént nélkülöző állatok heterozigóta formában életképesek csak, szorongásos vonásaikban nem különböznek a vad típustól<sup>179</sup>. Az 5-HT szinaptikus részből való visszavételét, és így annak biológiai rendelkezésre állását szabályozó SERT expresszió manipulálása azonban széles körben befolyásolja a szorongásos fenotípust. A SERT KO állatok viselkedési fenotípusa erősen függ háttérként szolgáló állattörzstől, van ahol csak depresszió-asszociált viselkedési hatást mértek, más esetekben, köztük patkányokban is, minden alkalmazott viselkedéstesztben erősen szorongónak bizonyultak a gént nélkülöző egyedek<sup>180–186</sup>. A SERT kritikus fejlődési periódusban való blokkolása SSRI készítményekkel a KO fenotípushoz hasonlóan erősen szorongó fenotípust hoz létre<sup>187</sup>, míg a transzporter túlexpresszáltatása csökkenti a szorongást<sup>188</sup>. A SERT farmakológiai gátlására talán a legjobb példa a humán gyógyászatban széles körben alkalmazott SSRI terápia. Az SSRI-k krónikus alkalmazásának indikációja szinte az összes szorongással járó pszichitriai betegség lehet, így a poszt-traumás stressz-zavar (PTSD), a generalizált szorongás zavar (GAD), a pánikbetegség, a különböző fóbiák, beleértve a szociális fóbiát is<sup>189</sup>. Preklinikai vizsgálatokban az SSRI-k akut hatása gyakran ellentmondásos, krónikus alkalmazása a humán hatásokkal általában egybevág<sup>190</sup>. A SERT manipulálásával kapott viselkedési eredmények arra utalnak, hogy míg az 5-HT visszavétel fejlődés során való tartós nélkülözése erősen szorongó fenotípust eredményez, addig annak felnőtt korban való gátlása, vagyis az 5-HT rendelkezésre állásának csökkentése csillapíthatja az újdonság-asszociált állapotokat, például a szorongást.

*Lebontás.* Általánosan elmondható, hogy az 5-HT-t lebontó MAOA enzim génjének kiütése újdonsághelyzetben csökkenti az explorációt és a kockázatfelmérő magatartásformákat, egyes esetekben a szorongás-asszociált viselkedést<sup>191–193</sup>, míg csökkenti a szociális interakciót<sup>194</sup>. A klinikumban az enzimet gátló készítményeket alkalmazzák PTSD-ben, pánikbetegségben, és szociális fóbia esetén, míg GAD-ban hatástalan<sup>189</sup>.

*Receptorok.* Az 5HT<sub>1A</sub> receptor kiütése és fejlődés során való gátlása megemelkedett szorongást<sup>195–200</sup>, annak túlexpresszáltatása csökkent elkerülést eredményez<sup>201</sup>. Ezzel összhangban, a receptor specifikus és nem specifikus agonistákkal való farmakológiai aktiválása szintén a szorongás csökkenését eredményezi, amire preklinikai bizonyítékokon túl a klinikumban GAD-ra alkalmazott parciális agonista buspiron is jó példa<sup>12,189</sup>. Az 5HT<sub>1A</sub> az emlős idegrendszerben a szerotonerg sejtek sejttestjein a szerotonin jelátvitelt gátló autoreceptorként, míg azok projekciós területein a poszt-szinaptikus sejtek membránján heteroreceptor formában van jelen. Az agonisták szorongásoldó hatásukat valószínűleg az autoreceptorokon keresztül megvalósuló szerotonin jelátvitel csökkenésén keresztül fejtik ki<sup>12</sup>. Hasonlóan tehát sok korábbi szerotonerg manipulációhoz, a jelátvitel fejlődés során való zavarása vagy teljes nélkülözése erősen szorongó fenotípust eredményez, míg az akut manipulációk hatásait az aktuális környezet határozhatja meg.

Míg az 5HT<sub>1A</sub> receptornak láthatóan fontos szerepe van az újdonsághelyzetben kialakuló szorongás-asszociált állapotok csökkentésében, addig az 5-HT<sub>1B</sub><sup>202–205</sup>, 5HT<sub>2A</sub><sup>206</sup> és 5HT<sub>2C</sub><sup>207</sup> aktiváció erősen asszociálható a szorongásos jellegekkel. A fenti receptorokat nélkülöző állatok szinte minden esetben csökkent szorongást mutatnak, vagy egyes ritka esetekben manipulációjuk nem gyakorolt a szorongásra mérhető hatást.

Az ionotrop 5HT<sub>3</sub> receptor szorongásra gyakorolt hatásairól mérsékelt adat áll rendelkezésünkre, annak túlexpresszáltatása az alkalmazott genetikai háttértől függően a szorongást nem befolyásolja, vagy azt csökkenti Harrell and Allan, 2003, míg az állattörzstől függetlenül növeli az újdonság explorációt<sup>208,209</sup>.

A fentiekből látható, hogy a szerotonerg rendszer jelátviteli hatásai erősen függenek az alkalmazott kezelés körülményeitől. A rendszer fejlődés során való nélkülözése, vagy túlzott működése egyaránt maladaptív hatású lehet, az erősen szorongó fenotípust hoz létre. Ez alapján a rendszer fejlődés során való optimális jelenléte kritikus a viselkedési fenotípus kialakulásának szempontjából. Ezzel szemben, a rendszert akut módon befolyásoló kezelések viselkedési hatásai jól prediktálhatók az aktuális környezeti kihívás, illetve ezzel

összefüggésben az 5-HT szintek kezelésindukálta megváltozásának iránya és dinamikája alapján.

#### Anatómiai komponensek

Régóta vizsgált kérdés, hogy a raphe komplex fejlődési és anatómiai szempontból heterogén jellege funkcionális sokszínűséget is jelent-e egyben. Számos, a teljes raphe komplex lézióját követő vizsgálat után<sup>210-213</sup>, Geyer, valamint Jacobs és munkatársaik az első között korreláltattak fiziológiai és viselkedési adatokat a dorzális, illetve a mediális magok specifikus elirtását követően. Míg az előagyi 5-HT<sup>214</sup>, és a TPH aktivitás<sup>215</sup> mindkét mag léziója esetén drasztikusan csökkent, addig csak az MRD eliminálását követte, a korábbi szisztémás farmakológiai 5-HT csökkentéshez hasonló, viselkedési diszinhibíció<sup>216</sup>. Az egyedek biokémiai és viselkedési adatainak korreláltatásával arra is rámutattak, hogy a hippocampusban detektálható TPH aktivitás arányos az állatok újdonsághelyzet explorációjával, sötétben való aktivitásával, illetve averzív ingerre adott összerenzenési válaszával, amiből arra következtettek, hogy normális, nyugalmi körülmények között a fenti reakciók az előagyi 5-HT gátlása alatt állnak. Ezt támogatja továbbá, hogy az MRN szelektív optogenetikai aktiválása az előagyi 5-HT szint megemelkedésével párhuzamosan gátolja az explorációt ismeretlen környezetben<sup>217</sup>.

Egy másik, széles körben vizsgált funkcionális anomália, miszerint a szerotonerg rendszer látszólag ellentétesen hat szorongásasszociált és félelemasszociált viselkedést mérő tesztekben. Az ellentmondás egyik feloldása a Deakin-Graeff elmélet, ami szerint a központi 5-HT eltérő mechanizmusokon keresztül erősíti az elkerülő válaszokat és gátolja a menekülő viselkedést. A kettős szerep mechanisztikus hátterére számos elmélet született, ide értve a két viselkedés szabályozásában szereplő eltérő projekciós területeket, 5-HT receptorokat, 5-HT válasz dinamikát, vagy raphe magvakat. Deakin és Graeff szerint az elkerülő válaszokra kifejtett hatás az amigdalában jelenlévő 5-HT tónushoz köthető, kialakításában 5HT<sub>2A</sub>, 5HT<sub>2C</sub> és 5HT<sub>3</sub> receptorok vesznek részt, míg a menekülés gátlása a PAG fázikus szerotonerg inhibíciójával valósul meg 5HT<sub>1A</sub> és 5HT<sub>2A</sub> és 5HT<sub>2C</sub> receptorokon keresztül<sup>106</sup>. Mivel ismert, hogy az MRN és DRN projekciós területei eltérőek, és azok válaszdinamikája is eltérhet<sup>110</sup>,

a két mag hatását külön is vizsgálták a kettős szerep szabályozásában. Míg a szorongás-asszociált elkerülésre gyakorolt hatások konzisztensek, vagyis az MRN vagy a DRN gátlása azt csökkenti, aktiválása azt növeli, addig a menekülő válaszok modulálása sokszor ellentmondásos. Míg az MRN általános, nem-serotonerg gátlása például elektromos lézióval, vagy a GABAerg neurotranszmisszió serkentésével képes befolyásolni a menekülő válaszokat, a mag 5-HT jelátvitelhez köthető komponenseinek szelektív aktivációja vagy gátlása nem fejt ki specifikus hatást a félelmi magatartásra<sup>218-221</sup>. Bár a DRN mind általános, mind pedig serotonerg manipulációja azonos irányban befolyásolja a menekülést<sup>80,222,223</sup>, a viselkedéssel parhuzamosan aktiváló raphe neuronok legnagyobb része nem serotonerg<sup>224</sup>. Ez alapján lehetséges, hogy a menekülő válasz szabályozásában közvetlen szerepe a raphe komplex nem-serotonerg komponenseinek van, míg a DRN esetében azokat a lokális serotonerg projekciók befolyásolhatják.

Látható tehát, hogy a serotonerg jelátvitel különböző szisztémás, teljes szervezetet érintő manipulációinak korábban ismertett sokrétű viselkedési hatásai megjelenhetnek anatómiailag fókuszált kezelések következményeként is. Ebből arra következtethetünk, hogy a szisztémás kezelések is eltérő módon befolyásolhatják az egyes eltérő szereppel rendelkező anatómiai csomópontokat, ami a serotonerg rendszer agyterület specifikus vizsgálatának fontosságát is előre vetíti. Összefoglalva, a serotonerg rendszer viselkedést szabályozó szerepének megértéséhez figyelembe kell vennünk a rendszert befolyásoló környezeti faktorokat, beleértve a fejlődés és az aktuális kihívás során megjelenő ingereket, illetve azt hogy a rendszer egyes anatómai és jelátviteli komponensei mely viselkedési dimenzió szabályozásában érintettek. .

#### **2.2.6.A zebradánió modell helye a biológiában, a neurobiológiában és a stressz-kutatásban**

A zebradánió modell tradicionálisan a genetika és embriológia eszköztárába tartozik, azonban az utóbbi években a kardiológiai, endokrinológiai és neurobiológiai kutatásokban is előszeretettel használják. A modell általános előnyének tekinthető, hogy egyfajta hidat képez a redukcionista megközelítést jelentő, egyszerű szervezettel rendelkező gerinctelen, és az

emberhez evolúciós értelemben közelebb álló, de jóval összetettebb és költségesebb emlős modellek között<sup>225</sup>. Az emlős idegrendszer összetettsége miatt, sok neurobiológiai kérdés megválaszolásához elengedhetetlen olyan egyszerűbb szervezetek alkalmazása, amikben lehetőségünk nyílik az idegrendszeri kapcsolatok széleskörű feltárására a lehető legnagyobb idő-és térbeli felbontásban<sup>226</sup>. A mai technológiával ez csak limitált komponensszámú és fizikai értelemben kompakt méretű hálózatok vizsgálatával érhető el. Ilyen megközelítések a korábban egyszerű idegrendszeri körök leírására alkalmazott puhatestű (például az *Aplysia*, *Pleurobranchia*, *Tritonia*, *Clione*, vagy *Lymnea* csoportok)<sup>227</sup>, vagy a kis méreténél fogva a teljes idegrendszer szimultán vizsgálatára alkalmas elegáns fonálféreg (*Caenorabditis elegans*) és az ecetmuslica (*Drosophylla melanogaster*) modellek. Ezek az élőlények nélkülözhetetlenek voltak olyan alapvető idegrendszeri működések megértéséhez, mint az akciós potenciál<sup>228–230</sup>, a visszacsatolási hurkok, vagy a diszinhíbiós szabályozás<sup>231,232</sup>. Ezen felül rámutattak, hogy filogenetikai távolságtól függetlenül egy idegrendszerben léteznie kell bizonyos funkcionális központoknak, mint befogadó, feldolgozó és válaszadó komponensek<sup>231,232</sup>, vagy az ezeket együtt szabályozó éberség kialakításáért felelős lokális és általános csomópontok<sup>227</sup>. A jelenlegi idegrendszeri ismereteinkhez való alapvető hozzájárulásuk ellenére azonban ezek a modellek sok esetben annyira „távoliak”, hogy az emberben működő neurotranszmitter rendszerek megértését csak funkcionális és nem konstrukciós analógiákkal szolgálhatják. Szemben ezzel, a zebradánió egyszerűbb és kompakt méretű idegrendszerében kifejezi a legtöbb emlősben leírt neurotranszmittert és azok receptorait<sup>233–235</sup>, homológ agyterületekkel rendelkezik<sup>233,236–239</sup>, illetve az eddig leírt humán betegség-asszociált géneknek már 84%-át azonosították genomjában<sup>240</sup>. Ezek, a zebradánió biológiájából fakadó előnyök tehát ideális jelöltté teszik a fajt egy különleges átmeneti modell szerepének betöltésére, bár meg kell jegyezni, hogy nem ideálisabbá, mint bármely más halfajt. Más halfajokkal szemben a zebradánió előnye, mint modell abban áll, hogy az utóbbi több tíz évben fejlődésgenetikai modellként a modern genetika teljes eszköztárát validálták a fajon és a mai neurobiológia módszertana is ezen az eszköztáron alapszik<sup>241</sup>. A faj biológiai adottságai és történeti okokból adódó beható ismerete együtt teszi tehát a zebradániót egyedülálló neurobiológiai modullé.

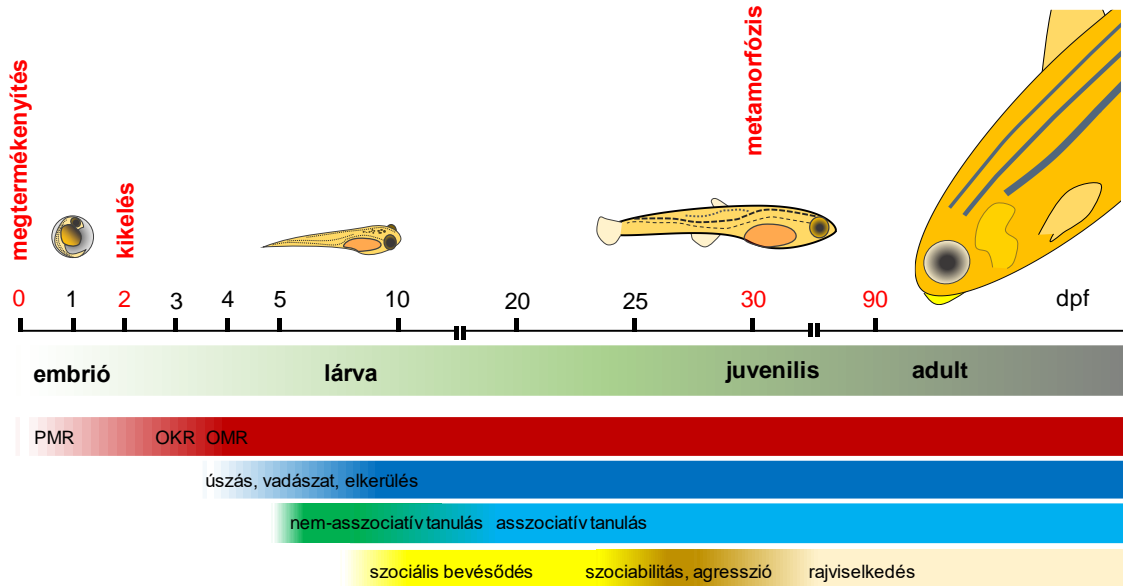


A zebraadánió modell a stressz-kutatásban is nagy jelentőséggel bír, köszönhetően robusztus stressz- és nagy-áteresztőképességgel számszerűsíthető, emlős-analóg viselkedési válaszainak. Emlősével homológ limbikus rendszere<sup>242–248</sup>, stressz-tengelye („*hypothalamus-hypophysis-interrenal axis*”, HPI tengely)<sup>249–251</sup> és neuromodulátoros pályái<sup>226,233,234,252</sup>, valamint széles védekező repertoárja jól feltérképezett és már a fejlődés igen korai szakaszán, az egyszerűen és gyorsan vizsgálható lárva állapotban is megmutatkozik. Ezen felül a lárvák kültakarója teljesen átlátszó és erősen áteresztő, ezért optogenetika és farmakológiai manipulációjuk egyszerű, központi idegrendszerük megfigyelése pedig más modellekben nem látott idő-és térbeli felbontásban lehetséges<sup>253–260</sup>. Továbbá a zebraadánió erősen szociális faj<sup>261</sup>, így mind az aktuális szociális kihívások, mind a krónikusan megzavart szociális környezet hatásai jól vizsgálhatók a modellben<sup>262–264</sup>.

### **2.2.7. A zebraadánió viselkedésrepertoárja és annak fejlődése**

Mivel a neurobiológiában egyaránt jelen vannak lárva és adult stádiumot alkalmazó zebraadánió modellek, fontos ismernünk a faj fejlődési dinamikáját. Az egyik, az emlősöktől való gyökeres eltérés, hogy a zebraadániók, szülői gondozás híján, már a fejlődés nagyon korai szakaszában aktív, önálló viselkedést mutatnak, ami a fajt alkalmassá teszi a viselkedés korai vizsgálatára. A zebraadániónál praktikus okokból a fertilizációt, mint időben jól lokalizálható eseményt tekintjük az állat élete 0. időpontjának, és az innentől eltelt időt használjuk az állat korának megjelölésére („*days post fertilisation*”, dpf). Az egyes viselkedésformák egyedfejlődés során való megjelenését az 1. ábra foglalja össze. A zebraadániók a megtermékenyítéstől számított 48-72. órában kelnek ki, majd hozzávetőlegesen 30 nappal ezután, egy metamorfózis során alakulnak az adult morfológiai és fiziológiai jellegek nagyrészt mutató juvenilis állá. Ez alatt az időszak alatt jelennek meg és érik el végleges

formájukat az adult állatokat jellemző viselkedésformák és az ezek háttérében álló érzékelő, döntéshozó és a viselkedés kivitelezését lehetővé tevő idegrendszeri és környéki struktúrák.



**1. ábra: a zebradánió viselkedési ontogenezise.** (PMR: fotomotoros válasz, OKR: optokinetikus válasz, OMR: optomotoros válasz)

A zebradánió a környezet taktilis ingereire adott válasza 17<sup>265</sup>, az olfaktoros szignálokra adott válasza 48<sup>266,267</sup>, míg a vizuális ingerekre adott válasza 68<sup>268</sup> órával a fertilizáció után már mérhető. 3 nappal a fertilizáció után, az ikrából kikelt szabadon mozgó lárvák, mozgó stimulusokra adott helyzetváltató optokinetikus választ („optokinetik response”, a továbbiakban OKR), majd 4 nappal a helyváltató követő viselkedést, vagy optomotoros választ („optomotoric response”, a továbbiakban OMR) adnak<sup>268</sup>. Az ideg és izomrendszer, valamint a neuromuszkuláris kapcsolatok gyors fejlődésével 4-5 napos korokra a lárvák már szabadon úsznak, mozgásuk lassú és robbanásszerű ún. „burst swimming” epizódokra osztható fel. A kezdeti, legegyszerűbb úszó mozgások még autonóm módon, a CPG által szabályozottak, majd a vizuális rendszer és a nyúltagy gerincevelői projekcióinak fejlődésével lehetőség nyílik az erősebb szenzoros integrációt igénylő viselkedésekre, mint a vadászat, az elkerülő vagy a menekülési válaszok<sup>265,269-271</sup>. A fenti veleszületett viselkedésmintázatokon túl, a lárvák 5-8 napos korokban már tapasztalatfüggő viselkedést, főleg nem-asszociatív tanulást; habituációt, szenzitizációt és diszhabituációt<sup>272</sup>, valamint rövidtávú deklaratív memóriára utaló viselkedést mutatnak<sup>273</sup>. A fenti széles és

fejlett viselkedésrepertoár miatt számos szenzoros, motoros, éberségi, defenzív, illetve nem-asszociatív tanulási folyamat háttérét, illetve azok manipulálásának farmakológiai és genetikai célpontjait az 5-8 napos korcsoportban vizsgálják.

Léteznek azonban viselkedések, amelyek csak a fejlődés első hónapjának végén, a morfológiai metamorfózist követően jelennek meg végleges formában. Ebben az időszakban alakul ki a felnőttekre jellemző szociális, illetve az adekvát elkerülő, valamint vadászó viselkedés, illetve az asszociatív tanulásra való képesség. Míg az állatok helyváltoztató mozgáshoz köthető szociális érdeklődése csak 4 hetes kor környékén jelenik meg<sup>261</sup>, a felnőtt szociális preferenciák vizuális bevéssődése<sup>274,275</sup>, illetve az olfaktoros alapú rokonfelismeréshez szükséges megerősítő ingerek megengedő szerepe a fejlődés első heteihez kötött<sup>276</sup>. Rajviselkedés<sup>277</sup>, illetve kis egyedszámok mellett territoriális agresszió a metamorfózis után, szintén 4 hetes kortól válik mérhetővé<sup>278</sup>. Úgyszintén a zebraadániók morfológiai metamorfózisa mentén, a fejlődés első hónapjában fordul át az egyedek sötét-elkerülő, „szkotofób” viselkedése világos-elkerülésbe, vagyis „szkototaxisba”<sup>279</sup>. A fejlődés első hónapjához köthető még a jellemzően vizuális alapú vadászó viselkedés tanulása is. A korai időszakban a lárvák képesek a vizuális ingerek helyett más modalitású stimulusokra helyezni a hangsúlyt vadászat során, így például sötétben nevelt egyedek a fej környéki neuromaszt sejtekkel való érzékelés révén képesek vadászni. Ez a modalitás-váltás nem jár a neuromaszt sejtek számának, vagy a sejtek érzékelő receptorszámának megváltozásával és csak egy rövid időablakban volt lehetséges, tehát valószínűleg érzékeny időszakhoz köthető és tanulás alapú változás<sup>280</sup>. Sok szempontból úgy tűnik tehát, hogy a zebraadániók nagyon hamar, a fejlődés első napjaiban létrehoznak egy túlélő viselkedési fenotípust, amit aztán az első hónapban felvált egy adult formára jellemző stabil viselkedésrepertoár. A kettő kapcsolata ezidáig sajnos nem ismert.

### **2.2.8. A defenzív viselkedésmodellek zebraadánióban és azok kiegészítései**

A zebraadánió defenzív viselkedésének vizsgálata mind céljaiban, mind pedig mechanizmusában erősen átfed a rágcsálóknál tárgyaltakkal. Célja a humán félelmi, szorongásos és éberségi jellegek modellezése, módszertanának alapja a stressz-modell

fejlesztés. Bár a zebradániók élettani paramétereinek megfigyelése és manipulálása messzemenően meghaladja a rágcsálóknál rendelkezésre álló lehetőségeket, a megbízhatóan működő stressz-modellek száma erősen limitált.

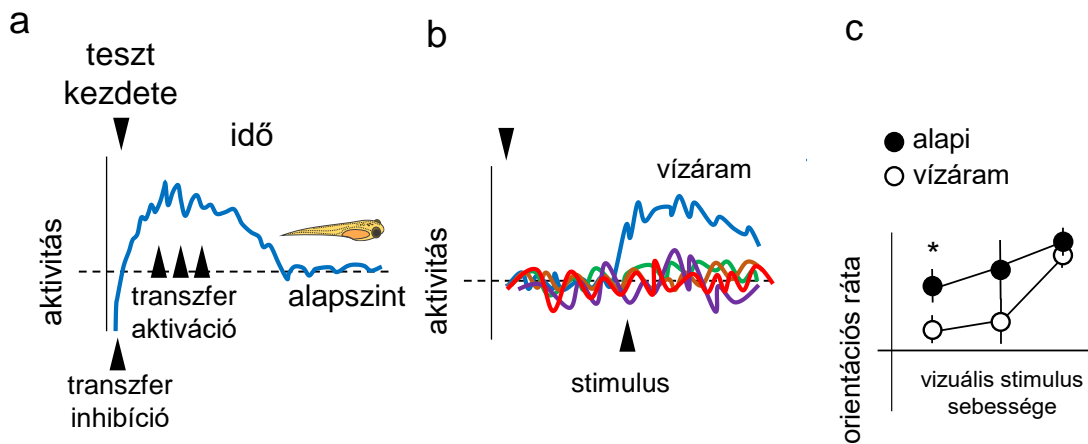
A zebradánió védekező viselkedése az emlősökéhez hasonló megjelenésű, hasonló ingerek által kiváltott és szabályozott repertoár. A vélt vagy valós veszély intenzitásától függően mutathatnak elkerülő, menekülő, a kiszámíthatatlan úszás-trajektóriával jellemezhető zavarkeltő viselkedést vagy a viselkedési inhibíció következményeként előálló dermedő válaszokat. Ez alapján, a vizsgálni kívánt viselkedésformát különböző kihívásokat prezentáló tesztekkel idézhetjük elő. Félelem-asszociált válaszokat válthatunk ki vizuális és/vagy olfaktoros predátorasszociált kihívásokkal, így például egy konkrét ragadozó jelenlétével, vagy annak képi megjelenítésével, egy közeledő pont projektálásával, vagy a zebradániók kültakarójából sérülés hatására felszabaduló veszélyt jelző anyag („alarm substance”, AS) vízbe oldásával<sup>281</sup>. Szorongás-asszociált válaszok, például elkerülés váltható ki a vélt fenyegetést prezentáló újdonságkihívásokkal, illetve azt averzívabbá tevő krónikus stresszel. A zebradánió szorongás-szerű viselkedését mérő tesztek, hasonlóan a rágcsálókéhoz, jellemzően egy konfliktust prezentálnak az állat számára, amiben annak viselkedését az új környezet explorációja és egy veleszületett módon averzív inger, például kitétség vagy nem megfelelő megvilágítás, közötti csereviszony irányítja. A fenti kihívásokra adott viselkedési válaszok félelem-, illetve szorongás-asszociált jellegét, azok farmakológiai, viselkedési és fiziológiai validálásával igazolták<sup>282–291</sup>.

A zebradániók szorongás-asszociált viselkedésének vizsgálatára leggyakrabban alkalmazott, újdonsághelyzetet prezentáló, megközelítés-elkerülés konfliktuson alapuló modellek a nyílt-tartály („*open tank*”, OT)<sup>292</sup> és a sötét-világos preferencia tesztek („*light/dark tank*”, LDT)<sup>285,288,293,294</sup>. A modelleket elsősorban felnőtt zebradániókra fejlesztették, de létezik a lárvákra adaptált, bizonyos szempontokból leegyszerűsített változatuk is. Az OT tesztben az állatot egy számára ismeretlen búvóhelymentes környezetbe helyezük, praktikusán egy üres akváriumba. A halak, az emlősökhöz hasonlóan, újdonság-stressz alatt kerülnek a kitétt területeket, úgynevezett „thigmotaxist” mutatnak, vagyis a falak mentén úsznak, illetve a felszínről az aljzatra menekülnek. Az újdonság-indukált szorongásos

állapot az idő előre haladtával, vagy klinikai szorongásoldó ágensek hatására csökken, ami a nyílt exploráció felé hajtja a viselkedést, az egyedek egyre gyakrabban lépnek a számukra veleszületett módon averzív központi és vízfelszín közeli zónákba. Az OT tesztben, az állatok szorongás-függő vertikális és horizontális pozícióján túl, gyakran etológiai változókat; kockázatfelmérő viselkedést, valamint félelem-asszociált válaszokat, például dermedési vagy zavarkeltési viselkedést is vizsgálnak<sup>6,295,296</sup>. A számos vizsgált viselkedési végpontból, az egyedek felszínkerülési tendenciája a leggyakrabban bemutatott és legszélesebb körben reprodukált defenzív válasz, azonban annak lárvákra alkalmazható és ezzel összefüggésben nagy-áteresztőképességű vizsgálatára ezidáig nincs megfelelő módszer. Ennek oka, hogy mérése csak a vertikális mozgás vizsgálatával lehetséges, míg a nagy számú teszt szimultán végzésére alkalmas elrendezések jellemzően csak horizontális megfigyelést engednek. A másik széleskörben alkalmazott módszer az LDT teszt. A teszt során az állat egy kétfelé osztott akváriumba kerül, ahol az egyik rész világos, míg a másik az állat számára teljesen sötét. Viselkedését a veleszületett sötét, majd az egyedfejlődés során kialakuló, genetikailag predisponált világos-elkerülés, valamint újdonságindukált explorációs motivációja közti csereviszony alakítja. Az LDT mind lárváknál, mind adultoknál széles körben alkalmazott teszt, de fontos tisztában lenni vele, hogy a fejlődés első hónapjában az elkerülést irányító fő inger megváltozik, a sötét-elkerülés világos-elkerülésbe fordul<sup>279</sup>.

Hasonlóan a rágcsálóknál tárgyalakhoz, a zebradánió irodalomban is találunk példát előzetes egyszeri, ismételt vagy krónikus stresszorokat alkalmazó, etiológiai modellekre. Az előzetes akut stressz hatására jó példa a transzfer inhibíció és transzfer aktiváció jelensége (2. ábra). Yokogawa és munkatársai mutattak rá, hogy a zebradánió lárvák aktivitása új környezetbe lépéskor először egy rövid időre drasztikusan lecsökken, majd egy hosszabb időre erőteljesen megnő, végül körülbelül 20 perc után visszaáll az alapszintre. Bár a jelenség elnevezése arra utal, hogy a megváltozott aktivációt a szállítás-stressz váltotta ki, nincs okunk feltételezni, hogy a viselkedési választ nem az újdonság-kihívás önállóan, vagy a szállítással interakcióban okozta. A szerzők később kísérletet tettek reprodukálni a jelenséget különböző típusú stresszorok prezentálásával, például erősödő vízárammal, fényvillanással, ragadozó-

asszociált és neutrális mozgásingerrel, illetve kis frekvenciájú rezgéssel. Transzfer inhibícióhoz hasonló aktivitásváltozást csak a rezgés, míg a transzfer aktiváció jellegű aktivitásnövekedést a vízáramoltatás keltett, ráadásul utóbbi aktiváció az inger erősödésével arányosan változott. Rámutattak továbbá, hogy az aktivitást növelő vízáram helyettesíthető a folyásirányt utánzó kivetített sávokkal, valamint igazolták, hogy ezek az ingerek megnőtt szenzori-motoros válaszkésztséggel járó éber állapotot alakítanak ki<sup>297</sup>.



**2. ábra:** transzfer inhibíció és aktiváció jelenségének sematikus ábrázolása Yokogawa és munkatársai eredményeit alapul véve. a) Egy új környezetben kivitelezett viselkedésteszt jellemzően az aktivitás alapszinthez képesti csökkenésével, majd annak növekedésével jár együtt. b) Hasonló aktivitásnövekedés idézhető elő vízáram keltésével. c) a vízárammal kiváltott aktivációt mutató állatok magas orientációs rátát mutatnak egy vizuális stimulusra annak sebességétől függetlenül, míg a nyugalmi körülmények között a lassabban mozgó ingerekre nem vagy csak kevésbé reagálnak.

A fenti stressz-asszociált éberség mellett, az akut stresszorok elkerülésre gyakorolt hatására is rendelkezünk adatokkal. Lima-Maximino és munkatársai egy vizsgálatukban bemutatták, hogy a predátor-asszociált AS kezelés akut hatásai inkább a menekülést, míg annak elhúzódó hatásai a dermedési magatartást erősítik föl egy OT teszt újdonságkihívása során<sup>298</sup>. Egy újdonság kihívást megelőző más típusú akut stresszor, például immobilizáció a felszínkerülést leggyakrabban növeli<sup>299-301</sup>, a világos-elkerülést csökkenti<sup>302</sup>, míg a lokomotoros aktivitást változatosan befolyásolhatja<sup>299,300,302,303</sup>. Ezzel szemben fizikai stresszorok, például a hőmérséklet növelése, annak csökkentése, vagy UV kitettség a világos-elkerülés drasztikus megnövekedésével jár<sup>304</sup>. Bár a felszínkerülés és a világoskerülés egyes esetekben ellentétesen változik előzetes akut stressz hatására, fontos megjegyezni, hogy

utóbbiról kevesebb adat áll rendelkezésünkre. Ennek oka, hogy a rágcáló modellekhez hasonlóan, az előzetes stresszorokat sok esetben egy drog vélt hatásának elmaradásakor alkalmazzák, azonban ez gyakrabban fordul elő az OT teszt, ritkábban az LDT teszt esetében. N-acetil-cisztein<sup>300</sup>, klórdiazepoxid, vagy fluoxetin kezelés<sup>299</sup> például önmagában is képes a világoselkerülés csökkentésére, míg ugyanezen szerek ugyanezen dózisa a felszínkerülést csak immobilizációs vagy üldözési stresszt követően befolyásolják. Ezzel összhangban, a két tesztben mért hatások egy átfogó meta-analízise arra utal, hogy az OT teszt felszíni zónájába való belépésszám és az LDT teszt világos zónájába való belépésszám közül utóbbi érzékenyebb a farmakológiai kezelésekre, függetlenül azok természetétől<sup>287</sup>. Érdekes módon, abban a kevés vizsgálatban, ahol az LDT előtt előzetes stresszort, például hálózást alkalmaztak, a tesztben mért viselkedés nem változott<sup>279</sup>. Lehetséges, hogy az LDT teszt nyújtotta kihívás önmagában egy olyan erős, felfokozott állapotot hoz létre az állatban, ami elmosza az előzetes környezeti hatásokat, ugyanakkor megadja azt a neurokémiai tónust, amin a legtöbb szorongásoldó szer kifejtheti hatását.

Az utóbbi években jelentek meg a területen a krónikus stressz-modellek is, habár egyelőre igen limitált számban. A krónikus kiszámíthatatlan enyhe stressz modellekben jellemzően adult állatokat használva, egymás utáni napokon alkalmazhatnak például leszorítást, sorozatos transzfert egyik akváriumból a másikba, hálóval üldözést, a vízszint drasztikus csökkentését, a háti oldal megérintését, rövid szociális izolációt vagy szociális túlszűfoaltságot, predátor-asszociált stresszorokat, esetleg a hőmérséklet szélsőséges változtatását. A kevés publikált modellben a krónikus kezelés kivétel nélkül csökkentette az újdonsághelyzetben mért lokomotoros aktivitást, felerősítette a felszínkerülést, illetve a világos elkerülést, habár megjegyzendő, hogy utóbbit csak egy szerző vizsgálta<sup>305–307</sup>. Az UCMS mellett a leggyakrabban alkalmazott krónikus stressz-modell a krónikus szociális izoláció. Az izolációs protokollok és a viselkedési fenotipizálás is nagyon sokféle lehet, nem találkozni két hasonlóan lefolytatott vizsgálattal. A leginkább koherens tényezők talán, hogy a szerzők jellemzően adult korban izolálják a halakat. Az felnőttkori izoláció számos viselkedési paraméterre nincs kimutatható hatással, azonban egyes esetekben csökkenti a thigmotaxist<sup>262</sup> és a világos elkerülést, míg növeli a felszínkerülést<sup>308</sup>. Emellett csökkentheti

a locomotoros aktivitást egy újdonság kihívás első szakaszában<sup>263</sup>, illetve növeli a mozdulatlan epizódok számát, valamint csökkenti az orinetációs fordulások szögét<sup>306</sup>. A kevés, viselkedési végpontot is vizsgáló, lárva kori izolációs modell az újdonsághelyzetre adott csökkent, és a szociális stimulusra adott megnőtt válaszokról számol be. Shams és munkatársai a fejlődéskori izoláció defenzív viselkedésre gyakorolt hatásainak vizsgálatához rövid (0-7 dpf), és hosszú izolációs (0-180 dpf) csoportokat jelölt ki, majd viselkedésüket 30 naponként monitorozta az OT tesztben. A hosszú izolációnak alávetett állatok felnőtt korukra stabilan alacsonyabb thigmotaxist, erősebb szociális averziót és magasabb lokomotoros aktivitást mutattak mint a két másik csoport egyedei. Érdekes módon a rövid izolációnak csak a metamorfózis környéki, 1 hónapos korcsoportban volt hatása, ahol drasztikusan lecsökkent aktivitás jellemezte az állatokat<sup>264</sup>. Ezzel összhangban, egy az Elena Dreosti által vezetett laboratórium vizsgálatában a fertilizációtól 3 héten át izolált zebradániók csökkent újdonság-asszociált aktivitást és megnőtt szociális averziót mutattak<sup>309</sup>. Ezt támogatandó Gronenberg és munkatársai 1 hetes lárva kori izolációt követően hasonló eredményt, csökkent lokomóciót és megnőtt szociális elkerülést detektáltak, illetőleg leírták, hogy a szociálisan tartott és izolált állatok viselkedésszerepe teljességgel átrendeződik az eltérő kihívások során, valószínűleg egymástól független mechanizmusok által<sup>310</sup>. Az újdonsághelyzetre adott csökkent válasz, akár adult, akár lárvakori izoláció esetén, a viselkedési stressz-válasz szétkapcsolódására utalhat. Ezt az elképzelést támogatja továbbá, hogy az izolációs modellek legkoherensebb fiziológiás eredménye az inadekvát, alacsony kortizol válaszkészség<sup>263,299,311-313</sup>, ami hozzájárulhat a viselkedési hatások elmaradásához.

### **2.2.9. A defenzív viselkedés funkcionális neuroanatómiai alapjai zebradánióban**

A zebradánió defenzív, elkerülő válaszainak funkcionális anatómiai hátteréről ezidáig nagyon kevés információ áll csak a rendelkezésünkre, annak ellenére, hogy az emlősök elkerülését irányító főbb idegrendszeri csomópontok homológ struktúráit már azonosították a fajban<sup>242,247</sup>. Lau és Guo egy elegáns vizsgálattal tárta fel a zebradániók világos elkerülésének szabályozását irányító felsőbb központokat, természetes módon elkerülést mutató és nem mutató halak idegi aktivitásának vizsgálatával. A világos elkerülésre specifikusan aktiválódó sejteket írtak le az emlős BLA-val homológ dorzális



pallium mediális részén (Dm), illetve az annak irányítása alatt álló, striátum homológ ventrális pallium dorzális magcsoportjában (Vd). A Dm és Vd központi összeköttetéseit, illetve a velük kapcsolatban álló magok ismert szerepét alapul véve a szerzők a következő modellre tettek javaslatot. A LDT teszt vizuális kihívásai két úton érhetik el a Dm-et. Egyrészt a látóidegen át érkező információ aktiválja a tektum optikum (TeO) periventrikuláris szürkeállományának (PGZ) sejteit, amelyek a Dm-be vetítő, és vizuális inger hatására azt aktiváló preglomeruláris magot (PG) idegzik be. Másrészt a vizuális inger direkt módon aktivál olyan thalamikus sejteket, amelyek dendritjei a retina terminális zónájáig érnek, míg axonjaik közvetlen kapcsolatban állnak a Dm-el. A Dm tehát a több úton szűrt és megkapott vizuális információt integrál, majd választ küld a motoros kimenetet szabályozó Vd-nek, illetve a fizioológias stressz-választ irányító hipotalamik magvaknak<sup>279</sup>.

A viselkedési stressz-választ facilitáló és moduláló neuromodulátoros és endokrin működések létrejöttéhez, hasonlóan az emlősökhöz, elengedhetetlen a hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg („*hipotalamus-hipophysis-adrenal*”, HPA), vagyis az ún. stressz-tengely aktiválódása. A zebadániók az ember és más emlősállatok HPA tengelyével homológ HPI tengellyel rendelkeznek<sup>249–251</sup>. Stresszor megjelenésekor, az emlős paraventrikuláris maggal homológ preoptikus mag CRH elválasztása megnő, ami az elülső hipofízis által termelt ACTH szisztémás keringésbe kerülése révén, kaszkád szerűen emeli a mellékvesekéreg interrenális sejteinek kortizol elválasztását. A kortizol, mint végrehajtó molekula számos stresszasszociált működést facilitál mind a központi, mind a perifériás szinteken, illetve gátolja a hipotalamik CRH elválasztást, ezzel a stresszválaszt terminálva<sup>314</sup>. A hipotalamik CRHerg sejtek a stresszor intenzitásának megfelelően egyre nagyobb számban mutatnak szinkron aktivitást, aktiválódhatnak fizioológiai<sup>315</sup> és pszichológiai<sup>254</sup>, újdonságstressz hatására is, például LDT kihívás során. Az aktiválódott sejtek az endokrin szabályozáson felül közvetlenül is szabályozzák a stresszasszociált válaszokat, például elengedhetetlenek a lárvák hirtelen sötétség által kiváltott, pigmentmozgósítással járó, álcázó válaszához<sup>316</sup>. A megnövő CRH válaszhoz hasonlóan, értelemszerűen a stressz-indukált kortizol növekedésre is ismerünk példákat, akár újdonság kihívás, vagy üldözés stresszor kontextusában<sup>299,317</sup>. A HPA aktivitás erősen befolyolt a

szeroenerg jelátvitel által, azok anatómiai kapcsolatain felül funkcionális összeköttetésre utal például, hogy az 5HT<sub>1A</sub> receptor agonistával kiváltott csökkent 5-HT jelátvitel erős kortizol választ indukál<sup>318</sup>.

A Hitoshi Okamoto által vezetett laboratórium munkájának nyomán tudjuk, hogy a zebradániók averzív ingerekre adott adekvát viselkedési válaszanak szabályozásában a habenula is központi szerephez jut. A habenula mind emlősökben, mind halakban az emocionális működések és a viselkedés szabályozásában fontos előagyi és agytörzsi magvakat köti össze, így például bemeneteket kap a szepto-hipokampális rendszerből, a ventrális pallidumból és vetít az interpedunkuláris magba, a VTA-ba és a raphe komplexbe<sup>319</sup>. Agetsuma és munkatársai rámutattak, hogy az emlősök dozális habenulájával homológ laterális magcsoport kimeneteinek specifikus gátlása a kondicionált averzív ingerre adott menekülő választ a dermedési viselkedés irányába tolja el, vagyis a mag kiemelkedő fontosságú az averzív inger-válasz kombinációk szabályozásában<sup>320</sup>.

Az averzív ingerekre adott válaszok neuromodulátoros szabályozásának fontosságára hívták fel a figyelmet Lovett-Barron és munkatársai úttörő jelentőségű vizsgálatukban. A kísérlet során 9 napos lárvák teljes agyi aktivitását monitorozták sejtszinten és valós időben egy predátorasszociált közeledő pontra adott reakció közben. A szerzők arra voltak kíváncsiak, hogy a stimulus által kiváltott éberség kialakításában mely neuromodulátoros sejtcsoportok vesznek részt, így a viseledés és *in vivo* neuronális aktivitás vizsgálata után az egyes résztvevő sejteket immunhisztokémiai jelöléssel fenotipizálták. Számos, eltérő típusú neuromodulátoros magcsoport szerepének azonosításán túl a szerzők rámutattak, hogy a dopaminerg, noradrenerg, szeroenerg, szomatosztatin+, CART+ és NPY+ sejtek aktivitásának különböző irányú korrelációi hogyan prediktálják egy egyed averzív inger által kiváltott éberségét<sup>226</sup>.

A fenti példákából látható, hogy a zebradánióban, az emlősökhöz hasonlóan megtalálhatók a különböző szenzoros ingereket integráló és a motoros és fiziológiás választ irányító felsőbb központok. Ezek, hasonlóan a jobban levezetett állatcsoportokhoz, az agytörzsi neuromodulátoros magvak finomhangoló szabályozása alatt álnak. Ezen felül a

zebradániók az előagyi központokon és azokat moduláló agytörzsi magokon túl, az ezeket összehangoló csomópontokkal is rendelkeznek.

### **2.2.10. A defenzív viselkedés szerotonerg szabályozása zebradánióban**

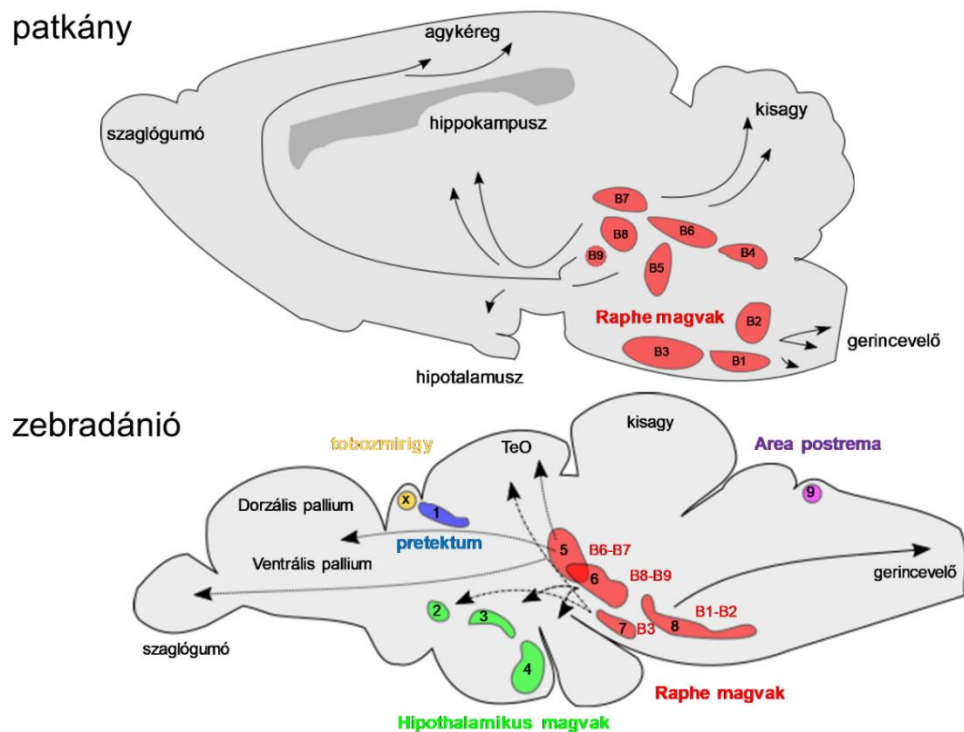
A számos, szerotonerg rendszeren keresztül ható szorongásoldó ágens zebradánióban is igazolt viselkedési hatása a faj védekező viselkedésrepertoárjának és a szerotonerg rendszer komponenseinek kapcsolatát jelzi, így ezt a kérdéskört széles körben vizsgálták az utóbbi években. A terület azért is kiemelkedő fontosságú, mert a zebradánió mind lárvális, mind pedig adult formáit széles körben alkalmazzák a farmakológiai szűrési vizsgálatokban, így a modell prediktív validitásán túl, annak konstrukciós validitását, vagyis a zebradánió szerotonerg rendszerének felépítését is fontos megismernünk.

#### **2.2.10.1. A szerotonerg rendszer anatómiája**

Érdekes módon az emlősökénél egyszerűbb felépítésű idegrendszerrel rendelkező zebradániók, azoknál anatómiai és neurokémiai szempontból is jóval összetettebb szerotonerg rendszerrel bírnak<sup>321</sup>. A filogenetikai szempontból kevésbé levezetett gerinces csoportokat vizsgálva, az előgerinchúrosoknál még nem, de például az egyik legősibb jellegeket mutató gerinchúros csoportnál, az ingoláknál (*Petromyzontiformes*) már a csontoshalakéhoz hasonló komplex anatómiájú szerotonerg rendszert látunk<sup>322</sup>, így ez valószínűleg a valódi gerinchúrosok egy alapi tulajdonsága. A zebradánióban összesen 9+1, egymástól jól elkülönülő szerotonerg klaszter és számos alterületet ismerünk; ezek a tobozmirigyi csoport (klaszter<sub>x</sub>), a pretektális komplex (klaszter<sub>1</sub>), a paraventrikuláris komplex (klaszter<sub>2-4</sub>), a rosztrális, vagy szuperior (klaszter<sub>5-7</sub>) és a kaudális vagy inferior raphe komplexek (klaszter<sub>8</sub>), valamint az area postrema (klaszter<sub>9</sub>)<sup>233,321</sup>. A zebradánió rosztrális komplexéhez tartozó DRN (klaszter<sub>5</sub>), MRN (klaszter<sub>6</sub>), valamint a ventrolaterális/raphe magnusz (klaszter<sub>7</sub>) magvait, a rágcásalók azonos nevű, B6, B8-B9,

illetve B3 magvainak homológ területeinek tekintik. A zebraadánió kaudális raphe komplexe (klaszter<sub>8</sub>) a rágcásalók raphe pallidusz (B1) és obszkurusz magvainak feleltethetőek meg<sup>238</sup>.

Az egyes szerotonerg klaszterek elhelyezkedését és azok homológiákat a 3. ábra mutatja. Látható, hogy míg a zebraadániók esetében a filogenetikai értelemben alapi pozíciójú, jól elkülönülő magvakból álló szerotonerg rendszerrel találkozunk, az emlősökben egy kizárólag a raphe magvak keretein belül létrejött, lokálisan összetettebb struktúra mutatkozik.



**3. ábra:** A patkány és a zebraadánió szerotonerg magcsoportjai és ismert projekciós területeik. A fajokra jellemző, elfogadott felosztást és nevezéktant (patkány: B1-B9, zebraadánió: klaszter<sub>1-9</sub>) a magvakban feketével tüntettem fel. A zebraadánióban azonosított patkány-homológ területeket a magvak mellett pirossal láthatók. Rövidítések: TeO - tektum optikum)

Mivel a zebraadániót elsősorban a jobban levezetett gerincesek modelljeként alkalmazzuk, a legszéleskörűbb ismeretekkel az ezekben a fajokban a szerotonerg funkciót kizárólagosan kiszolgáló raphe komplexekről rendelkezünk. Ezek génexpressziós profiljuk alapján jól elkülöníthetők a többi magtól, a szerotonin szintézishez, szállításhoz és lebontáshoz szükséges komponenseken felül szelektíven fejezik ki a Pet1 transzkripciós faktort és egyes szerotonerg receptorokat<sup>323</sup>. A dorzális raphe hosszúkás-ovális unipoláris

szeroenerg neuronok, míg a mediális magot két párhuzamos sorban elhelyezkedő, nagyobb szeroenerg sejtek alkotják, ventrális és ventrolaterális irányban elágazó dendritfával. Míg a dorzális mag a telencephalon több területét és a szaglógumót idegzi be, a mediális mag a hipotalamuszba, a ventrolaterális mag a TeO PGZ régiójába, míg az inferior mag a nyúltvelőbe és a gerincvelőbe vetít. A raphe magokon kívül, egyedül a pretektális magcsoport tektális projekcióiról tudunk<sup>233</sup>.

### 2.2.10.2. A szeroenerg jelátvitel komponensei

A zebraadánió szeroenerg rendszerének jelátviteli komponensei az emlősökénél jóval nagyobb diverzitást mutatnak, ami visszavezethető az ún. hal-specifikus genom duplikációs („*fish-specific genome duplication*”, a továbbiakban FSGD) evolúciós eseményre. Az FSGD, vagyis a genom megduplázódása, valószínűleg a ma élő halfajok 99%-át magába foglaló sugarasúszójú halak (*Actinopterygii*) egy ősi csoportjában történt, függetlenül a csontshalak másik, a tetrapodák és így az emlősök őseinek tartott bojtosúszós halaktól (*Sarcopterygii*)<sup>324,325</sup>. A két nagy csoport egymástól mintegy 400 millió éve válhatott el, így ettől a ponttól az ágak független evolúciós utat jártak be. Mivel azonban a zebraadánióknál leírt komplex szeroenerg rendszer valószínűleg gerinchúros vívmány, a legtöbb emlősöknél ismert jelátviteli komponens megtalálható a halakban, az FSGD miatt akár több kópiában is. Mivel az emlősök szeroenerg jelátvitelét részletesen ismertettem a korábbiakban, ebben a részben csak a legfontosabb funkcióval rendelkező komponensek hal-specifikus különbségeire térek ki.

*Szintézis.* Az emlősök környéki idegrendszerében szeroenergint szintetizáló TPH1 enzim génjének két (TPH1a-b), a központi idegrendszeri TPH2-nek egy génvariánsát azonosították eddig zebraadánióban. Az 5-HT szintézisét potenciálisan érintő különbségek, hogy i) a TPH1 variánsai kifejeződnek a központi idegrendszerben, bár csak a hipotalamuszra és a tobozmirigyre korlátozódva, illetve hogy az emlősöknél a dopamin szintézisét katalizáló tirozin-hidroxiláz egy szintén hipotalamikus expressziót mutató variánsa (TH2) valójában egy funkcionális triptofán-hidroxilázt kódol, ami szintén képes lehet a szeroenerg szintézisre<sup>326</sup>. Míg a fenti variánsok funkcionális szerepére nincs egyértelmű bizonyíték,

addig a hipotalamusz kivételével minden szerotonerg magban kifejeződő TPH2 manipulálása, az emlős enzimmel analóg szerepre utal.

*Szállítás és visszavétel.* Mind a monoaminok szállításáért felelős VMAT<sup>327</sup>, mind pedig a szerotonin visszavételét végző SERT két izoformája ismert zebraadánióban<sup>235</sup>. A SERT-et kódoló gén variánsai (slc6a4<sub>a-b</sub>) komplementer módon fejeződnek ki, duplikátuma a periventrikuláris hipotalamuszra és periventrikuláris szervre (PVO) korlátozódik. A transzporterek és receptorok esetében is kiemelkedően fontos eltérés az emlős izoformákhoz képest, az egyes farmakológiai ágensek azokhoz való affinitása. A szélesebb körben kifejeződő slc6a4a formához például 35-szörös hatékonysággal kötnek be triciklusos antidepresszánsok, mint a dezipramin vagy az imipramin, míg 15-30-ad annyira kötődik hozzá a kokain és annak analógjai<sup>328</sup>.

*Lebontás.* A monoaminok lebontását végző MAO enzimnek egy izoformáját, a zMAO-t ismerjük zebraadánióban. Mivel a porcoshalak és állkapocs nélküliek MAO enzimjéről nincs adatunk, nem tudjuk, hogy az emlősökben leírt 2 izoforma vajon egy tetrapoda-specifikus duplikáció eredménye-e, vagy a zebraadánió zMAO enzime maradt magára másodlagosan. A zMAO kötőhelyei mindkét humán izoformától körülbelül annyira különbözik, mint azok egymástól. Ezzel összhangban, az irreverzibilis MAOA (klorgilin) és MAOB (deprenil) inhibitorok azonos potenciállal gátolják az enzimet<sup>329-331</sup>.

*Receptorok.* Zebraadánióban eddig összesen 22 szerotonin receptort kódoló gént azonosítottak. Ezek közül az 5HT<sub>1B</sub>, 5HT<sub>1D</sub>, 5HT<sub>1E</sub>, 5HT<sub>2B</sub>, 5HT<sub>4</sub> és az 5HT<sub>6</sub> receptoroknak 1, az 5HT<sub>1A</sub>, 5HT<sub>1F</sub>, 5HT<sub>2A</sub>, 5HT<sub>2C</sub>, 5HT<sub>3</sub> és az 5HT<sub>5A</sub> receptoroknak 2, míg az 5HT<sub>7</sub> receptornak összesen 4 izoformáját ismerjük a fajban<sup>233,235,321,332,333</sup>. A legszélesebb körben vizsgált és a defenzív viselkedés szabályozásában ismert szereppel bíró receptorok az 5HT<sub>1A</sub> (*htr1aa* és *htr1ab* variánsok) és az 5HT<sub>2C</sub> (*htr2cl1* és *htr2cl2*). Az 5HT<sub>1A</sub> receptort kódoló génvariánsok számos központi magban fejeződnek ki, ami azonban a viselkedésfarmakológia eszköztárának szempontjából a legérdekesebb, hogy míg mindkét variánst detektálhatjuk mRNA szinten a rostrális raphe komplexben, addig az előagyban csak a *htr1ab* jelenik meg, kis expressziót mutatva, és kizárólag a striátum homológ ventrális pallium területen<sup>235</sup>. Ez

alapján felételezhetjük, hogy ez az emlősökben hetero-és autoreceptorként is funkcionáló fehérje, a zebraadánióban túlnyomórészt az utóbbi funkciót tölti be. Ugyan ilyen szempontból lényeges, hogy az 5HT<sub>1A</sub> receptor parciális agonistája, a klinikumban szorongásoldóként alkalmazott buspiron, 4-szer, illetve 8-szor nagyobb affinitással köt a zebraadánió ezen receptoraihoz, mint azok patkányban és emberben ismert izoformáihoz<sup>334</sup>.

### **2.2.10.3.A szerotonerg rendszer szerepe a defenzív viselkedésben**

Hasonlóan az emlősöknél tárgyaltakhoz, a zebraadánió defenzív viselkedésének szerotonerg hátterére is számos indirekt és direkt bizonyíték utal. A korábbiakhoz hasonlóan, tárgyalom 1) a szerotonerg rendszer és a védekező viselkedést irányító központok anatómiai kapcsolatait, 2) a stressz-válasz keretein belül megjelenő szerotonerg és viselkedési válaszok korrelációit, valamint 3) a rendszer anatómiai és jelátviteli komponenseinek manipulálására adott viselkedési válaszokat.

### **2.2.10.4.A szerotonerg rendszer és a viselkedési stressz-választ irányító területek anatómiai kapcsolatai**

A zebraadánió szerotonerg rostjai behálózzák a védekező viselkedés létrejöttéhez nélkülözhetetlen szenzoros területeket, az információintegráló és döntéshozó, valamint a motoros és élettani választ megindító központokat. A vizuális információt feldolgozó tektum optikum projekciókat kap a pretektális szerotonerg magcsoportból és a DRN-ből<sup>297</sup>. Ezen felül, a kémiai információt feldolgozó szaglógumót szintén behálózza a DRN. A szenzoros információt feldolgozó előagyi területek erős szerotonerg innervációt kapnak az oldalsó előagyi kötegen keresztül. A bejutó rostok legnagyobb mennyiségben a preoptikus areát és a BLA homológ Dm-et, majd a hippokampusz homológ Dl-t, illetve a striatum homológ Vd területeket érik. Ezzel a mintázattal nagyjából megegyezik a telencephalonban mért zMAO aktivitás is<sup>252,321</sup>. A fizioiógias stressz-válaszért felelős paraventriculáris hipotalamusz, egyrészt maga is tartalmaz, erősen egyedi expressziós-profillal rendelkező szerotonerg sejteket, másrészt minden alrégiója dús bemenetet kap az MRN-től. A menekülő válasz közvetlen kivitelezésben főszerepet játszó Mauhtner óriásneuronok, illetve a motoros gerincvelői dúcokat az inferior raphe komplex idegzi be<sup>335,336</sup>. A raphe magok védekező

viselkedésben való szabályozó szerepére utal még, hogy a rostrális raphe komplex a központi stressz-válaszban fontos CRHerg neuronoknak<sup>303</sup>, illetve az adekvát inger-válasz párok kiválasztásában fontos habenulának is célterülete<sup>320</sup>.

#### **2.2.10.5. A szerotonerg jelátvitel és a viselkedés korrelációja stresszmodellekben**

A zebradánió szerotonerg rendszerének akut és/vagy krónikus stresszre adott válaszainak irodalma nagyon limitáltnak mondható. Maximino és munkatársai az extracelluláris térből mérték 5-HT koncentrációt közvetlenül az OT és az LDT tesztek után, teljes-, elő-, közép-, illetve nyúltagyi homogenizátumokból, felnőtt állatban. Kontrollcsoportnak „handling” stresszt alkalmaztak. Eredményeik alapján az LDT kihívás után a teljes-, az elő-, és a nyúltagyi szövetekben magasabb 5-HT koncentráció volt kimutatható, míg az OT teszten átesett állatok kizárólag a középgyban mutattak hasonló hatást. Interpretációjuk alapján a két kihívás más-más agyterületeken okozott megemelkedett 5-HT elválasztást. Érdekes módon, annak ellenére, hogy mind az LDT, mind az OT tesztet hasonló irányú változás követte, a központi 5-HT szint a világoselkerüléssel pozitívan, míg a felszínelkerüléssel negatívan korrelált. Meg kell azonban jegyezni, hogy a handling, mint eltérő típusú stresszor, nem feltétlenül megfelelő kontrol a stressz-indukált 5-HT mérésére, hiszen a nyugalmi koncentrációk ismeretének hiányában nem tudhatjuk, hogy a stressz hatására milyen irányú változás történt<sup>337</sup>. Ennek ellenére, a szerzők eredményei és azok értelmezése egybevágnak az emlős irodalom megállapításaival, miszerint az akut kihívások 1) megemelkedett 5-HT szintekkel korrelálnak, illetve 2) az 5-HT viselkedési hatásai a HPI-tengely aktivitásával párhuzamosan jelenhetnek meg, tekintve, hogy mindkét alkalmazott kihívás az 5-HT elválasztás mellett, erős kortizol és/vagy CRH szinteket indukál<sup>287,338</sup>. Ez alapján Maximino eredményei összefüggésbe hozhatók mind az 5-HT tónus viselkedést megengedő hatásaival, valamint az 5-HT viselkedés megjelenésével való pozitív, illetve az 5-HT kontextusváltással való negatív kapcsolatával egyaránt.

Cheng és munkatársai a DRN TPH2-t és Pet1-et kifejező szerotonerg sejteinek averzív és nem averzív ingerekre, köztük sötétre és világosra adott sejtaktivitását vizsgálta 9 napos lárvákban *in vivo*. A jelölt sejtek nagyobb része sötétben volt aktív, majd fény hatására hosszú csökkenést mutatott (OFF sejtek), míg egy kisebb részük a fényingerre megnőtt



aktivitással válaszolt (ON sejtek). Érdekes módon rövid elektromos sokk, mint stresszor hatására mind az ON, mind az OFF sejtek aktiválódtak, amiből a szerzők arra következtettek, hogy a sejtek aktivitásváltozása nem a stimulus averzivitásának kódolásával van összefüggésben<sup>255</sup>. A sokk indukált elnyújtott aktivitást minden esetben megszakította a sejtek fény-sötét átmenetre adott akut válasza, tehát lehetséges hogy a különálló populációk aktivitásváltozása a kontextusváltozással és a kontextus szerint adekvát viselkedés facilitálásával van összefüggésben. Sajnos a vizsgálatban limitált számú viselkedési végpontot publikáltak csak, így erre a kérdésre az nem ad választ.

A krónikus stressz által befolyásolt, kihívásra adott szerotonerg válaszokat szinte kizárólag a Gerlai Róbert által vezetett laboratórium munkáiból ismerjük. Adult állatok szociális izolációját követően, egy akut kihívás egyes esetekben növelte<sup>263</sup>, máskor csökkentette<sup>262</sup>, vagy egyáltalán nem volt hatással<sup>264,306</sup> a központi 5-HT és 5-HIAA szintekre. Az ellentét feloldását jelentheti, hogy míg valamely kísérletnél újdonság-kihívás után, más esetekben szociális kihívást követően vizsgálták az 5-HT választ és kicserélődést, amely kontextusok rágsálók esetében ellentétes irányú 5-HT választ eredményezhetnek<sup>339</sup>. Ezen felül fontos fontos megjegyezni, hogy az adult kori szociális izoláció, rágsálók esetében is ellentmondásos eredményekkel terhelt, változatos irányú hatásokra ismerünk példákat.

Az adultkori izolációval kontrasztban érdemes megemlíteni Elena Dreosti laboratóriuma egy jelenleg publikálás alatt álló vizsgálatát, ahol a fejlődés első 3 hetében izolálták az állatokat, vagyis a szociális viselkedés kialakulásának időszakában. Az izoláció a korábban tárgyalt erős szociális averzió mellett érdekes idegrendszeri aktivitásmintázattal járt együtt. A szociálisan nevelt állatok szociális inger hatására erős aktivációt mutattak a stressz-válasszal (hipotalamusz, POA), illetve a vizuális inger feldolgozásával (TeO, PTN) összefüggésbe hozható agyterületeken az izoláltakhoz képest. Ami azonban igazán meglepő volt, hogy az izolált állatok, a társas csoport szociális kihívásra adott válaszait is felülmúló aktivitást mutattak ezekben a régiókban, nyugalmi állapotban. A viselkedésvizsgálat előtt buspíront alkalmazva, az izoláltak viselkedése a csoportosan tartott egyedek szintjére emelkedett, így a szerzők a hatások szerotonerg hátteréről számoltak be<sup>309</sup>. Az

eredményekből arra következtethetünk, hogy a fejlődéskori izoláció, hasonlóan a rágcsálóknál látottakhoz, ellentétes irányú idegrendszeri változásokhoz vezethet nyugalmi-, és stressz-indukált állapotokban.

#### **2.2.10.6.A szerotonerg jelátvitel és a viselkedés kauzális kapcsolatai**

Hasonlóan a rágcsálóknál tárgyaltakhoz, a zebradánió szerotonerg működéseinek és védekező viselkedésének kauzális kapcsolatainak leírása a rendszer jelátviteli és anatómiai komponenseinek manipulálásával lehetséges.

##### Jelátviteli komponensek

*Szintézis.* A TPH farmakológiai gátlása pCPA-val, és így az 5HT szintézis csökkentése egy újdonságkihívás során a korspecifikus sötét/világos elkerülést csökkenti<sup>255,337</sup>, míg a felszínkerülést növeli<sup>337</sup>. Ahogy korábban már tárgyaltuk, jócskán találkozunk az irodalomban példákkal, ahol a két viselkedés ellentétes irányban reagál egy környezeti vagy farmakológiai kezelésre, aminek a hátterében a két teszt által nyújtott eltérő kihívás állhat. Érdekes módon, ha az OT tesztet előzetes predátorasszociált AS kezeléssel kombináljuk, a TPH gátlás a felszínkerülés növelése helyett, kivédi azt<sup>298</sup>. Lehetséges, hogy az LDT teszt, illetve a predátor szignállal felerősített OT teszt olyan belső tónust hoz létre, ahol az 5-HT szintézis gátlása elkerülést csökkentő lehet, míg az egyszerű, ingermentes OT teszt kontextusában az az elkerülést növeli. Hasonló jelenséggel találkozhatunk a rágcsáló irodalomban, ahol a szerotonin elválasztást csökkentő buspiron gyakran csak averzívabb, vagy stresszorzal kiegészített újdonságkihívásra fejt ki a hatását. Az 5-HT szintézis akut gátlása, vagyis az 5-HT tónus csökkentése erősen kihívás-függő hatásokat fejt ki az elkerülő viselkedésre.

*Szállítás és visszavétel.* A monoaminokat szállító VMAT2 krónikus gátlása resperinnel elhúzódozó explorációt, nagyobb felszínre lépési latenciát és megnövelt dermedési magatartást eredményez<sup>340</sup>, azonban a kezelt állatok egyéb, lokomotoros deficitre utaló tünetei miatt, véleményem szerint hiba ezt specifikus hatásként interpretálni. A szerotonin visszavételét végző SERT akut gátlása SSRI készítményekkel, és így az 5-HT jelátvitel rövidtávú növelése csökkenti a felszínkerülést<sup>341-344</sup> és növeli a világos elkerülést<sup>337</sup>, míg lárvák esetében

csökkenti a sötét-elkerülést<sup>255</sup>. Az akut fluoxetin kezelés csökkenti az ijedési választ<sup>345</sup>, az újdonság-indukált dermedést<sup>346</sup>, az AS kezelés közvetlen, félelem-asszociált hatásait, míg növeli annak elhúzódó, szorongás-asszociált hatásait<sup>298</sup>. Ezen felül a fluoxetin elmosza az akut stresszasszociált fiziológiás hatásokat, például az AS kezelés által kiváltott szimpatikus aktivációt, vagy az üldözés-stressz által kiváltott kortizol növekedést<sup>317,347</sup>. Ez alapján úgy tűnik, hogy az akut SERT gátlás a TPH gátlás hatásaival ellentétes; növeli a világos-elkerülést, míg csökkenti a felszínkerülést és a félelmi válaszokat. Fontos megjegyezni, hogy a szintézisgátlással ellentétes hatás konzisztens képet mutat, vagyis az akut 5-HT csökkenés és növelés viselkedési hatásai szimmetrikusak a két kihívás során.

*Receptorok.* A viselkedési paradigmákban legtöbbet vizsgált receptortípus az 5-HT<sub>1A</sub> receptor, aminek farmakológiai aktiválása buspironnal, csökkenti mind a korszpecifikus sötét/világos elkerülést<sup>321,345,348,349,349</sup>, mind a felszínkerülést<sup>253,337,350</sup>. Érdekes módon, a receptor gátlása a WAY 100.635 antagonistával ugyanilyen hatást fejt ki a két tesztben, az extracelluláris 5-HT szint megnövelése nélkül<sup>321,337</sup>. Ugyan ez az ágens, bár nem képes az AS-indukált viselkedési hatást elmosni, annak antinociceptív hatásait gátolhatja<sup>347</sup>. Védekező viselkedés kontextusában vizsgáltak még a nem-szelektív 5HT<sub>2</sub>, illetve 5HT<sub>3</sub> receptor antagonistákat, amelyek növelték a felszínkerülést<sup>351</sup>, illetve a nem-szelektív szerotonerg receptor antagonista metergolint, ami az AS közvetlen panikogén hatásait nem, de annak elhúzódó anxiogén hatásait elmosta<sup>298</sup>. Összefoglalva, úgy tűnik az 5-HT<sub>1A</sub> hatások kevésbé érzékenyek a kihívás típusára, míg a szerotonerg jelátvitel generális inhibíciója kontextusfüggő lehet. Ez a trend rágcsálókban éppen ellentétesen alakul.

#### Anatómiai komponensek

Cheng és munkatársai korábban már tárgyalt munkájában, a TPH2 neuronok optogenetikai aktiválása egy erősen bimodális eloszlást eredményezett az LDT-ben mért sötét/világos elkerülésben, a halak egyik része világos-, a másik sötétkerülő fenotípust mutatott. Ezzel ellentétben, ugyan ezen sejtek optogenetikai inhibíciója egységesen csökkentette a sötétkerülést. A szerzők a bimodális eloszlást azzal magyarázzák, hogy a sejtaktiváció hatása talán egy aktuális belső állapothoz járul hozzá és a viselkedési fenotípus

ennek eredőjét tükrözi, így például sötétben vagy világosban tartozkodó egyedek, a környezet averzív értéke miatt eltérő 5-HT tónussal és ennek következtében más éberséggel és már szenzoros percepcióval rendelkezhetnek<sup>255</sup>.

A stressz-indukálta éberség kialakításában fontos szerotonerg mechanizmusra hívták fel a figyelmet Yokogawa és munkatársai is, amikor egy vizsgálatukban rámutattak, hogy a vízárammal keltett magasabb éberségi szint specifikus DRN neuronok aktivációjához vezet. A neuronok szelektív elirtásával kivédhető volt a stressz-indukált megnőtt szenzoros érzékenység és éberségi állapot<sup>297</sup>.

Hasonlóan a rágcslóknál tapasztaltakhoz, a zebradánió különböző szerotonerg sejtpopulációi más-más viselkedési dimenziót érinthetnek. Fontos ezen felül megjegyezni, hogy az anatómiai és jelátviteli különbségek ellenére, számos szerotonerg működés funkcionálsan konzervatív képet mutat, az egyes szorongást befolyásoló ágensek a legtöbb esetben hatékonyan bizonyulnak.

### 2.2.11. A gerincesek szerotonerg stressz-válaszát befolyásoló tényezők összefoglalása

Az emlős és zebradánió modellből származó, védekező viselkedés és a szerotonerg rendszer kapcsolatát mutató adatokat az 1. táblázat foglalja össze.

1. táblázat: szerotonerg és viselkedési változások emlős valamint zebradánió stresszmodellekben.

modell			emlős		zebradánió		értelmezés
hátér	kihívás	kezelés	5-HT	viselkedés	5-HT	viselkedés	
	sokk						viselkedés megjelenésével asszociált válasz
	predátor (akut)		↑	félelmi válasz	↑	félelmi válasz	
	predátor (kontextus)						
	immob.		↑	változatos hatások	NA	NA	

modell			emlős		zebradánió		értelmezés
hátér	kihívás	kezelés	5-HT	viselkedés	5-HT	viselkedés	
	újdonág (akut)		↑	viselkedési inhibíció, éberség, majd kockázatfelmérés	↑	viselkedési inhibíció, éberség, majd kockázatfelmérés	
	újdonág (elhúzóóó)		↓	viselkedésre orientáció, éberség	NA	kihívás-függő elkerülés	<b>kontextus megváltozásával asszociált válasz</b>
	megszakító inger		↓	viselkedésre orientáció	↓	viselkedésre orientáció	
<b>ismételt stressz</b>	sokk		0	-	NA	NA	
	immob.		↑	NA	NA	NA	
	újdonág		0	változó hatások	-	változó hatások	
<b>szociális izoláció</b>	sokk		0	-	NA	NA	<b>újdonág-asszociált defenzív viselkedés szabályozásának fejlődésfüggő szétkapcsolódása</b>
	immob.		← →	NA	NA	NA	
	újdonág		0	szoc. elkerülés, csökkent exploráció, erős elkerülés	kihívás-függő, fejlődés-függő	szoc. elkerülés, fejlődés-függő elkerülés	

modell			emlős		zebradánió		értelmezés
hátér	kihívás	kezelés	5-HT	viselkedés	5-HT	viselkedés	
			5-HT és éberség kapcsolatának szétkapcsolódása		NA	NA	
spontán mutáns	újdomság		↓	erős elkerülés (BALB/cJ)	↓	erős elkerülés (leopard)	<b>Krónikus fejlődéskori hatás:</b> szélsőségesen szorongó fenotípus.
TPH KO			↓	erős elkerülés, szorongás	↓	NA	
		TPH gátlás	↓	fokozott indukált lokomóció és exploráció	↓	kihívás-függő elkerülés	<b>Akut hatás:</b> Az exploráció egyes dimenzióinak serkentése (éberség, szorongás)
SERT KO			↑	erős elkerülés	↑	NA	
		SERT gátlás	↑	csökkent elkerülés	↑	kihívás-függő elkerülés	
5HT <sub>1A</sub> KO			?	erős elkerülés,	NA	NA	
		5HT <sub>1A</sub> gátlás	↓	kihívás-függő elkerülés	↓	csökkent elkerülés	
		5HT <sub>1A</sub> aktiválás	↑	NA	↑	csökkent elkerülés	

Látható, hogy az emlős és zebradánió modellek vizsgált biológiai végpontjai számos ponton egyeznek, különös tekintettel arra, hogy a szerotonerg rendszer mely viselkedési dimenziók kialakításában játszik fontos szerepet. Ebből a rendszer funkciójának és mechanizmusának konzervált jellegére következtethetünk, valamint, ezzel szoros összefüggésben, a különböző modellorganizmusokból származó eredményeket együtt értelmezhetjük a rendszer megértéséhez. Mindkét esetben látunk példát az akut stressz által kiváltott növekvő, illetve csökkenő szerotonin jelátvitelre, amelyek a defenzív viselkedés megjelenésével, illetve az újdonság inger feldolgozásával lehetnek kapcsolatban. A krónikus stressz hatásait már jóval nehezebb párhuzamba állítani, ami talán nem is annyira meglepő, számba véve az emlősök és a halak merőben más környezeti kényszereit és életciklusát. Ezen felül, mind a rágcsáló, mind a zebradánió modellek esetében, a környezeti perturbációs és fenotipizálási protokollok számossága megnehezíti az irodalom értelmezését és az általános érvényű tanulságok levonását. Ennek ellenére, láthatunk bizonyos trendeket, a leggyakrabban alkalmazott, és az egyik legerősebb viselkedési és szerotonerg hatásokkal bíró szociális izolációt vizsgálva. Az irodalmat alaposan áttekintve a látott hatások sokfélesége visszavezethető néhány fő tényezőre, úgy mint a 1) környezeti tapasztalat, 2) az aktuális környezet és kihívások, valamint 3) a vizsgált viselkedési és 4) élettani fenotípus. Általánosan elmondható, hogy 1) az izoláció akkor fejt ki erős és koherens hatásokat a védekező viselkedésre és a szerotonerg rendszerre, ha az valamely a viselkedés kialakulásának szempontjából kritikus időszakban történik. A szerotonerg jelátviteli komponensek fejlődés során való manipulációjából, illetve azok viselkedési hatásaiból látható, hogy ezekben az időablakokban történő változások igénylik a szerotonerg jelátvitel adekvát jelenlétét. Látható továbbá az is, hogy az izoláció idején felül, kritikus kérdés még, hogy a fenotipizálás milyen körülmények között történik, vagyis hogy 2) milyen környezetben, 3) mely viselkedési dimenziókat vizsgáljuk. Az egészséges állatok vizsgálatából láthattuk, hogy a szerotonerg szabályozás megjelenését erősen befolyásolja a kihívás jellege, annak újdonsága és averzivitása, így feltételezhetjük, hogy a megzavart fejlődésű rendszer éppen az adekvát inger-válasz kombinációk létrehozására nem képes. Azon kevés vizsgálat, amely kitért az izolációt követő nyugalmi-, és stressz-asszociált állapotok vizsgálatára egyaránt, ezt az elképzelést erősíti. Ezen felül, mivel a szerotonerg

jelátvitel a védekező válaszok kialakításának bemeneti, feldolgozási és kimeneti, illetve ezeket finomhangoló központokban is jelen van, így a válasz bármely szinten sérülhet, tehát a fenotipizálás során a teljes szenzori-motoros választ vizsgálnunk kell. Végül pedig, az 4) élettani fenotipizálás idő-, és térbeli felbontása az, ami meghatározza a látott hatásunk tisztaságát. Mind egészséges, mind valamely környezeti perturbáción túlesett állatok, valamint azok farmakológiai kezelése révén láthattuk, hogy az aktuális központi 5-HT koncentrációnál sokkal informatívabb lehet az 5-HT változás mértéke és annak dinamikája a viselkedés kialakításának szempontjából. Ezen felül komoly irodalma van a szerotonerg projekció-függő viselkedési hatásoknak, így a működéseket érdemes agyterületenként is vizsgálnunk. Összefoglalva tehát, a defenzív viselkedés szerotonerg szabályozásának megértéséhez szükségünk van erős környezeti kontrollra, mind a fejlődés, mint az aktuális kihívások szintjén, és a lehető legjobb idő-, és térbeli felbontású viselkedési és élettani fenotipizálásra.



### 3. Célkitűzések

A zebradánió az előző részben felsorolt tényezők manipulálhatóságát tekintve élen jár a preklinikai modellorganizmusok között, hiszen 1) környezetének kontrollálása kompakt méretéből és gyors fejlődéséből adódóan könnyen kivitelezhető, 2) a faj egyedfejlődése során már igen korán széles viselkedésrepertoárt mutat, aminek vizsgálatára validált tesztek állnak a rendelkezésünkre, illetve 3) emlősökével analóg és homológ élettani paramétereit jó idő-, és térbeli felbontásban vizsgálhatjuk. A modell gyakran ismételt előnyein felül azonban, fontos tisztában lennünk annak limitációival is. Mivel a zebradánió viselkedésneurobiológiai alkalmazása még nagyon gyerekcipőben jár, kevés, a fajt alkalmazó etiológiai modell áll rendelkezésünkre, ráadásul ezek ritkán veszik figyelembe a rágcsáló irodalom tanulságait. Azon kevés esetben, ahol a környezeti tapasztalat befolyásoló hatásait vizsgálják, jellemzően nem a fejlődés szempontjából kritikus ablakokra helyezik a hangsúlyt, pedig a zebradánió különleges egyedfejlődése és a viselkedési metamorfózis jelenléte indokolná azt. Ezen felül igen limitált számú olyan teszt áll a rendelkezésünkre, amelyben az elkerülő viselkedést fejlődési stádiumtól függetlenül vizsgálhatjuk, hiszen a sötét/világos elkerülés erősen fejlődésfüggő, míg a felszínkerülésre nincs is lárvára alkalmazható módszer, ráadásul utóbbiak szinte minden szerotonerg és környezeti manipulációra ellentétes módon reagálnak, tehát azok interpretációja sem teljes.

Doktori munkám során célul tűztem ki egy olyan etiológiai modell kifejlesztését zebradánióban, amelyben, a rágcsáló irodalom tanulságait alapul véve, vizsgálhatók a szerotonerg rendszer defenzív viselkedési fenotípusra gyakorolt hatásai.

Ennek keretein belül célom **1)** korai fejlődési stádiumban lévő, lárva és juvenilis stádiumú zebradániók védekező viselkedésrepertoárjának jellemzése, kitérve azok újdonság-, és szociális inger által vezérelt viselkedésére, valamint ezen viselkedések fejlődésére, illetve környezeti és farmakológiai érzékenységére. Ezt az újdonságra adott válaszok esetében a létező sötét/világos elkerülést (LDT) és thigmotaxist (OT) mérő tesztek validációjával (**1. Kísérlet**) és azok tanulságait alapul véve a felszínkerülést mérő új teszt kifejlesztésével (**2.,**

**3. és 4. Kísérletek**), míg a szociális ingerre adott válaszok esetében a Dreosti-féle U-alakú szociabilitás teszt validálásával kívánom elérni (**6. Kísérlet**).

A megfelelő fenotipizálási eszköztár validálását követően, **2)** célom olyan fejlődési periódus után kutatni, amely a környezeti ingerekre kiemelkedően érzékeny, ennél fogva kritikus a későbbi védekező viselkedés kialakulásának szempontjából, ezen okokból pedig alkalmas lehet egy környezeti perturbációs etiológiai modell kialakítására. Hipotézisem, hogy a zebradániók viselkedési metamorfózisa egy ilyen kiemelt érzékenységgel és plaszticitással bíró időszak. Ennek igazolásához azt vizsgálom, hogy a metamorfózis előtti (pre-metamorf) és ahhoz közeli (peri-metamorf) időszakokban az egyedek eltérő módon alakítják-e viselkedésüket a környezeti tapasztalat függvényében, képesek-e például környezeti habitációra (**5. Kísérlet**).

Ezt követően célom **3)** a legmagasabb érzékenységgű időszakban környezeti zavarásokat, akut kihívást és/vagy krónikus szociális izolációt alkalmazni, majd annak hatását vizsgálni a juvenilis (poszt-metamorf) védekező viselkedésre (**7., 8., 10., 11., 12., és 13. Kísérletek**).

Továbbá célom **4)** a legerősebb viselkedési hatásokkal bíró perturbáció további jellemzése, kitérve annak nyugalmi és stressz-indukált szerotonerg válaszokra gyakorolt hatására (**8. és 9. Kísérletek**), valamint ezek idegrendszeri lokalizációjára (**10. Kísérlet**). Ezzel párhuzamosan tervezem a zebradánió védekező viselkedéseire az irodalom alapján egységes hatást kifejtő 5HT<sub>1A</sub> receptor agonista buspiron validálását, mint a szerotonerg jelátvitelt csökkentő eszközt (**9. Kísérlet**), majd annak alkalmazását a viselkedési és szerotonerg hatások közötti kapcsolat leírására (**10., 11., 12. és 13. Kísérletek**).

## **4. Módszerek**

### **4.1. Kísérleti alanyok**

A kísérletekhez használt állatokat az Eötvös Lóránd Tudományegyetemen, standard protokollok szerint<sup>352</sup> tartották. A kísérleti alanyok minden esetben vad típusú (AB törzs) 8, 14 illetve 30 napos nem-szexált zebradániók voltak. Az állatok 14/10 órás fény/sötét ciklusban nevelkedtek. A lárvákat 5 dpf kortól kereskedelmi forgalomban elérhető száraz tápon (100 µm-nél kisebb, illetve 100-200 µm szemcseméret közötti táp 1:1 arányú keveréke, Zebrafeed, Sparos) és Paramecium-on, majd 15 dpf után nagyobb szemcseméretű száraztápon (200-400 µm, Zebrafeed, Sparos) és friss Artemia-n tartották. A jelen munka során alkalmazott összes vizsgálati protokollt a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal engedélyezte (PEI/001/1458-10/2015, PE/EA/2483-6/2016).

### **4.2. Környezeti manipulációk**

A zebradániók fejlődéskori környezetének juvenilis fenotípusra gyakorolt hatásait a lárvák krónikus szociális izolációjával, illetve egy akut újdonság kihívás alkalmazásával kívántuk elérni. Az izoláció 14 dpf korban, a jelenlegi munka első szakaszában azonosított érzékeny időszakban kezdődött és, a juvenilis korú egyedek vizsgálatának hosszától függően, 28, 29, vagy 30 dpf korig tartott. Az egyes kísérletekhez ugyanazon ivásból származó lárvákat random allokáltuk szociális, illetve izolációs nevelésre. Az izolált állatokat fehér, átlátszatlan műanyag kádakba (52 x 35 x 46 mm, mélység x szélesség x hosszúság) tartottuk, ezzel kizárva az egyedek közötti vizuális kommunikáció lehetőségét. A nevelő közeg E3 médium volt, amit napi rendszerességgel cseréltek. A szociálisan tartott kontroll állatokat az izoláltakkal identikus körülmények között, de a nagyobb egyedszámot figyelembe véve nagyobb kádakban tartottuk, ezzel minden egyednek hozzávetőlegesen 50 ml folyadékteret biztosítva.

Újdonság kihívásként a LDT tesztnek vetettük alá az állatokat, ami irodalmi adatok alapján akut fiziológiás stressz-választ vált ki zebradániókból<sup>338</sup>. Mivel a LDT tesztet a

viselkedési fenotipizáláshoz is alkalmaztuk, annak paramétereit a 4.4. (Viselkedésteszték és analízis) szekcióban ismertetem.

### **4.3. Farmakológiai manipulációk**

Minden alkalmazott drogot a halak tartására használt E3 médiumban oldottunk fel. Az állatokat egy 10 percen át tartó „fürdő” formájában kezeltük, amit az inkubációs periódus standardizálása végett, egy tisztán E3-at tartalmazó, 1 percen át tartó kimosási „fürdő” követett. Ez alól az egyedüli kivétel, a kezelési inkubációs idők viselkedésre gyakorolt hatását vizsgáló kísérlet, ahol az egyik csoport a kezelő oldattal együtt került a viselkedéstesztbe. A vízfürdők standard, 24 részes sejtenyésző edényekben történtek. Az állatokat egyedileg, külön kompartmentekben kezeltük, egyedenként 1.5 ml folyadékban (kompartment: 15,6 mm átmérő). A kezelések előzetesen randomizált elrendezés szerint történtek. Az OT és LDT tesztek farmakológiai validálásához buspiron (PubChem CID: 24278079) 0, 6.25, 12.5, 25, 50 és 100 mg/L-es koncentrációit alkalmaztuk. Az általunk fejlesztett úszó keresztpalló teszt (a továbbiakban SPM) farmakológiai validálásához, a buspiron és koffeint (PubChem CID: 2519) 0, 25, 50 és 100 mg/l, a klórdiazepoxidot (a továbbiakban CDP) (PubChem CID: 24892497) 0, 0.1, 1 és 10 mg/l koncentrációban alkalmaztuk. Az SPM validációját követő kísérletekben alkalmazott buspiron már csak a hatékonyan bizonyuló 50 mg/l koncentrációban alkalmaztuk. A drogot a Sigma-Aldrich-től szereztük be.

### **4.4. Viselkedésteszték és analízis**

#### **4.4.1. Sötét/világos preferencia teszt (LDT)**

A vizuális ingerek által irányított, újdonsághelyzet által kiváltott szorongás-asszociált viselkedés és viselkedési reaktivitás vizsgálatára, valamint újdonság kihívás előidézésére a LDT tesztet alkalmaztuk. A tesztben látott viselkedés a zebra-dániók korfüggő sötét-, illetve világos-averziója, valamint az újdonság helyzetben kialakuló exploratív motivációja közötti csereviszonyon alapszik<sup>279,288</sup>. Az irodalom a tesztet farmakológiai<sup>258,293,338</sup>, fiziológiás<sup>338</sup> és viselkedési<sup>285</sup> validációt alapul véve, klasszikus értelemben szorongás-tesztként tárgyalja és

viselkedési kimenetét eszerint értelmezi. A szociális izoláció viselkedési hatásait vizsgáló kísérletekben az apparátusokat átlátszó műanyag kádakból alakítottuk ki (90 x 25 x 24, hosszúság x szélesség x mélység). Az apparátus alsó felszínének felét feketére festettük (sötét zóna), másik felét érintetlenül hagytuk, így utóbbi átjárható maradt az alulról érkező fény számára (világos zóna). A szkototaxis, thigmotaxis és geotaxis összefüggéseit vizsgáló kísérletekben, valamint a farmakológiai validáció során, az előzőhöz hasonlóan lefestett, 24 osztatú sejtenyésző tálakat használtunk. A nem kívánt külső hatások minimalizálása érdekében az apparátusokat minden esetben egy átlátszatlan fekete dobozzal takartuk és alulról világítottuk meg fehér matt műanyaggal fedett led panelekkel. A tesztek a világos periódus második részében végeztük (hozzávetőlegesen 13:00-tól kezdődően), mivel irodalmi adatok alapján a zebradániók ekkor mutatják a legstabilabb lokomotoros aktivitást<sup>353</sup>. A farmakológiai kezeléseket is magában foglaló kísérletek alkalmával a tesztek, a *Farmakológiai manipulációk* részben leírtak szerint egy 10+1 perces kezelés+kimosás periódus előzte meg. A kezelő, kimosó és tesztelő periódusok között az állatokat pasteur pipettával mozgattuk a kompartmentek között. Egyszerre 8 egyedet vetettünk alá viselkedéstesztnek. Egy egyed 10 ml E3-ban úszott. A teszt kezdetén az egyedeket az apparátus világos zónájába, közvetlenül a sötét-világos határvonal elé helyeztük, majd viselkedésüket videókamerával, 30 fps (frame per seconds) képfrekvencia értékkel rögzítettük. A felvételeket automatizált (EthoVision XT)<sup>354</sup>, illetve manuális (Solomon Coder)<sup>355</sup> követő szoftverrel elemeztük. Elsődleges kimeneti változóink a világos zónában töltött idő és úszási sebesség, valamint a zónák közti átlépések száma voltak. A szkototaxis, thigmotaxis és geotaxis összefüggéseit vizsgáló kísérletekben, valamint a farmakológiai validáció során, mértük továbbá a kompartment szélein (thigmotaxis), azon belül pedig a szélek felszíni részén (geotaxis) töltött időt is. A szkotofóbia (sötét elkerülés) vagy szkototaxis (világos preferencia) jellemzésére minden esetben az ún. elkerülési index változót alkalmaztuk, ami a sötét zónában és a világos zónában töltött relatív idők különbségeként állt elő. Következésképp -1 értéket mutató elkerülési index azt jelzi, ha az állat idejének 100%-át a világosban tölti, míg a +1 érték 100% sötét preferenciát jelez.

$$\frac{\text{sötét zónában töltött idő}}{\text{teljes idő}} - \frac{\text{világos zónában töltött idő}}{\text{teljes idő}} = -1 \leq \text{elkerülés index} \leq +1$$

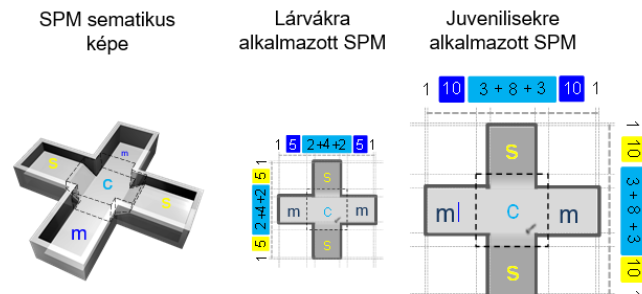
#### 4.4.2. Nyílt-tér teszt (OT)

A nyílt tér (*open tank*, a továbbiakban OT) teszt a zebradániók lokomotoros aktivitásának és szorongás-asszociált thigmotaxis viselkedésének vizsgálatára alkalmas teszt. A tesztben látott viselkedés valószínűleg az apparátus központi zónájának kitettsége okozta averzió és az állatok újdonsághelyzetben fellépő explorációs motiváció közti csereviszonyon alapszik. Apparátusnak standard 24 részes sejtenyésző tálak kompartmentjeit használtuk (átmérő=15.6 mm). A kezelés, kimosás és viselkedésteszt részek, az apparátust kivéve, az LDT-nél leírtakkal megegyeznek. A thigmotaxis jellemzésére minden esetben az elkerülési index változót alkalmaztuk, ami a központi, illetve a perifériás zónában töltött relatív idő különbségeként állt elő. Ez alapján a -1 elkerülési index érték azt jelzi, ha az állat idejének 100%-át a centrumban tölti, míg a +1-es érték teljes periféria preferenciát mutat.

$$\frac{\text{periférián töltött idő}}{\text{teljes idő}} - \frac{\text{centrumban töltött idő}}{\text{teljes idő}} = -1 \leq \text{elkerülési index} \leq +1$$

#### 4.4.3. Úszó keresztpalló teszt (SPM)

Az úszó keresztpalló (*swimming plus-maze*, a továbbiakban SPM) tesztet a nem vizuális ingerek által irányított, újdonsághelyzet által kiváltott szorongás-asszociált viselkedés vizsgálatára fejlesztettük és alkalmaztuk. A tesztben látott viselkedés valószínűleg a felnőtt zebradánióban ismert és a „novel tank



**4. ábra:** Az úszó keresztpalló apparátus sematikus képe (balra) és dimenziói (középen és jobbra). A lárvaakra alkalmazott apparátus hossza minden dimenzióban 2x1(fal) + 2x5(kar) + 2x2(rámpa) + 4 mm(centrum), míg a juveniliseknél ez 2x1(fal) + 2x10(kar) + 2x3(rámpa) + 8 mm(centrum). A mély karok esetén rámpa nincs, azonban az elemzés során centrumnak számítottunk az annak megfelelő térrészt.

diving” tesztel mérhető felszín elkerülés, azaz geotaxis, illetve az újdonsághelyzet által kiváltott explorációs motiváció közti csereviszonyon alapul. Az kereszt alakú apparátus 2 + 2 egymással szemben lévő, különböző mélységű karból és egy azokat összekötő centrum zónából áll. A digitálisan megtervezett apparátusokat egy Stratasys Object30 3D

nyomtatóval készítettük PolyJet gyanta felhasználásával. A lárvák és juvenilis állatok tesztelésére két, különböző paraméterekkel rendelkező, azok méretéhez igazodó apparátust terveztünk. Fontos megjegyezni, hogy bár a centrum és a mély karok megegyező mélységűek, az állatok jelen munkában ismertetett explorációs mintázata arra utal, hogy az állatok különbséget tesznek azok között. Megjegyzendő továbbá, hogy a reprezentatív videók alapján, a sekély karok nem jelentenek az állatok számára fizikailag nehezen megléphető akadályt. A kezelés, kimosás és viselkedésteszt részek, az apparátust, illetve a rövidebb, 5 perces tesztelést kivéve, az LDT-nél leírtakkal megegyeznek. A felszínelkerülés jellemzésére minden esetben az elkerülési index változót alkalmaztuk, ami a sekély-, illetve a mélykarokban töltött relatív idő különbségeként állt elő. Ez alapján a -1 elkerülési index érték azt jelzi, ha az állat idejének 100%-át a sekélyebb karban tölti, míg a +1-es érték teljes mélykari preferenciát mutat.

$$\frac{\text{sekély karban töltött idő}}{\text{teljes idő}} - \frac{\text{mély karban töltött idő}}{\text{teljes idő}} = -1 \leq \text{elkerülés index} \leq +1$$

#### 4.4.4. Szociális preferencia teszt (SP)

A szociális preferencia (*social preference*, SP) tesztet<sup>261</sup> a vizuális ingerek által vezérelt szociális érdeklődés, illetve szociális szorongás vizsgálatára alkalmaztuk. A tesztben látott viselkedést a zebadániók nagyjából 3 hetes kora körül megjelenő, első sorban vizuális szignálok által kiváltott szociális érdeklődése irányítja. A tesztapparátus egy U-alakú platform (40 x 32 mm), aminek két szárában (kar) egy-egy üveggel elválasztott, kizárólag vizuális kommunikációt engedő térrész kap helyet. A digitálisan megtervezett apparátusokat egy Stratasys Object30 3D nyomtatóval készítettük PolyJet gyanta és üveg felhasználásával. A kezelés és kimosás részek az LDT-nél leírtakkal megegyeznek. A teszt az eredeti protokoll alapján, egy 15 perces habituációs és egy 15 perces szociális szakaszból áll<sup>261</sup>. A habituációs szakaszban a megfigyelt egyed szabadon felfedezheti az apparátust, majd a szociális szakaszban az egyik, előzetesen random kijelölt, elválasztott térrészbe egy fajtársat helyezünk. A szociális aktivitás jellemzésére minden esetben a szociális index és a  $\Delta$ preferencia változókat alkalmaztuk. A szociális index a szociális-, illetve az üres karokban

töltött relatív idő különbségeként állt elő. Ez alapján a -1 elkerülési index érték azt jelzi, ha az állat idejének 100%-át a fajtárs jelenlétében tölti, míg a +1-es érték teljes szociális averziót mutat.

$$\frac{\text{szociális karban töltött idő}}{\text{teljes idő}} - \frac{\text{üres karban töltött idő}}{\text{teljes idő}} = -1 \leq \text{szociális index} \leq +1$$

A  $\Delta$ preferencia az aktív szociális érdeklődést hivatott szemléltetni. A változó azt mutatja meg, mennyit változik egy adott kompartmentben töltött idő a szociális szakaszban a habituációs szakaszban tapasztalathoz képest, a szerint, hogy a kompartment üresen marad vagy fajtársat helyezünk el benne.

#### 4.4.5. Szenzori-motoros válaszkészség teszt (SMR)

A szenzori-motoros válaszkészség (*sensory-motor response*, a továbbiakban SMR) az újdonsághelyzet által kiváltott éberség vizsgálatára alkalmaztuk. A tesztben látott lokomotoros viselkedésből a különböző vizuális ingerekre, illetve azok változásaira érzékeny válaszkészséget mérjük, amiből az egyedek éberségére következtetünk. Zebradánióknak adott időközönként gyorsuló ingert prezentálva, az egyedek mozgásukat a stimulus sebességéhez igazítják. Egy éberebb egyed gyorsabban reagál a mozgásváltozásra, illetve már kisebb sebességnél válaszol az ingerre<sup>297</sup>. Tesztapparátusnak standard 6-részes sejttenyésztő tálakat alkalmaztunk (átmérő: 34.8 mm). A megvilágítást és a vizuális ingert egy az apparátusok alá helyezett táblagépről biztosítottuk. A teszt egy alapi és egy újdonsághelyzet által befolyásolt szakaszból állt. Az alapi szakaszt egy 20 perces habituációs periódus előzte meg, ami irodalmi adatok alapján elegendő az állatok áthelyezése és a tesztapparátus újdonsága által kiváltott éberségi válasz elmosódásához<sup>297</sup>. Az újdonsághelyzet hatásának méréséhez, a második szakaszban az állatokat egy az előzővel identikus, másik apparátusba helyeztük. A válaszkészség méréséhez mindkét szakaszban egy fekete körcikkelyt vetítettünk ki az állatoknak, ami 5 percig mozdulatlan maradt, majd 5x2 percig körözött, 2 percenként 2x gyorsasággal (0.5-8 rpm-es tartomány). A cikkely kezdeti pozíciója és mozgásának körönkénti iránya előzetesen randomizált volt. Elsődleges kimeneti változóink az aktív epizódok száma, az állatok forgási sebessége és teljes forgási szöge,



valamint a cikkelytől való távolság voltak. Az aktív epizódok számával az állatok lokomotoros aktivitását mértük. Aktív epizódnak számított minden 2 olyan képkocka, ahol 1 pixelnél nagyobb változást detektáltunk. Videók kézi kiértékelése alapján, ez a határérték elég érzékeny hogy a legkisebb szabad szemmel érzékelhető mozgást már detektálja. A zebraadániók forgási sebességét és átlagos forgási szögét, mint viselkedési stressz-markereket alkalmaztuk, a stimulus averzivitásának meghatározására. A cikkelytől való távolságot annak meghatározására alkalmaztuk, hogy a tesztben látott megváltozott lokomóció ténylegesen a cikkely vizsgálatára specifikus és nem csak valamely általános menekülési reflex részeként áll elő.

#### **4.5. Nagy teljesítményű folyadékkromatográfia-tandem tömegspektrometria (HPLC/MS/MS)**

A központi idegrendszeri szerotonin (5-HT), dopamin (DA), noradrenalin (NA), valamint 5-hidroxi-indolecetsav (5-HIAA) teljes-agyi koncentrációjának meghatározására HPLC/MS/MS módszert alkalmaztunk.

##### **4.5.1. Minták előkészítése**

A viselkedéstesztek végeztével terminált zebraadániókat  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tartottuk a vizsgálatig. Az egyedek testét és szemét manuálisan távolítottuk el, jégen tartott petricsészékben, majd azok kis tömege miatt 2 (8. kísérlet), illetve 3 (9. kísérlet), azonos kísérleti csoportba tartozó, véletlenszerűen választott szövetmintát vontunk össze egy mérési mintába. A minták kezelésére használt Eppendorf csövek, illetve az összevont minták tömegét egy szemi-mikro analitikai mérleggel (Precisa EP 225SM-DR) határoztuk meg. A mintákat  $50\text{ }\mu\text{l}$   $10\text{ mM}$ -os ammónium-formiát oldatba vittük,  $0.1\%$  hangyasav és  $5\%$  metanol hozzáadásával, ultrahangos szonotróddal homogenizáltuk, majd egy centrifugálást követően a fehérjementes felülúszót leválasztottuk az analízishez.

##### **4.5.2. Nagy teljesítményű folyadékkromatográfia**

Az anyagok töltés-szerinti elválasztásához egy nagynyomású gradiens pumpából (Perkin Elmer series 200), egy automata mintaadagolóból, egy gázmentesítőtől, és egy termosztáttól álló HPLC készüléket használtunk. A készülékben egy 3 µm-es oszlopot (Phenomenex Luna Omega Polar C18 50x3 mm) használtunk metanolos gradiens eluenssel ('A' mozgófázis) és 0.1%-os hangyasav eluenssel ('B' mozgófázis). A gradiens elúciós program a következő szerint alakult: 0-0.8 perc: 3% 'A'; 1.3-1.8 perc: 80% 'A'; 2-3 perc: 3% 'A'. Az egyszeri injektálási térfogat 10 µl, az áramlási sebesség 50 µl/perc volt.

#### **4.5.3. Tandem tömegspektrometria**

A töltés szerinti folyadékkromatográfiás elválasztás után tömegspektrometriát végeztünk. A folyamat során a vizsgált molekulákat ionizáljuk, majd elektromos erőterben felgyorsítjuk. Az erőterben való mozgásuk pályáját és sebességét első sorban tömegük és töltésük befolyásolja, így lehetőségünk nyílik azok tömeg/töltés (a továbbiakban  $m/z$ ) értékének meghatározására és e szerint való szétválasztására. A tandem tömegspektrometriát triple quadrupole tömegspektrométerrel végeztük (Applied Biosystems MDS SCIEX 4000 Q TRAP), pozitív, többszörös reakció megfigyeléses mérési üzemmódban. Ez a módszer a jelenleg elérhető legjobb felbontást és legnagyobb fokú specifikusságot kínálja, annak köszönhetően, hogy a két, elektromos erőteret generáló quadrupol analizátor közé egy nitrogéngázt tartalmazó ütközési cella is be van iktatva. Ebben a cellában az ionizált molekulák irányított fragmentációja zajlik olyan termékekre (leányionokra), amelyek az eredeti molekulát (anyaionokat) ujjlenyomat szerűen jellemzik, azok moláris tömegénél is specifikusabban. A detektorba beérkező ionok abszolút mennyisége arányos a mintában lévő vizsgálni kívánt molekula anyagmennyiségével, így az eljárás végén az egy tömegspektrummal jellemezhető.

#### **4.6. Immunhisztokémia és konfokális mikroszkópia**

Az előagyi (a továbbiakban telencephalon) szerotonerg projekciókat fagyasztva metszett szeleteken vizsgáltuk immunhisztokémiával és konfokális mikroszkópiával.

#### **4.6.1. Minták előkészítése**

A viselkedésvizsgálat után terminált állatokat 4% paraformaldehidet tartalmazó foszfát pufferes sóoldatban (*phosphate buffered saline*, PBS) fixáltuk egy éjszakán át. A fagyásvédelem miatt a teljes-testi mintákat 10, 20, majd 30% cukrot tartalmazó PBS oldatba dehidratáltuk 10-10 percen át. A mintákat Tissue-Tek OCT médiumba ágyztuk a következők szerint: Egy pasterur pipettáról levágtuk annak ballonját, majd azt a forrasztás mentén félbe vágtuk. Az így létrehozott fél-ballonokat körülbelül 1 mm vastagságban töltöttük fel a beágyazó médiummal figyelve hogy légbuborékok ne kerüljenek bele. Erre az ágyra helyeztük a teljes-test mintákat, majd folytattuk a médiummal való feltöltést. Az esetlegesen bekerülő légbuborékokat egy csipesszel kiemeltük, vagy arrébb sodortuk úgy, hogy azok ne kerülhessenek a minta metszési síkjába. A ballont ez után szárazjégre helyeztük, majd a néhány másodperc alatt megfagyott mintát  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tartottuk a metszésig. Egy ballonba 3 egyedet helyeztünk a fenti módszerrel.

#### **4.6.2. Fagyasztva metszés**

A mintákból  $20\ \mu\text{m}$  vastag frontális szeleteket metszettünk egy Microm HM505 kriosztáttal. A szeleteket zselatinnal bevont tárgylemezekre olvasztottuk, majd szobahőmérsékleten szárítottuk elszívó fülke alatt egy éjszakán át. Az immunhisztokémiai jelölésig a lemezeket  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tartottuk.

#### **4.6.3. Immunhisztokémia**

Az immunhisztokémiai jelöléshez a tárgylemezeket egy hidrofób, elfolyást gátló, 2mm vastag PAP tollal (Merck) rajzoltuk körbe. A jelölés során minden lépésben lemezenként  $400\ \mu\text{l}$  oldatot alkalmaztunk. Az elsődleges jelölés során egy  $3 \times 10$  perces PBS-es mosást követően, nyúlban termeltetett anti-5-HT antitestet (1:500, 20080, ImmunoStar) tartalmazó primer oldattal kezeltük a lemezeket szobahőmérsékleten, egy éjszakán át. A primer oldat oldószere PBS volt, az aspecifikus jelölődés blokkolására 0.5% borjú szérum albumint (A7906, Sigma-Aldrich, Magyarország), a szövet permeabilitásának növelésére 0.25%

Triton X-100-at (T8787, Sigma-Aldrich, Magyarország) alkalmaztunk. A másodlagos jelölés során egy 3x10 perces PBS-es mosást követően, kecskében termeltetett anti-nyúl Alexa Fluor 488 ellenanyagot (1:500, 111-545-003, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) tartalmazó szekunder oldattal kezeltük a lemezeket szobahőmérsékleten, 2,5 órán át. A sejtek jelöléséhez a sejtmagi DNS-t festő 4,6-diaminido-2-fenilindolt (a továbbiakban DAPI)(1:10000, D8417, Sigma-Aldrich, Hungary) tartalmazó oldattal kezeltük a lemezeket szobahőmérsékleten, 30 percen át. A lemezeket Mowiol4-88 (81381, Sigma-Aldrich, Hungary) fluorescens fedő médiummal fedtük, majd a mikroszkópos elemzésig fénytől elzártan, 4 °C-on tartottuk.

#### **4.6.4. Konfokális mikroszkópia**

Az elemzéshez használt képeket egy C2 konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal (Nikon Europe, Amsterdam, Hollandia) készítettük, 20x nagyítást (Plan Apo Vc, NA=0.75) biztosító lencsét (xy: 0.31µm/pixel) alkalmazva. A sejtmagokat festő DAPI jel gerjesztéséhez 405 nm hullámhosszúságú lézert (Coherent), az 5-HT megjelenítéséhez 488 nm hullámhosszúságú lézert (CVI Melles Griot) alkalmaztunk. A lézerintenzitás és pinhole paramétereket állandó értéken tartottuk a vizsgálat során.

#### **4.6.5. Analízis**

Az elkészült képeket az ImageJ szoftverrel<sup>356</sup> elemeztük. Az analízis során minden vizsgált agyterületen standard, 30x30 µm nagyságú tartományokat jelöltünk ki és értékeltünk. A képeket egyedileg processzáltuk úgy, hogy egy szomszédos, szerotonerg rostokat nem tartalmazó tartományban addig csökkentettük a képintenzitást, míg semmilyen jel nem volt detektálható. Az ehhez szükséges „szubtrakciós” értéket aztán alkalmaztuk a rostokat tartalmazó tartományban, majd binárisá konvertált képeken kiszámítottuk az így homogén jelként jelentkező immunoreaktivitás teljes képhez képesti százalékos arányát. Egy egyed immunoreaktivitás értéke a két agyféltekén mért értékek átlagaként ált elő.

#### 4.7. Kísérleti elrendezések

##### 4.7.1. korai védekező viselkedésrepertoár jellemzése, tesztek validálása (Kísérlet 1-4.)

Az első 4 kísérletben a zebradániók korai védekező viselkedésrepertoárját mérő tesztek validáltunk, kitérve azok környezeti és farmakológiai érzékenységére. Az 1. kísérlet során lárva korú (5-8 dpf) zebradániók elkerülési viselkedését vizsgáltuk az LDT és az OT tesztekben, különös tekintettel a tesztben alkalmazandó ideális korcsoport kiválasztására, és a tesztek különböző körülmények közötti alkalmazhatóságára a korábbi környezeti tapasztalat függvényében. A 2. kísérletben célunk volt az 1. kísérlet LDT és OT tesztjeiben megfigyelt, a kitett területek elkerülésével ellentétesen változó felszínelkerülési viselkedést mérhetővé tenni és farmakológiai eszközökkel validálni, mint szorongás-asszociált viselkedés, az általunk fejlesztett SPM tesztben. A 3. kísérletben az SPM teszt juvenilis korcsoporton való farmakológiai, a 4. kísérletben annak környezeti validációját végeztük el.

##### 1. kísérlet – lárvakorú zebradánió elkerülési viselkedésformáinak kifejeződése, tapasztalatfüggése és farmakológiai manipulációja

Az 1A kísérletben 5 dpf korú zebradániókat vetettünk alá az LDT vagy OT teszteknek, majd 8 dpf korban a tesztet megismételtük, egy kiegészítő, a tesztre előzetesen naiv 8 dpf korú kontrolcsoport beiktatásával. A mintaelemszámok az LDT-ben  $n=22$  (ismételt csoport) és  $n=14$  (naiv csoport) voltak, az OT-ben  $n=20$  (ismételt csoport) és  $n=9$  (naiv csoport) voltak.

Az 1B kísérletben 8 dpf korú zebradániókat vetettünk alá különböző tesztkombinációknak, LDT→OT vagy OT→LDT sorrendben. A második tesztelés alkalmával, teszt-naiv kontrolcsoportokat iktattunk be. A mintaelemszámok  $n=12$  (LDT→OT) és  $n=24$  (naiv), valamint  $n=12$  (OT→LDT) és  $n=18$  (naiv) voltak.

Az 1C és 1D kísérletekben különböző koncentrációjú buspiron oldatokkal kezeltük az állatokat (1C: 0, 6.25, 12.5, 25 mg/l; 1D: 0, 50, 100 mg/l) az LDT vagy az OT tesztek előtt. A mintaelemszámok az 1C kísérletben csoportonként  $n=16-21$  voltak, az 1D kísérletben csoportonként  $n=8-13$  voltak.

**2. kísérlet** – lárvakorú zebradánió felszínkerülési viselkedésének mérése és farmakológiai manipulációja

A kísérlet során 8 dpf korú zebradánió lárvákat vizsgáltunk. Az explorációs mintázat leírásához nem alkalmaztunk kezelést (2A kísérlet), míg a farmakológiai validáláshoz az állatokat a szorongásoldó buspironnal (0, 25, 50 és 100 mg/l)(2B kísérlet) és klórdiazepoxiddal (0, 0.1, 1 és 10 mg/l)(2C kísérlet), illetve a szorongáskeltő koffeinnel (0, 25, 50 és 100 mg/l)(2D kísérlet) kezeltük, majd viselkedésüket az SPM tesztben vizsgáltuk. A mintaelemszámok a n=8-10 (2A), n=15-25 (2B), illetve n=15-26 (2C) voltak.

**3. Kísérlet** – juvenilis korú zebradániók felszínkerülési viselkedésének mérése és farmakológiai manipulációja

A 3. kísérletben juvenilis 30 dpf korú zebradániókat kezeltünk buspiron lárvákon hatékonyan bizonyuló koncentrációjával, majd viselkedésüket az SPM tesztben vizsgáltuk. Mivel a juvenilis egyedek bőrének átteresztőképessége eltér a lárvákétól<sup>357</sup>, beiktattunk egy csoportot, amelynél az egyedeket kezelő oldatukkal együtt helyeztük a tesztbe, ezzel hosszabb inkubációs periódust (~16 perc) biztosítva számukra. A mintaelemszámok n=11-14 voltak.

**4. Kísérlet** – juvenilis korú zebradániók felszínkerülését befolyásoló tényezők vizsgálata

A 4A kísérletben a fényintenzitás, mint a környezet averzivitását befolyásoló tényező szerepét vizsgáltuk a felszínkerülésre az SPM tesztben 30 dpf állatokon. 3 különböző fényintenzitást vizsgáltunk, a mintaelemszámok n=16 volt csoportonként.

A 4B kísérletben a vizuális ingerek szerepét vizsgáltuk az SPM tesztben mutatott felszínkerülésre 10-, illetve 30 dpf állatokon. A kísérletben az állatok összesen 45 percig voltak az apparátusban, ahol 3x5 perc világosban és 2x5 perc sötétben való mintavételezést hajtottunk végre. A mintaelemszám n=24 (10 dpf) és n=20 (30 dpf) volt.

A 4C kísérletben az SPM teszt ismételhetőségét vizsgáltuk 30 dpf állatokon. Az első és második tesztet 1, illetve 24 óra különbséggel végeztünk, a második mintavételezésre további teszt-naiv kontrolcsoportokat beiktatva. A mintaelemszámok  $n=10$  voltak csoportonként.

#### **4.7.2. A viselkedési metamorfózis jellemzése (Kísérlet 5-6.)**

Az 5. és 6. kísérletekben a lárva és adult stádiumokban eltérő módon megjelenő viselkedésformák fejlődését, illetve a fejlődés környéki környezeti érzékenységet kívántuk megvizsgálni, ezzel egy potenciálisan kiemelkedő érzékenységu periódus után kutatva.

#### **5. kísérlet – A sötét/világos elkerülés kifejeződésének és tapasztalatfüggésének változása a fejlődés során**

A viselkedési metamorfózis vizsgálatához ugyan abból az ívásból származó, 8, 14 és 28 dpf korú, teszt-naiv zebradániókat vetettünk alá az LDT-nek, míg a tapasztalatfüggés vizsgálatához ugyanezeket az egyedeket 1 nappal később is alávetettük a tesznek, további teszt-naiv kontrolcsoportokat beiktatva. A két teszt között az állatokat a szociális izolációhoz is használt kádakban különítettük el az egyedi azonosíthatóság végett. A mintaelemszámok  $n=48$  (8 dpf),  $n=24$  (14 dpf) és  $n=23$  (28 dpf) voltak.

#### **6. Kísérlet – A szociális aktivitás megjelenése a fejlődés során**

A 6. kísérlet során azt vizsgáltuk, a zebradániók fejlődésének mely pontján jelenik meg aktív helyváltoztatással járó szociális érdeklődés. Mivel a szociális érdeklődés validálására farmakológiai eszköz nem áll rendelkezésre, a szociális aktivitás fejlődés során való megjelenése az alkalmazott U-alakú szociális preferencia teszt validációját is szolgálta. A viselkedési metamorfózis vizsgálatához ugyanabból az ívásból származó, 8, 14 és 28 dpf korú, teszt-naiv zebradániókat vetettünk alá az SP-nek. A mintaelemszámok  $n=28$  (8 dpf),  $n=23$  (14 dpf) és  $n=30$  (28 dpf) voltak.

### 4.7.3. A peri-metamorf környezeti hatások szerepe a védekező viselkedés és a szerotonerg rendszer kapcsolatára

A 7-13. kísérletekben a korábban azonosított érzékeny időszakban (a továbbiakban peri-metamorf) alkalmazott környezeti ingerek viselkedési és szerotonerg fenotípusra gyakorolt hatásait kívántuk azonosítani. A 7. kísérletben azt vizsgáltuk, hogy az akut (LDT teszt) vagy krónikus (szociális izoláció) peri-metamorf stressz befolyásolja-e a poszt-metamorf, juvenilis elkerülő viselkedést. A 8. kísérlettől kezdve a peri-metamorf izoláció hatásait vizsgáltuk a nyugalmi-és stresszindukált 5-HT szintekre, a teljes agy (8. kísérlet), illetve különböző előagyi területek szintjén (10. kísérlet), valamint azt, hogy ezek szelektíven megelőzhetőek-e az előzetes 5HT<sub>1A</sub> receptor agonista buspiron kezeléssel (9-10 kísérlet). A buspiron alkalmazása mellett szól, hogy 1) elsősorban 5HT<sub>1A</sub> receptorokon hat<sup>12</sup>, 2) amely receptorok a zebradánió raphe magjában, 5-HT jelátvitelt csökkentő autoreceptor formájában vannak jelen<sup>235</sup>. 3) A raphe dorzális régiója az egyetlen szerotonerg magcsoport, ami a zebradániók sötét/világos elkerülés szabályozásáért felelős előagyi régiójába, a dorzo-mediális palliumba küld projekciókat. Ezen felül 4) a buspiron a zebradánió 5HT<sub>1A</sub> receptoraihoz 4-szer, illetve 8-szor nagyobb affinitással köt, mint a patkányban, illetve az emberben kifejeződő ortológjaihoz<sup>334</sup>. Ezen előnyök ellenére, a buspiron az emlős idegrendszerben befolyásolja a DA és NA szinteket is<sup>358-360</sup>, valamint hat az 5-HT kicserélődésre<sup>361,362</sup>, így fontos volt vizsgálni az ezeket jellemző paramétereket is. Ezen felül vizsgáltuk, hogy ugyan ez a kezelés képes-e az izoláció okozta viselkedési hatások megelőzésére is (10-13. kísérlet).

#### 7. kísérlet – A peri-metamorf környezeti tapasztalat, mint krónikus szociális izoláció és/vagy akut kihívás, szerepe a juvenilis elkerülési viselkedés formálásában

A kísérletben 14 dpf korú zebradániókat 2 héten át izoláltunk és/vagy egy alkalommal LDT-nek vetettünk alá, majd sötételkerülésüket 29 naposan vizsgáltuk. A mintaelemszámok a szociálisan tartott csoportokban n=25 és n=21 (naiv és teszt-tapasztalt), az izolált csoportokban 15 és 21 (naiv és teszt-tapasztalt) voltak.



- 8. kísérlet** – A krónikus peri-metamorf szociális izoláció szerepe a juvenilis-korú állatok nyugalmi-és kihívás-indukált 5-HT szintjének formálásában

A kísérletben HPLC-MS-MS módszerrel mértük a teljes agyi 5-HT szinteket szociálisan tartott, illetve izolált juvenilis 30 dpf korú zebradániókból. Az alapi, illetve kihívás-indukált szintek mérésére saját kádban terminált, illetve közvetlenül, valamint 1,5 órával LDT kihívás után terminált állatok agyát vizsgáltuk. Az alkalmazott egyedszámok a szociálisan tartott csoportokban n=22, 18 és 24 (alapi, közvetlen és 1,5 órával későbbi mintavétel), az izolált csoportokban egységesen n=16 voltak. A mérési mintákat (összesített szövetminták) 2 véletlenszerűen választott egyedből egyesítettük.

- 9. kísérlet** - A krónikus peri-metamorf szociális izoláció hatása a juvenilis-korú állatok kihívás-indukált 5-HT, 5-HIAA, DA és NA válaszára és annak farmakológiai manipulációja

A kísérletben HPLC-MS-MS módszerrel mértük a teljes agyi 5-HT, 5-HIAA, DA és NA szinteket szociálisan tartott és izolált, juvenilis 30 dpf korú zebradániókból LDT után közvetlenül. A buspiron által befolyásolt szintek méréséhez az egyedek egy részét a viselkedésteszt előtt kezeltük a szorongásoldóval. Az alkalmazott egyedszámok a szociálisan tartott csoportokban n=25 és 28 (vivőanyag és buspiron kezelt), az izolált csoportokban egységesen n=28 voltak. A mérési mintákat (összesített szövetminták) 3 véletlenszerűen választott egyedből egyesítettük.

- 10. kísérlet** – A krónikus peri-metamorf szociális izoláció viselkedési és előagyi szerotonerg hatásainak kapcsolata

A kísérletben szociálisan tartott és izolált juvenilis 30 dpf korú állatokat vetettünk alá az LDT tesztnek, majd 1,5 órával később termináltuk azokat a telencephalikus 5-HT immunhisztokémiai vizsgálatához. Az izoláció viselkedési és szerotonerg hatása közti kapcsolat feltárásához az LDT előtt a szerotonerg jelátvitelt gátló buspiron kezelést alkalmaztunk. Összesen 4 előagyi régiót vizsgáltunk: a dorzális és ventrális pallium

commisura anteriortól rostrálisan fekvő területeit, így az anterior dorzális palliumot (*anterior recess of the dorsal pallium*, DPa) és anterior ventrális palliumot (*anterior recess of the ventral pallium*, VPa), valamint az attól kaudálisan fekvő, kaudális dorzális palliumot (*caudal recess of the dorsal pallium*, DPc) és oldalsó előagyi köteget (*lateral forebrain bundle*, LFB). A mintaelemszámok a szociálisan tartott csoportokban n=31 és n=22 (vivőanyag és bupiron kezelt), az izolált csoportokban n=14 és n=16 (vivőanyag és bupiron kezelt) voltak.

**11. kísérlet** - A krónikus peri-metamorf szociális izoláció szerepe a juvenilis-korú állatok nyugalmi-és kihívás-indukált éberségének formálásában

A 11. kísérletben a peri-metamorf szociális izoláció szerepét vizsgáltuk a poszt-metamorf alapi, és kihívás-indukált éberségre. Ehhez szociálisan tartott és izolált, juvenilis 30 dpf korú állatokat vetettünk alá a SMR tesztnek habituációt követően, illetve újdonsághelyzetben. Az izoláció éberséget befolyásoló hatásainak potenciális szerotonerg hátterét a habituációs és újdonsághelyzet közé beiktatott bupiron előkezeléssel vizsgáltuk. A mintaelemszámok n=13 és n=14 (vivőanyag és bupiron kezelt) mind a szociálisan tartott, mind az izolált csoportokban.

**12. kísérlet** - A krónikus peri-metamorf szociális izoláció felszínelkerülésre gyakorolt hatásai és azok szerotonerg háttere

A 12. kísérletben a peri-metamorf szociális izoláció felszínelkerülésére gyakorolt hatását vizsgáltuk. A kísérletben szociálisan tartott és izolált, juvenilis, 30 dpf korú állatokat vetettünk alá az SPM tesztnek. Az izoláció viselkedési és szerotonerg hatása közti kapcsolat feltárásához az SPM előtt a szerotonerg jelátvitelt gátló bupiron kezelést alkalmaztunk. A mintaelemszámok a szociálisan tartott csoportokban n=28 és n=24 (vivőanyag és bupiron kezelt), az izolált csoportokban n=17 és n=16 voltak (vivőanyag és bupiron kezelt).

**13. kísérlet** - A krónikus peri-metamorf szociális izoláció szociális aktivitásra gyakorolt hatásai és azok szerotonerg háttere

A 13. kísérletben a peri-metamorf szociális izoláció szociális aktivitásra gyakorolt hatását vizsgáltuk. A kísérletben szociálisan tartott és izolált, juvenilis, 30 dpf korú állatokat vetettünk alá az SP tesztnek. Az izoláció viselkedési és szerotonerg hatása közti kapcsolat feltárásához az SP előtt a szerotonerg jelátvitelt gátló buspiron kezelést alkalmaztunk. A mintaelemszámok a szociálisan tartott csoportokban  $n=16$  és  $n=25$  (vivőanyag és buspiron kezelt), az izolált csoportokban egységesen  $n=14$  voltak.

#### 4.8. Adatelemzés

Az adatokat átlag  $\pm$  standard hiba formában ábrázoltuk. A statisztikai elemzést R statisztikai környezetben végeztük<sup>363</sup>. A környezeti tapasztalat és farmakológiai kezelés viselkedésre gyakorolt hatásának vizsgálatához lineáris kevert modelleket alkalmaztunk<sup>364</sup> az lme4 csomag<sup>365</sup> használatával. A fenti tényezők neurotranszmitter koncentrációra és immunoreaktivitásra gyakorolt hatásainak vizsgálatához egyszerű lineáris modelleket alkalmaztunk. A környezeti tapasztalat faktor szintjén a „szociális tartás” és „izolált tartás” egyaránt referenciaszintek voltak, míg a kezelés faktor szintjén kizárólag a „vivőanyag kezelés”-t tekintettük referenciaszintnek. Mivel a nagy-áteresztőképességű viselkedési mintavételezésnek köszönhetően egyszerre nagy számú állattal dolgozunk, lehetőségünk volt az állatok pozíciójából (mely kísérleti apparátusban úszik) és sorrendjéből (a kísérlet mely körében kerül tesztbe) származó varianciát leírni, ezen változók random faktorként való modellbe építésével. Az ilyen, referenciaszinttel dolgozó lineáris kevert és egyszerű lineáris modellek kevesebb összehasonlítást végeznek, így arról adnak információt hogy 1) faktor 1 referenciaszintjén belül, faktor 2 szintjei milyen kapcsolatban állnak egymással, illetve hogy 2) ez a kapcsolat megmarad-e faktor 1 másik, nem-referenciaszintjén is (potenciális interakció). Ismételt mintavételezés esetén az állatok egyedi azonosítóját mint magyarázó változót is beleépítettük modellünkbe. A p-értékeket a kevert modellek t-értékeiből számoltuk az lmerTest csomag felhasználásával<sup>366</sup> A nullhipotézist  $p<0.05$  esetén vetettük el.

## 5. Eredmények

### 5.1. Korai védekező viselkedésrepertoár jellemzése, tesztek validálása (Kísérlet 1-4.)

#### 1. kísérlet – lárvakorú zebra-dánió elkerülési viselkedésformáinak kifejeződése, tapasztalatfüggése és farmakológiai manipulációja

Az 1. kísérlet eredményeit az 5. ábra, statisztikai adatait a 2. táblázat tartalmazza.

Az 1A kísérletben vizsgáltuk az OT és LDT tesztek ismételhetségét és az elkerülő viselkedés korfüggését. Az OT tesztben a kornak nem, míg a tesztismétlésnek szignifikáns, a centrum aktivitást növelő, tehát elkerülés csökkentő hatása volt (5a ábra), míg az LDT tesztben egyik tényező sem befolyásolta a viselkedést (5e ábra).

Az 1B kísérletben a tesztek összevonhatóságát vizsgáltuk, vagyis azt, hogy az előzetes, másik típusú tesztben való részvétel, mint stresszor, befolyásolja-e a vizsgált teszt kimenetelét. Az OT teszt előtti LDT teszt szignifikánsan csökkentette a centrum explorációt, erősítette az elkerülést (5b ábra), míg az előzetes OT tesztelés nem hatott a sötételkerülésre (5f ábra).

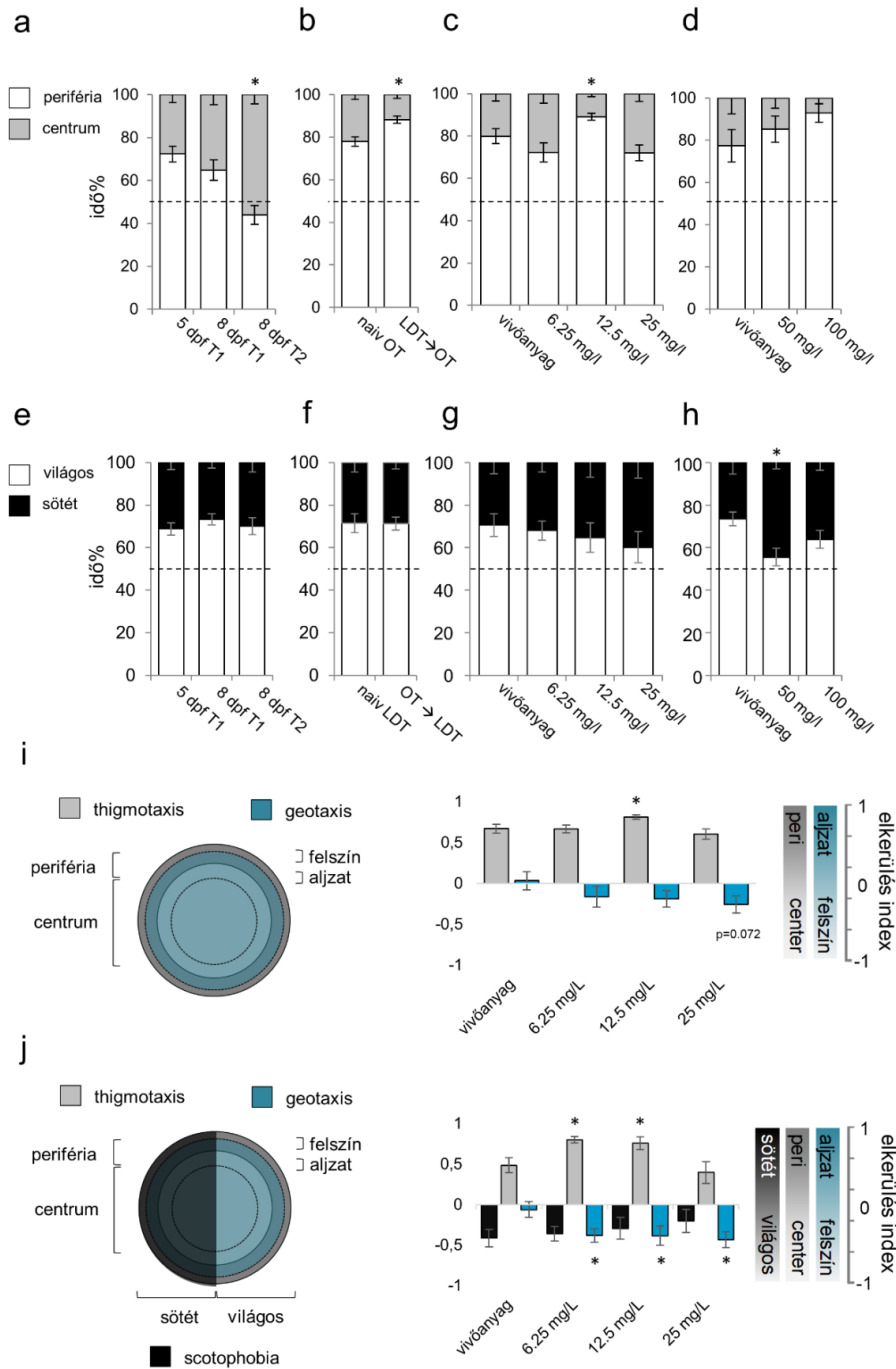
Az 1C és 1D kísérletben a fenti tesztekben mutatott viselkedés klinikai szorongásoldó buspironra való érzékenységet vizsgáltuk. Az OT tesztben egyedül a 12.5 mg/l-es koncentráció fejtett ki hatást az elkerülési viselkedésre, fokozva annak mértékét (5c ábra), míg az LDT tesztben az 50 mg/l-es koncentráció a sötételkerülő viselkedés mértékét csökkentette (5h ábra).

Az OT teszt, pontosabban a tesztben mért centrum-elkerülési viselkedés (thigmotaxis) a szorongásoldó ágensre adott válasza az emlős adatokkal ellentétes irányú volt. Azonban megfigyeltük, hogy egyes buspironnal kezelt állatok a vízfelszínhez közelebb úsznak, ami zavarhatja a mérést, mivel a csökkent szorongással asszociált felszíni aktivitást tisztán perifériának kódoljuk. Utóbbi számszerűsítése miatt újraelemeztük a teszteket, felszíni és aljzati területekre bontva a perifériás részt. Látható, hogy a kezelt állatok felszínaktivitása mindkét teszt esetén a thigmotaxissal ellentétes irányban változik kezelés hatására (5i és 5j

ábrák), vagyis a szélsőségesebb centrumelkerülés egyes esetekben összekapcsolható csökkent felszínkerüléssel. Ezek alapján az OT és az LDT tesztekben mért thigmotaxis nem alkalmazható biztonsággal szorongás-asszociált viselkedés vizsgálatára, ellentétben a környezetre kevésbé, szorongásoldóra jobban érzékeny sötét/világos elkerüléssel. Ezen felül, a tesztekben mért felszíni aktivitás, a farmakológiai kezelésre érzékeny és a tesztekben konzisztensen megjelenő változó lehet.

**2. táblázat: az 1. kísérlet statisztikai adatai.** (SE: standard hiba, viv: vivóanyag)

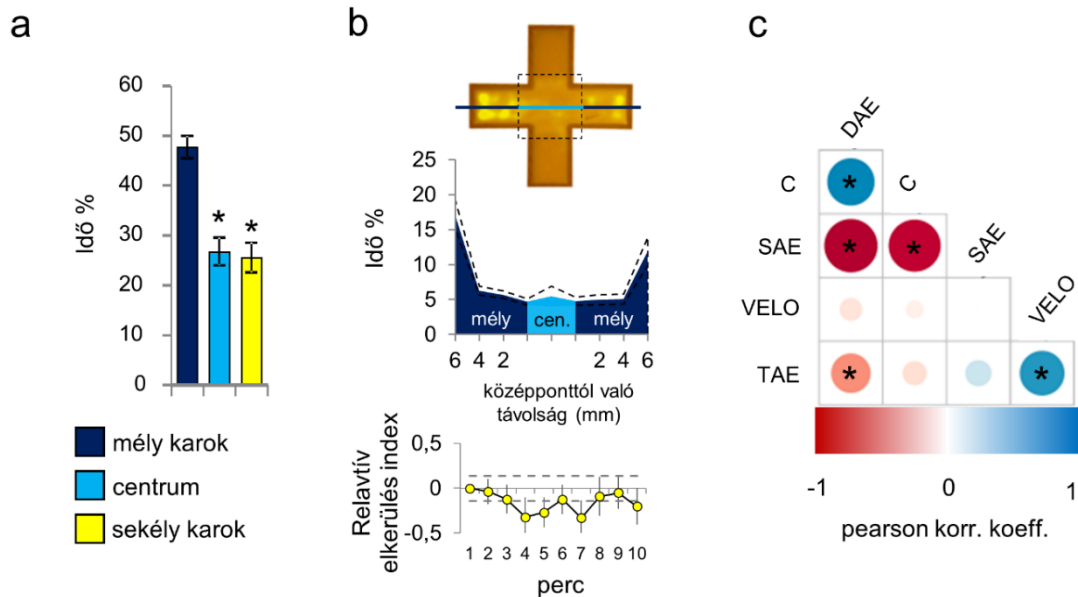
Kísérlet	változó	Teszt statisztika	referencia szint	Kontraszt	becslés	SE	n	t-érték	p-érték
1A	OT thigmotaxis		5 dpf (T1)	8 dpf (T1)	0,143	0,128	24 vs 14	1,116	0,270
				8 dpf (T2)	0,534	0,010	24 vs 22	5,354	2,27e-06*
	LDT szkototaxis		5 dpf (T1)	8 dpf (T1)	0,075	5,939	23 vs 9	0,013	0,990
				8 dpf (T2)	1,451	5,326	23 vs 20	0,272	0,786
1B	OT thigmotaxis		naiv	LDT->OT	0,217	0,071	24 vs 12	3,053	0,003*
				OT->LDT	-0,006	0,137	18 vs 12	0,041	0,967
	LDT szkototaxis		viv	6.25 mg	0,003	0,067	18 vs 18	0,051	0,959
				12.5 mg	-0,142	0,067	18 vs 18	-2,106	0,039*
1C	OT thigmotaxis	lineáris modell	viv	25 mg	0,066	0,069	18 vs 16	0,949	0,346
				6.25 mg	0,195	0,154	18 vs 18	1,266	0,210
	OT geotaxis		viv	12.5 mg	0,223	0,154	18 vs 18	1,446	0,153
				25 mg	0,290	0,159	18 vs 16	1,826	0,072*
	LDT thigmotaxis		viv	6.25 mg	-0,315	0,130	21 vs 21	-2,421	0,018*
				12.5 mg	-0,273	0,135	21 vs 18	-2,014	0,047*
				25 mg	0,089	0,130	21 vs 21	0,683	0,497
				6.25 mg	0,317	0,137	21 vs 21	2,318	0,023*
	LDT geotaxis		viv	12.5 mg	0,320	0,142	21 vs 18	2,247	0,027
				25 mg	0,370	0,137	21 vs 21	2,703	0,008*
				6.25 mg	0,052	0,166	21 vs 21	0,312	0,756
				12.5 mg	0,118	0,173	21 vs 18	0,681	0,498
LDT szkototaxis	viv	25 mg	0,210	0,166	21 vs 21	1,265	0,210		
		50 mg	-0,157	0,159	11 vs 13	-0,990	0,330		
		100 mg	-0,298	0,180	11 vs 8	-1,657	0,108		
		50 mg	0,360	0,160	12 vs 13	2,259	0,031		
1D	OT thigmotaxis		viv	100 mg	0,192	0,166	12 vs 11	1,152	0,257
				LDT geotaxis	100 mg	0,192	0,166	12 vs 11	1,152



**5. ábra:** **a-d)** zebradánió lárvák thigmotaktikus viselkedése az OT testben. Az előzetes környezeti tapasztalat (a, b), valamint a buspiron (c, d) hatása. **e-h)** zebradánió lárvák sötét elkerülő viselkedése az LDT testben. Az előzetes környezeti tapasztalat (e, f), valamint a buspiron (g, h) hatása. **i, j)** Thigmotaxis, geotaxis és szkototaxis mérése az OT (i) és az LDT (j) tesztekben. \*: szignifikáns eltérés a vivőanyag kezelt csoporttól.

## 2. kísérlet – lárvakorú zebradánió felszínelkerülési viselkedésének mérése és farmakológiai manipulációja

A 2. kísérletben a korábban megfigyelt felszínelkerülést akartuk mérhetővé tenni az általunk fejlesztett SPM tesztben. A kísérletek eredményeit az 6. és 7. ábra, statisztikai adatait a 3. táblázat tartalmazza.



**6. ábra:** **a)** zebradánió lárvák viselkedése az SPM tesztben. **b)** Explorációs viselkedés nagyobb térbeli (fent: hőterkép, közepén: részletes eloszlás) és időbeli (lent) felbontásban. **c)** SPM változók összefüggései. Két változó közti korreláció a változók metszéspontjában látható. A körök mérete és színintenzitása a Pearson korrelációs koefficienssel arányos, a csillag szignifikáns korrelációt jelez. változók: DAE: mély/összes kari belépésszám, C: Elkerülési index, SAE: sekély/összes kari belépésszám, VELO: átlagsebesség, TAE: összes kari belépésszám.

A 2A kísérletben zebradánió lárvák viselkedését, illetve a viselkedési paramétereik közti összefüggéseket vizsgáltuk a tesztben. Látható, hogy a vivóanyag-kezelt állatok erős mélykari preferenciát mutatnak (6a ábra). A nagyobb térbeli felbontással készült elemzés (6b ábra alja), illetve az explorációs hőterkép megmutatja (6b ábra teteje), hogy a mélykari aktivitás leginkább a karok szélére összpontosul. A nagyobb időbeli felbontással készült elemzés (6c ábra) emellett rávilágít, hogy a fenti preferencia a teszt teljes ideje alatt fennmarad. Az egyes viselkedési változók közötti korrelációelemzés (6d ábra) erős összefüggést mutat az „elkerülés index” és a ”mély/összes kari belépés” változók között, míg mindkét előbbi kimenet negatív összefüggésben áll a „sekély kari belépési frekvenciával”. A

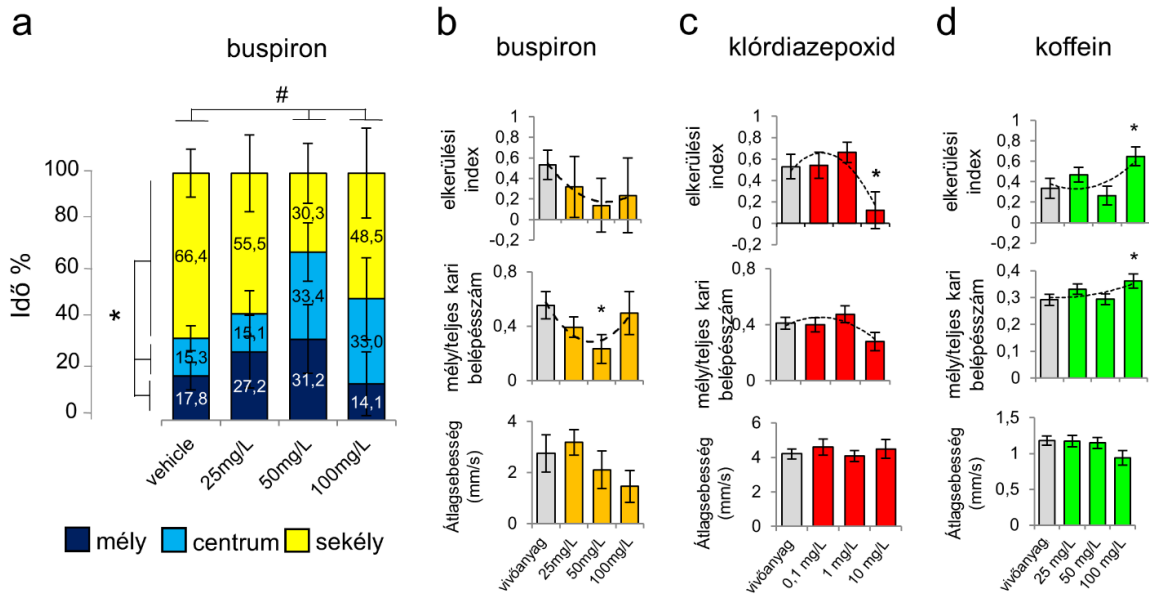
tesztben mutatott átlagos úszási sebesség egyedül az „összes kari belépéssel” áll pozitív kapcsolatban.

A 2B kísérletben zebra-dánió lárvák felszínelkerülő viselkedését és annak buspironra való érzékenységet vizsgáltuk az SPM tesztben (7a és 7b ábrák). A vivőanyag kezelt állatok továbbra is erős mélykari preferenciát mutattak. 50 mg/l buspiron csökkentette a mélykari aktivitást, valamint ahogy a szignifikáns interakciós hatások mutatják, a szorongásoldó kezelés részlegesen vagy teljesen elmosta a kontrolcsoportnál látott mintázatot. Bár a buspiron nem befolyásolta szignifikánsan az állatok elkerülési indexét, csökkentette azok „mély/összes kari belépésszámát”. Egyik alkalmazott dózis sem befolyásolta az egyedek lokomotoros aktivitását.

A 2C kísérletben zebra-dánió lárvák felszínelkerülését és annak CDP-re való érzékenységet vizsgáltuk az SPM tesztben (7c ábra). A vivőanyaggal kezelt állatok továbbra is erős mélykari preferenciát mutattak, ami csökkenthető volt 10 mg/l koncentrációjú CDP oldattal. A CDP csak marginálisan csökkentette a „mély/összes kari belépésszámot” és nem befolyásolta a lokomotoros aktivitást.

A 2D kísérletben zebra-dánió lárvák felszínelkerülését és annak koffeinre való érzékenységet vizsgáltuk az SPM tesztben (7d ábra). A vivőanyag kezelt állatok továbbra is erős mélykari preferenciát mutattak, ami tovább erősödött a legmagasabb koncentrációjú koffein oldat hatására. Ez a változás mind az „elkerülés index”-ben, mind a „mély/összes kari belépésszámban” megjelent. Mindemellett a 100 mg/l-es koncentrációjú koffein oldat marginálisan csökkentette az állatok úszási sebességét.





**7. ábra: a)** Buspiron kezelés hatása az SPM tesztben mutatott explorációs mintázatra \*: szignifikáns különbség a mély karban töltött időtől, #: szignifikáns zóna\*kezelés interakció. **b-d)** buspiron, klórdiazepoxid és koffein kezelések hatásai az elkerülést és lokomotoros aktivitást leíró származtatott változókra. \*: szignifikáns eltérés a vivőanyag kezelt csoporttól.

Elmondható tehát, hogy az SPM teszt alkalmas a zebra-dániók felszínkerülési viselkedésének kimutatására, amely viselkedés érzékeny minden alkalmazott, a humán szorongást befolyásoló ágensre, így a teszt farmakológiailag validált szorongás-tesztnek tekinthető.

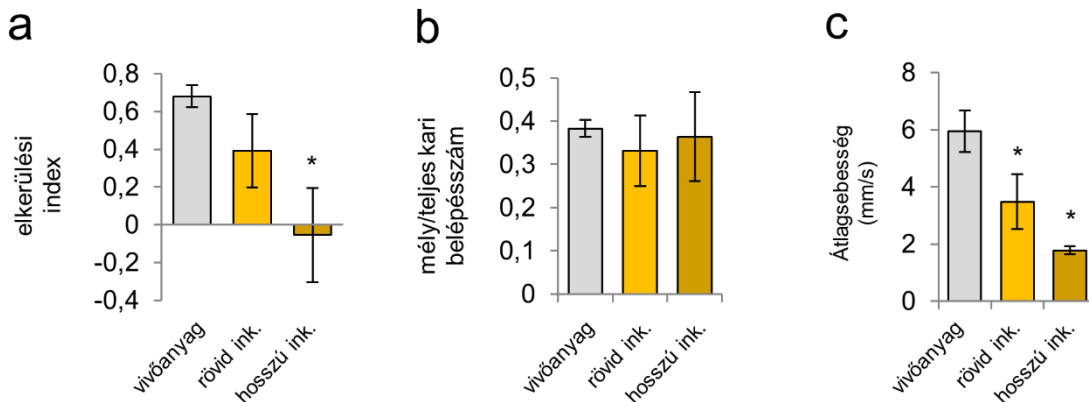
### 3. Táblázat: a 2. kísérlet statisztikai adatai. (SE: standard hiba)

Kísérlet	Változó	Teszt statisztika	Referencia szint	Kontraszt	Becslés	SE	n	t-érték	p-érték
2A	zónában töltött idő	ANOVA	mély	centrum	-20,96	3,83	26	-5,47	1,89e-06*
				sekély	-22,18			-5,79	6,42e-07*
			mély/viv	sekély/viv	-55,73	19,77	-2,82	0,009*	
				centrum/viv	-66,63	18,91	-3,52	0,002*	
2B	zónában töltött idő	ismételt mérés ANOVA	mély/viv	~ mély/25mg	35,88	23,21	8	1,546	0,126
				~ sekély/25mg					
			mély/viv	~ mély/50mg	58,72	23,6	8	2,49	0,015*
				~ sekély/50mg					
			centrum/viv	~ mély/100mg	13,10	23,59	10	0,556	0,580
				~ sekély/100mg					
centrum/viv	~ mély/25mg	29,67	22,72	1,306	0,196				

Kísérlet	Változó	Teszt statisztika	Referencia szint	Kontraszt	Becslés	SE	n	t-érték	p-érték
				mély/50mg ~ centrum /50mg	50,22	23,20		2,16	0,033*
				mély/100mg ~ centrum /100mg	50,22	23,20		2,164	0,033*
	elkerülés index				0,31	0,36		0,88	0,358
	mély/összes kari belépés			25 mg	-0,17	0,15	8 vs 10	-1,117	0,273
	Átlag-sebesség				0,69	0,89		0,77	0,448
	elkerülés index				0,42	0,37	8	1,12	0,182
	mély/összes kari belépés		viv	50 mg	-0,32	0,15	8 vs 10	-2,055	0,049*
	Átlag-sebesség				0,39	0,90		-0,43	0,670
	elkerülés index				0,25	0,38	8	0,68	0,500
	mély/összes kari belépés			100 mg	-0,05	0,16	8 vs 10	-0,293	0,772
	Átlag-sebesség				-1,11	0,92		-1,21	0,237
	elkerülés index				0,17	0,19	25	0,906	0,390
	mély/összes kari belépés			0.1 mg	-0,02	0,07	25 vs 15	-0,234	0,816
	Átlag-sebesség				0,28	0,53		0,525	0,612
2C	elkerülés index	lineáris kevert modell			0,01	0,15	25	0,098	0,922
	mély/összes kari belépés		viv	1 mg/	0,06	0,07	25 vs 15	0,842	0,402
	Átlag-sebesség				0,28	0,46		0,620	0,546
	elkerülés index				0,53	0,18	25	2,870	0,024*
	mély/összes kari belépés			10 mg	-0,14	0,07	25 vs 16	-1,922	0,059*
	Átlag-sebesség				0,46	0,52		0,887	0,391
	elkerülés index				-0,13	0,12	26	-1,016	0,313
	mély/összes kari belépés			25 mg	0,04	0,03	26 vs 17	1,383	0,171
	Átlag-sebesség				-0,004	0,11		-0,039	0,969
	elkerülés index				0,06	0,12	26	0,490	0,625
2D	mély/összes kari belépés		viv	50 mg	0,01	0,03	26 vs 19	0,459	0,648
	Átlag-sebesség				-0,03	0,11		-0,271	0,787
	elkerülés index				-0,32	0,13	26	-2,401	0,019*
	mély/összes kari belépés			100 mg	0,07	0,03	26 vs 15	2,308	0,024*
	Átlag-sebesség				-0,22	0,12		-1,862	0,066

### 3. Kísérlet – juvenilis korú zebradániók felszínkerülési viselkedésének mérése és farmakológiai manipulációja

A 3. kísérletben célunk az SPM teszt juvenilis zebradániókon való validálása volt, amihez azok felszínkerülését és annak buspironra való érzékenységét vizsgáltuk különböző inkubációs periódusok mellett. A kísérlet eredményeit az 8. ábra, statisztikai adatait a 4. táblázat tartalmazza.



**8. ábra: a-c)** buspiron kezelési típusok hatása juvenilis zebradániók viselkedésére az SPM tesztben. „rövid ink”: rövid kezelési csoport - 10 perc buspiron előkezelés, „hosszú ink.”: hosszú kezelési csoport – a teljes teszt alatt az oldatban maradtak. \*: szignifikáns eltérés a vivóanyag kezelt csoporttól.

A 30 dpf korú, vivóanyaggal kezelt állatok a lárvához hasonlóan erős mélykari preferenciát mutattak. Míg ezt a trendet a hosszabb inkubációs idővel adott buspiron csökkentette, addig az állatok lokomotoros aktivitására mindkét inkubációs protokoll hatással volt. Látható tehát, hogy az SPM teszt mind lárva, mind pedig juvenilis korú egyedek felszínkerülési viselkedésének vizsgálatára alkalmas eszköz.

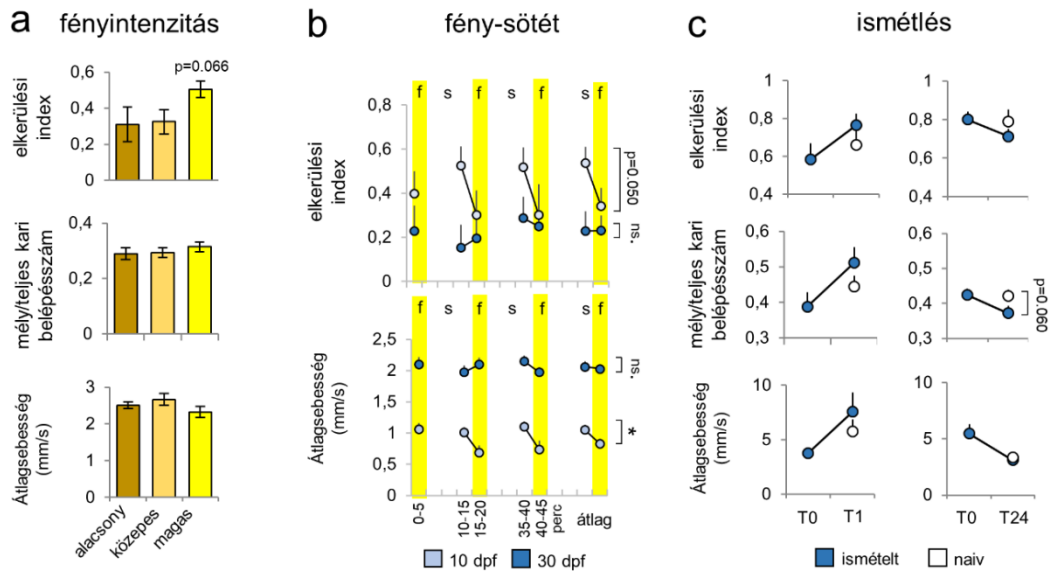
#### 4. Táblázat: a 3. kísérlet statisztikai adatai. (SE: standard hiba)

Kísérlet	változó	Teszt statisztika	referencia szint	Kontraszt	becslés	SE	n	t-érték	p-érték
3	elkerülés index	lineáris kevert modell	vivóanyag	rövid kezelés	0,29	0,25	14	1,172	0,250
	mély/összes kari belépés				-0,07	0,10	vs	-0,774	0,445
	Átlagsebesség				-2,42	0,98	11	-2,462	0,020*
	elkerülés index			hosszú kezelés	0,74	0,24	14	3,036	0,005*
	mély/összes kari belépés				-0,04	0,09	vs	-0,465	0,646
	Átlagsebesség				-3,92	0,94	12	-4,147	0,0003*

#### 4. Kísérlet – juvenilis korú zebradániók felszínelkerülését befolyásoló tényezők vizsgálata

A 4. kísérletben az SPM teszt kísérleti körülményekre való érzékenységét vizsgáltuk. A kísérlet eredményeit az 9. ábra, statisztikai adatait a 5. táblázat tartalmazza.

A 4A kísérletben a fényintenzitás szerepét vizsgáltuk a juvenilis állatok felszínelkerülésben (9a ábra). Referenciaszintnek a legalacsonyabb, a többi kísérletnél alapértelmezett fényintenzitást választottuk. Eredményeink szerint a fényintenzitás növelése nem befolyásolta a felszínelkerülést vagy a lokomotoros aktivitást.



**9. ábra:** **a)** Különböző fényintenzitás hatásai a juvenilis zebradániók (30 dpf) viselkedésére az SPM tesztben. **b)** a fény-sötét átmenet, illetve a vizuális ingerek szerepe lárva (10 dpf) és juvenilis (30 dpf) zebradániók viselkedésére az SPM tesztben. **c)** tesztismétlés hatása juvenilis zebradániók (30 dpf) viselkedésére az SPM tesztben.

A 4B kísérletben a vizuális ingerek szerepét vizsgáltuk a lárva és juvenilis állatok felszínelkerülésben (9b ábra). Míg a 10 napos lárvák a sötét-fény átmenetre reaktívnak bizonyultak, világosban csökkent elkerülést és alacsonyabb lokomotoros aktivitást mutattak, addig a 30 napos egyedek elkerülése és mozgása a környezeti változástól függetlenül stabil maradt. Tehát a juvenilis egyedeknél sem a vizuális ingerek hiánya, sem pedig a sötét-fény átmenet mint potenciálisan averzív inger nem befolyásolja az SPM által kiváltott viselkedést, tehát az nem tekinthető vizuális alapú tesztnek.

A 4C kísérletben az SPM teszt ismételhetőségét vizsgáltuk 30 dpf állatokon 1, illetve 24 órás inter-teszt intervallummal (9c ábra). A tesztismétlés időszávjába (T1 és T24) teszt-naiv kontrolcsoportot alkalmaztunk. Referenciaszintnek a második tesztben mért viselkedést használtuk. A vizsgált csoport ismételt tesztjének eredményei (T1 ismételt és T24 ismételt) nem különböztek a saját korábbi eredményeiktől (T0 ismételt), vagy az időben egyszerre futó teszt-naiv állatok eredményeitől (T1 naiv és T24 naiv).

Eredményeink mutatják, hogy az SPM teszt, hasonlóan az LDT teszthez, egy környezeti ingerekre kevésbé, de szorongást befolyásoló ágensekre fokozottan érzékeny kísérleti eszköz.

5. Táblázat: a 4. kísérlet statisztikai adatai. (SE: standard hiba)

Kísérlet	Változó	Teszt statisztika	Referencia szint	Kontraszt	becslés	SE	n	t-érték	p-érték
4A	elkerülés index	lineáris kevert modell	alacsony	közepes	0,016	0,10	16 vs 16	-0,16	0,876
	mély/összes kari belépés				0,004	0,03		0,15	0,879
	Átlag-sebesség elkerülés index				0,16	0,19		0,84	0,408
	mély/összes kari belépés			erős	0,20	0,10	16 vs 16	-1,89	0,066*
	mély/összes kari belépés				0,03	0,03		0,94	0,355
	Átlag-sebesség				-0,18	0,19		-0,95	0,351
4B	elkerülés index	páros t-próba	10 dpf/fény	10 dpf/sötét	-	-	20	-2,02	0,050*
			30 dpf/fény	30 dpf/sötét			24	0,03	0,974
	Átlag-sebesség		10 dpf/fény	10 dpf/sötét			20	3,27	0,003*
			30 dpf/fény	30 dpf/sötét			24	0,47	0,641
4C (T0-1)	elkerülés index	lineáris kevert modell	ismételt T1	ismételt T0	0,19	0,14	9 vs 9	1,31	0,239
	mély/összes kari belépés				0,12	0,06		-1,93	0,111
	Átlag-sebesség elkerülés index				5,16	3,73		-1,38	0,235
	mély/összes kari belépés			naiv T1	0,15	0,11	9 vs 9	1,36	0,184
	mély/összes kari belépés				0,05	0,05		-0,1	0,328
	Átlag-sebesség				1,96	1,10		-0,98	0,338
4C (T0-24)	elkerülés index	lineáris kevert modell	ismételt T24	ismételt T0	0,09	0,08	12 vs 12	-1,18	0,285
	mély/összes kari belépés				0,05	0,03		1,64	0,141
	Átlag-sebesség elkerülés index			2,46	1,62	1,52	0,179		
				naiv T24	0,08	0,07	-1,13	0,269	

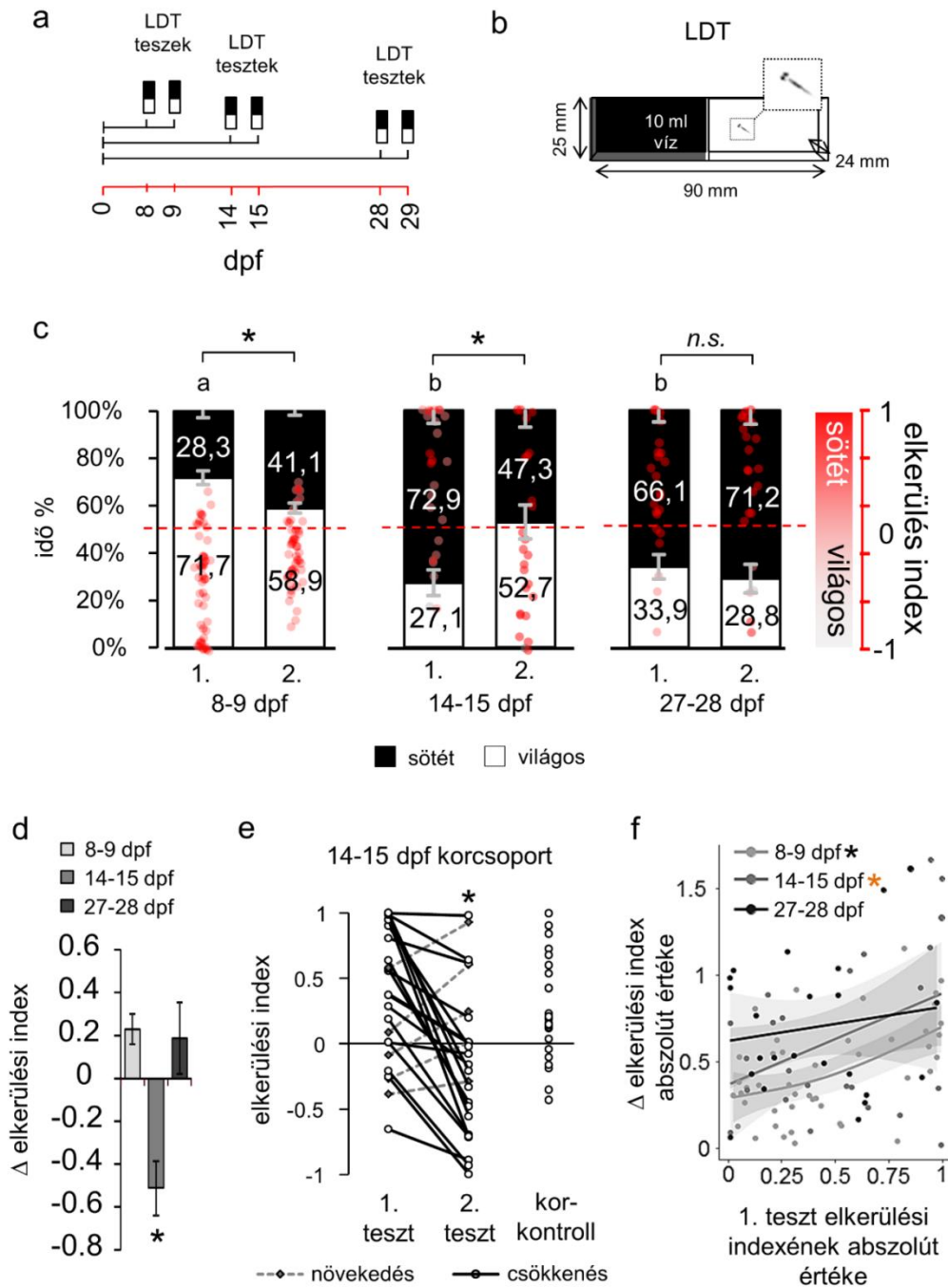
Kísérlet	Változó	Teszt statisztika	Referencia szint	Kontraszt	becslés	SE	n	t-érték	p-érték
	mély/összes kari belépés				0,05	0,03	12 vs 16	1,95	0,060*
	Átlag-sebesség				0,34	0,28		1,19	0,241

## 5.2. A viselkedési metamorfózis jellemzése (Kísérlet 5-6.)

### 5. kísérlet – A sötét/világos elkerülés kifejeződésének és tapasztalatfüggésének változása a fejlődés során

A 5. kísérlet során a sötét-világos elkerülés fejlődés során való átalakulását és annak környezeti érzékenységének változását vizsgáltuk. A kísérlet eredményei a 10. ábrán, a statisztikai adatok a 6. táblázatban találhatók.

Látható, hogy az állatok sötétkerülő viselkedésre a fejlődés második hetére világoskerülésbe fordult, ami fenotípus a fejlődés 4. hetén, a poszt-metamorf, juvenilis állatoknál is fennmaradt (10c ábra). Ugyanakkor a második tesztelés során, a 9 és 15 dpf korú állatok csökkent elkerülő viselkedést mutattak, míg a 29 dpf korú állatok magatartása nem változott. Érdekes megfigyelni, hogy mindig a kor-specifikus elkerülés csökkent, vagyis a sötétkerülő állatok erősebb sötét-explorációt, míg a világoskerülő állatok erősebb világos-explorációt mutattak. Ahogy a tesztek közti viselkedési változás meredeksége mutatja (10d ábra), a 2 hetes állatok mutatták a legerősebb reakciót az ismételt tesztelésre, illetve ebben a csoportban változtatták meg viselkedésüket a legnagyobb arányban az állatok (10e ábra), 24 egyedből 20 mutatott alacsonyabb értéket a második tesztben. Fontos megfigyelni, hogy az első teszten mutatott viselkedés szélsőségessége az elkerülés irányától függetlenül prediktálta a 2 teszt közötti változás mértékét az 1 és 2, de nem a 4 hetes korcsoportban (10f ábra). Az erősebb elkerülést mutató állatok erősebben reagáltak a tesztismétlésre. Eredményink rámutattak, hogy a viselkedési metamorfózis egyik jellegzetes formája egybeesik az elkerülő viselkedés erősebb tapasztalatfüggésével.



**10. ábra:** a-b) az 5. kísérlet elrendezése (a) és az egységes LDT tesztapparátus lárva és juvenilis zebradánióknak (b). c) Kor-, és tapasztalatfüggő exploráció az LDT tesztben. Piros pontok: elkerülési index értékek, skála a jobb tengely szerint. a-b-c jelzés: az eltérő betűk szignifikáns különbséget jeleznek az egyes korcsoportok 1. tesztjeiben. \*: szignifikáns különbség az elkerülésben korcsoporton belül, tesztnapok között. d) Az egyes korcsoportok tesztnapjai közötti eltérés az elkerülési viselkedésben. e) A 2 hetes korcsoport

elkerülésének változása és a teszt-naiv kontrolcsoport. f) Az 1. napi elkerülés erősségének és a 2 teszt nap közötti elkerülés különbségének összefüggései. \*: szignifikáns összefüggés, \*: marginális szignifikancia.

#### 6. Táblázat: az 5. kísérlet statisztikai adatai (SE: standard hiba)

Kísérlet	Változó	Teszt statisztika	Referencia szint	Kontraszt	Becslés	SE	n	t-érték	p-érték
5	elkerülés index	lineáris kevert modell	8 dpf/1. teszt	14 dpf/1. teszt	0,892	0,119	48 vs 24	7,516	2,48e-12*
			8 dpf/1. teszt	27 dpf/1. teszt	0,756	0,120	48 vs 23	6,285	2,35e-09*
			8 dpf/1. teszt	8 dpf/2. teszt	0,256	0,098	48	2,630	0,0093*
			8 dpf/1. teszt	14 dpf/1. teszt	-0,769	0,168	-	-4,587	8,36e-06*
			8 dpf/2. teszt	14 dpf/2. teszt					
			8 dpf/1. teszt	27 dpf/1. teszt	-0,155	0,170	-	-0,912	0,3631
	-	lineáris regresszió	8 dpf meredekség (absz.érték)	8 dpf elkerülés index	0,426	0,111	48	3,825	0,0004*
			14 dpf meredekség (absz.érték)	14 dpf elkerülés index	0,524	0,262	24	1,997	0,0583*
			27 dpf meredekség (absz.érték)	27 dpf elkerülés index	0,195	0,286	23	0,681	0,5033
		Változó	Teszt statisztika	Tényező	Négyzet-összeg	Négyzetes-közép	n	F-érték	p-érték
		meredekség	ANOVA	korcsoport	9,45	4,723	-	12,87	1,24e-05*
		Változó	Teszt statisztika	Kontrasztok	Becslés	-	n	-	p-érték
meredekség	Tukey post-hoc	8 dpf	14 dpf	-0,743	-	48 vs 24	-	0,00002*	
		8 dpf	27 dpf	-0,043	-	48 vs 23	-	0,95924	
		14 dpf	27 dpf	0,700	-	24 vs 23	-	0,00044*	

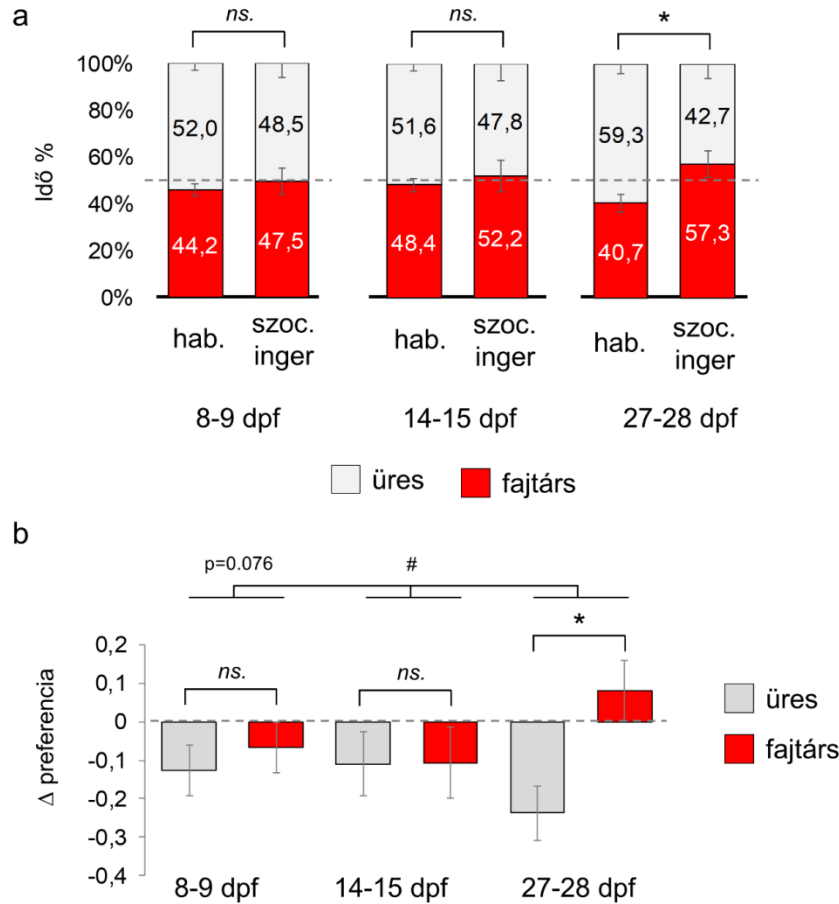
#### 6. Kísérlet - A szociális aktivitás megjelenése a fejlődés során

A 6. Kísérletben a zebradánió szociális aktivitásának mérésére alkalmas U-alakú szociális preferencia tesztet validáltuk laboratóriumunkban. A kísérlet eredményeit a 10. ábra, statisztikai adatait a 7. táblázat mutatja.

Látható, hogy a 28 dpf csoport esetében tapasztaltunk egyedül a véletlentől eltérő, a habituációs periódusban mért preferenciánál szignifikánsan nagyobb érdeklődést egy fajtárs megjelenésének hatására (11a ábra). Az aktív szociális érdeklődést, vagy elkerülést a  $\Delta$  preferencia változó bevezetésével kívántuk megmutatni. Ez a változó azt mutatja hogy adott kompartmentben való időtöltés, hogyan változik annak függvényében, hogy abból üres vagy szociális kompartment válik a teszt fázisban. Látható, hogy míg a 8 és 14 napos csoportok nem változtattak a kompartmentpreferencián a fajtárs megjelenésének hatására, addig a 28 napos állatok az üresen maradó kompartmenteket elhagyták a szociális kompartmentek javára (11b ábra). Ezek alapján az eredmények alapján az SP teszt megfelelő eszköz a



juvenilis szociális preferencia mérésére. Ezen felül látható, hogy az aktív, helyváltoztató szociális érdeklődés a fejlődés 2. és 4. hete között jelenik meg.



**11. ábra:** a) üres kamrában vagy fajtárs mellett töltött idő% habituációs (sehol nincs fajtárs) és szociális tesztfázisban (fajtárs az egyik kamrában). \*: szignifikáns különbség a fajtárs kamra használatában a habituációs és a szociális fázisok között. b) aktív szociális preferencia: a delta preferencia azt fejezi ki, hogy a szociális inger hatására mennyiben változott az üres vagy a fajtárs kamra használata. \* szignifikáns eltérés a két kamrahasználatban, # szignifikáns kamra\*kor interakció.

#### 7. Táblázat: a 6. kísérlet statisztikai adatai. (SE: standard hiba)

Kísérlet	Változó	Teszt statisztika	Referencia szint	Kontraszt	Becslés	SE	n	t-érték	P-érték*		
6	fajtrással töltött idő	ismételt mérések ANOVA		27 dpf/hab	-122,3	45,20	30	-2,707	0,008*		
				27 dpf/szoc.ing.	14 dpf/ szoc.ing.	-40,72	60,84	30 vs 23	-0,669	0,504	
				8 dpf/szoc.ing.		-63,58	57,68	30 vs 28	-1,102	0,272	
				27 dpf/ hab	14 dpf/ hab		95,18	68,61	-	1,387	0,169
				27 dpf/ szoc.ing.	14 dpf/ szoc.ing.						
				27 dpf/ hab	8 dpf/ hab		93,17	65,05	-	1,432	0,156

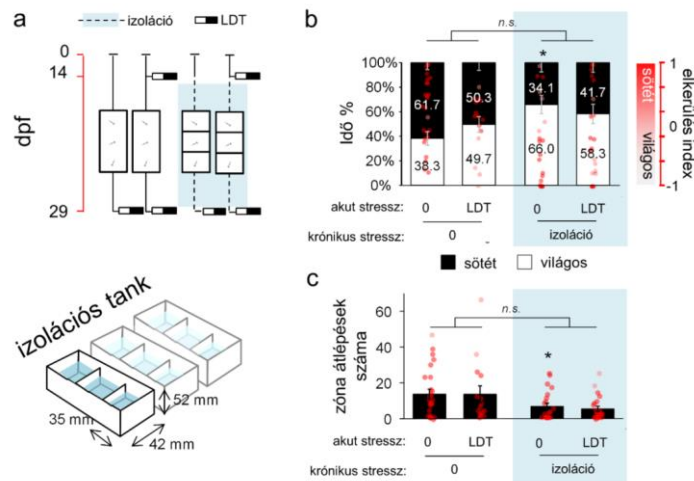
Kísérlet	Változó	Teszt statisztika	Referencia szint	Kontraszt	Becslés	SE	n	t-érték	P-érték
			27 dpf/ szoc.ing.	8 dpf/ szoc.ing.					
			8 dpf/szoc.ing.	8 dpf/hab.	29,16	46,78	28	0,623	0,535
			14 dpf/szoc.ing.	14 dpf/hab.	27,16	51,62	23	0,526	0,600
				27 dpf/üres	0,317	0,101	30	3,146	0,002*
			27 dpf/fajtárs	14 dpf/fajtárs	0,127	0,108	30 vs 23	1,177	0,241
				8 dpf/fajtárs	0,112	0,103	30 vs 28	1,086	0,279
	Δpref.		27 dpf/fajtárs ~ 27 dpf/üres	14 dpf/fajtárs ~ 14 dpf/üres	-0,314	0,153	-	-2,053	0,042*
			27 dpf/fajtárs ~ 27 dpf/üres	8 dpf/fajtárs ~ 8 dpf/üres	-0,259	0,145	-	-1,787	0,076*
			8 dpf/ fajtárs	8 dpf/üres	0,058	0,104	28	0,555	0,580
			14 dpf/ fajtárs	14 dpf/üres	0,003	0,115	23	0,026	0,980

### 5.3. A peri-metamorf környezeti hatások szerepe a védekező viselkedés és a szerotonerg rendszer kapcsolatára

#### 7. kísérlet – A peri-metamorf környezeti tapasztalat, mint krónikus szociális izoláció és/vagy akut kihívás, szerepe a juvenilis elkerülési viselkedés formálásában

A 7. kísérletben azt vizsgáltuk, hogy a peri-metamorf ingerek krónikus hiánya, jelen esetben a szociális izoláció vagy egy akut kihívás jelenléte, úgy mint egy LDT teszt, befolyásolja-e a poszt-metamorf elkerülési viselkedését. A kísérlet eredményeit a 12. ábra, statisztikai adatait a 8. táblázat tartalmazza.

A szociális izoláció az alkalmazott LDT tesztől függetlenül csökkentette az állatok világoselkerülő viselkedését (12b ábra), valamint a zónák közti átlépések számát (12c ábra) és úszási sebességét. A peri-metamorf szociális izoláció tehát markáns hatást gyakorolt a poszt-metamorf viselkedési fenotípusra.



**12. ábra:** **a)** a 7. Kísérlet elrendezése (fent) és a szociális izolációhoz használt izolációs kádak (lent). **b-c)** Krónikus szociális izoláció és/vagy akut LDT kihívás hatása a juvenilis viselkedésre az LDT tesztben. \*: szignifikáns különbség az izoláció hatására (az akut stressz=0 referencia szinten).

## 8. Táblázat: a 7. kísérlet statisztikai adatai.

Kísérlet	változó	Teszt statisztika	Referencia szint	Kontraszt	Becslés	standard hiba	n	t-érték	p-érték		
7	elkerülés index	Lineáris kevert modell	szoc/0 LDT	szoc/LDT	-0,208	0,207	25	-1,005	0,31826		
	vs										
	zóna átlépés								21	-0,076	0,93973
	elkerülés index			izo/LDT	-0,530	0,186	25	-2,853	0,00564*		
	vs										
	zóna átlépés								15	-2,704	0,00842*
elkerülés index	szoc/0 LDT	izo/0 LDT	0,338	0,283	-	1,193	0,23664				
zóna átlépés	szoc/LDT	izo/LDT	1,4117	5,3611	-	0,263	0,79300				

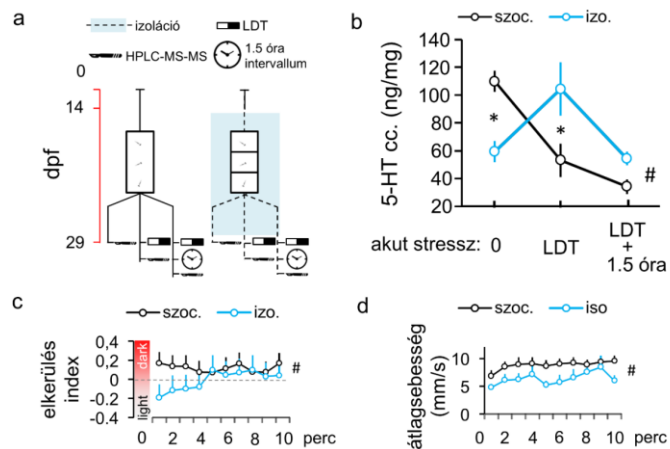
## 8. kísérlet – A krónikus peri-metamorf szociális izoláció szerepe a juvenilis-korú állatok nyugalmi-és kihívás-indukált 5-HT szintjének formálásában

A 8. kísérletben a peri-metamorf szociális izoláció poszt-metamorf, nyugalmi, illetve kihívás-indukált 5-HT szintre gyakorolt hatását vizsgáltuk. A kísérlet eredményeit a 13. ábra, statisztikai adatait a 9. táblázat tartalmazza.

A szociálisan tartott állatok 5-HT szintje akut kihívás hatására lezuhan és tartósan alacsony marad. Ezzel ellentétben az izolált állatok nyugalmi körülmények között alacsonyabb, kihívás hatására pedig gyorsan megnövő és gyorsan lecsengő 5-HT szintet mutatnak (13b ábra).

Fontos megjegyezni, hogy míg az izolált csoport nyugalmi 5-HT szintje megegyezik a szociálisan tartott csoport kihívás-indukált 5-HT válaszával, ugyan ez fordítva

is igaz, tehát az izolált állatok 5-HT koncentrációja a kontrolcsoport nyugalmi szintjéig emelkedik. A kísérlet során továbbá reprodukáltuk a korábban látott csökkent



**13. ábra:** **a)** A 8. kísérlet elrendezése. **b)** A szociális izoláció hatása a teljesagyi 5-HT koncentrációkra nyugalmi állapotban, illetve LDT kihívás után közvetlenül és 1.5 órával. \*: szignifikáns különbség a szociálisan tartott és izolált csoportok között egy kondícióon belül, #: fejlődés\*kondíció interakció. **c-d)** az LDT tesztben látott viselkedés perces időbontásban. #: fejlődés\*időablak interakció

világoselkerülést és lokomotoros aktivitást (13c és 13d ábrák). A viselkedést perces felbontásban elemezve továbbá láthattuk, hogy az alacsony elkerülési viselkedés specifikusan a teszt első néhány percére jellemző. A peri-metamorf szociális izoláció tehát markáns hatást gyakorol a poszt-metamorf 5-HT dinamikára, különös tekintettel a nyugalmi és kihívás-indukált szintek eltolódására, valamint az elkerülési viselkedés teszten belüli megjelenésére.

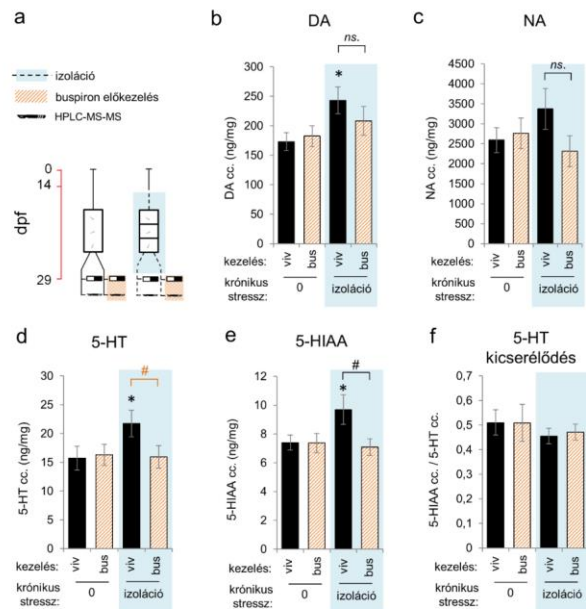
### 9. Táblázat: a 8. kísérlet statisztikai adatai.

Kísérlet	Változó	Teszt statisztika	Tényező	Négyzet-összeg	átl. eltérés négyzető.	n	F-érték	p-érték		
8	5-HT cc	kétutas ANOVA	kihívás	22603	11301	-	12,624	3,65e-05*		
			fejlődés	705	705	-	0,788	0,379		
			kihívás*fejlődés	24448	12224	-	13,655	1,86e-05*		
			<b>Teszt statisztika</b>	<b>Kontrasztok</b>	<b>Becslés</b>	<b>-</b>	<b>n</b>	<b>-</b>	<b>P-érték</b>	
				szoc/nyugalmi	szoc/LDT	-56,810	-	22 vs 18	0,001*	
				szoc/nyugalmi	szoc/LDT+1,5óra	-75,748	-	22 vs 24	0,0001*	
				szoc/LDT	szoc/LDT+1,5óra	-18,938	-	18 vs 24	0,706	
				izo/nyugalmi	izo/LDT	45,029	-	16 vs 16	0,045*	
			Tukey post-hoc	izo/nyugalmi	izo/LDT+1,5óra	-5,132	-	16 vs 16	0,1	
				izo/LDT	izo/LDT+1,5óra	-50,161	-	16 vs 16	0,018*	
		szoc/nyugalmi	izo/nyugalmi	50,512	-	22 vs 16	0,008*			
		szoc/LDT	izo/LDT	-51,327	-	18 vs 16	0,011*			
		szoc/LDT+1,5óra	izo/LDT+1,5óra	-20,104	-	24 vs 16	0,683			
		<b>Változó</b>	<b>Teszt statisztika</b>	<b>Referencia szint*</b>	<b>Kontraszt</b>	<b>Becslés</b>	<b>standard hiba</b>	<b>n</b>	<b>t-érték</b>	<b>P-érték</b>
	elkerülés index	ismételt mérés ANOVA	izo/1. időablak	szoc/1. időablak	0,309	0,161	-	1,916	0,058	
			izo/1. időablak	izo/további időablakok	0,027	0,010	-	2,626	0,009*	
			izo/1. időablak	szoc/1. időablak	-	-	34 vs 46	-	-	
			izo/~ időablak	szoc/további időablakok	-0,029	0,013	-	-2,181	0,029*	

**9. kísérlet** - A krónikus peri-metamorf szociális izoláció hatása a juvenilis-korú állatok kihívás-indukált 5-HT, 5-HIAA, DA és NA válaszára és annak farmakológiai manipulációja

A 9. kísérletben a peri-metamorf szociális izoláció szerepét vizsgáltuk a poszt-metamorf, kihívás-indukált, központi 5-HT, 5-HIAA, DA és NA szintek kialakításában, valamint ezek buspironra való érzékenységét. Ennek keretein belül továbbá vizsgáltuk, hogy az 5HT<sub>1A</sub>R parciális agonista buspiron viselkedést befolyásoló koncentrációja (50 mg/l) alkalmas-e az 5-HT jelátvitel specifikus gátlására. A kísérlet eredményeit a 13. ábra, statisztikai adatait a 10. táblázat tartalmazza.

Kísérletünkben reprodukáltuk az izolált állatoknál korábban látott kihívás hatására megnövekedett 5-HT szintet (13d ábra), valamint ugyan ilyen irányú változást mértünk az 5-HIAA (13e ábra) és DA (13b ábra) szintekben is. A buspiron előkezelés kivédte az 5-HT és 5-HIAA változást, míg a DA szintet nem befolyásolta. Érdekes módon, a buspiron kizárólag az izolált csoportokban fejtett ki hatást a neurotranszmitterekre. Ez alapján elmondható, hogy a buspiron alkalmazott koncentrációja specifikus eszközként használható a kihívás-indukált 5-HT szintváltozások megelőzésére az izolált állatokban.



**13. ábra:** **a)** A 9. kísérlet elrendezése. **b-f)** A krónikus szociális izoláció és az akut buspiron előkezelés hatása a dopamin (b), noradrenalin (c), 5-HT (d) és 5-HIAA (e) szintekre, valamint az 5-HT kicserélődésre. \*: szignifikáns különbség a szociálisan tartott és az izolált csoport között a vivőanyag szintjén, #: szignifikáns különbség a vivőanyag és buspiron kezelt csoport között az izolált csoport szintjén. #: marginális szignifikancia

**10. Táblázat: a 9. kísérlet statisztikai adatai.** (SE: standard hiba)

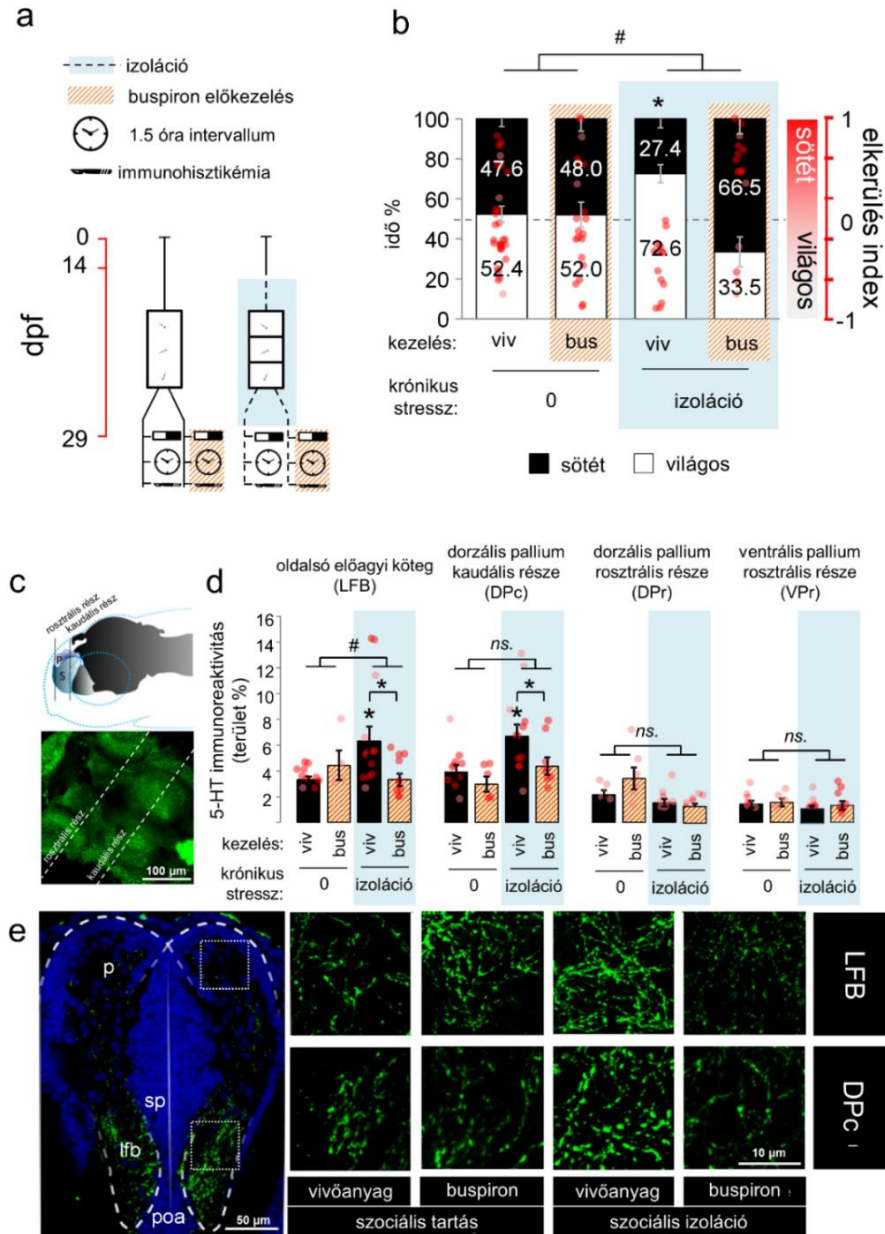
Kísérlet	Változó	Teszt statisztika	Referencia szint	Kontraszt	Becslés	SE	n	t-érték	p-érték	
<b>9</b>	5HT cc.		szoc/viv	szoc/busp	0,566	2,923	10	0,194	0,848	
			szoc/viv	izo/viv	5,990	2,923	vs	2,050	0,049*	
			izo/viv	izo/busp	-5,781	2,836	10	-2,039	0,050*	
			szoc/viv	izo/viv						
			~	~	-6,347	4,072	-	-1,559	0,129	
			szoc/busp	izo/busp						
	5HIAA cc.		szoc/viv	szoc/busp	-0,033	1,0636	10	-0,031	0,975	
			szoc/viv	izo/viv	2,283	1,0636	vs	2,147	0,040*	
			izo/viv	izo/busp	-2,605	1,031	10	-2,525	0,017*	
			szoc/viv	izo/viv						
			~	~	-2,572	1,4818	-	-1,736	0,093*	
			szoc/busp	izo/busp						
	DA cc.	Lineáris modell	szoc/viv	szoc/busp	9,335	29,524	10	0,316	0,754	
			szoc/viv	izo/viv	69,991	29,524	vs	2,371	0,024 *	
			izo/viv	izo/busp	-34,97	28,64	10	-1,221	0,231	
			szoc/viv	izo/viv						
			~	~	-44,30	41,135		-1,077	0,290	
			szoc/busp	izo/busp						
	NA cc.		szoc/viv	szoc/busp	170,2	587,4	10	0,290	0,774	
			szoc/viv	izo/viv	780,9	587,4	vs	1,329	0,193	
izo/viv			izo/busp	-1061	569,9	10	-1,862	0,072*		
szoc/viv			izo/viv							
~			~	-1231	818,5	-	-1,504	0,143		
szoc/busp			izo/busp							

### 10. kísérlet – A krónikus peri-metamorf szociális izoláció viselkedési és előagyi szerotonerg hatásainak kapcsolata

A 10. kísérletben a peri-metamorf szociális izoláció sötételkerülésére és előagyi 5-HT szintjére gyakorolt hatásainak kapcsolatát vizsgáltuk. A kísérlet eredményeit a 14. ábra, statisztikai adatait a 11. táblázat tartalmazza.

A kísérlet során reprodukáltuk az izolált csoportoknál korábban látott csökkent világoselkerülésre utaló eredményeinket. Ezt a viselkedési hatást kivédte az előzetes buspiron kezelés, míg az a kontrolcsoport viselkedését az nem befolyásolta (14b ábra). Az immunhisztokémiai vizsgálat során az izolált állatoknál erősebb 5-HT immunreaktivitást detektáltunk az oldalsó előagyi kötegben (LFB), ahol a szerotonerg projekciók belépnek az előagyba, illetve a dorzális pallium kaudális részén (DPc), ahol az emlős amigdalával, és hippocampuszal homológ dorzo-mediális és dorzo-laterális magcsoportok már különálló területként jelennek meg (14d és 14e ábrák). Ez, a viselkedésteszt után 1,5 órával detektált változás szintén kivédhető volt a megelőző buspiron kezeléssel. Az anterior kommissurától

rosztrális irányban fekvő előagyi területeken (Dpa, VPa) egyik tényezőt vizsgálva sem mértünk változást.



**14. ábra:** **a)** a 10. kísérlet elrendezése. **b)** a krónikus szociális izoláció és az akut buspiron előkezelés hatása az elkerülő viselkedésre az LDT tesztben. **c)** immunhisztokémiával vizsgált területek rosztro-kaudális pozíciója egy sematikus ábrán (fenn) és egy felülről készített teljesagyi konfokális képen (lent). **d)** a krónikus szociális izoláció és az akut buspiron kezelés hatása a vizsgált területen detektált 5-HT immunoreaktivásra. **e)** a vizsgált területek dorzo-ventrális pozíciója egy frontális metszeten az LFB és a DPc síkjában, valamint a szignifikáns különbséget mutató területek reprezentatív képei.

Elmondható tehát, hogy az izolált állatok világoselkerülést szabályzó előagyi területein az LDT kihívást követően mérhető különbség van az 5-HT immunoreaktivásban, ami funkcionális kapcsolatban áll az izoláció okozta viselkedési eltérésekkel.

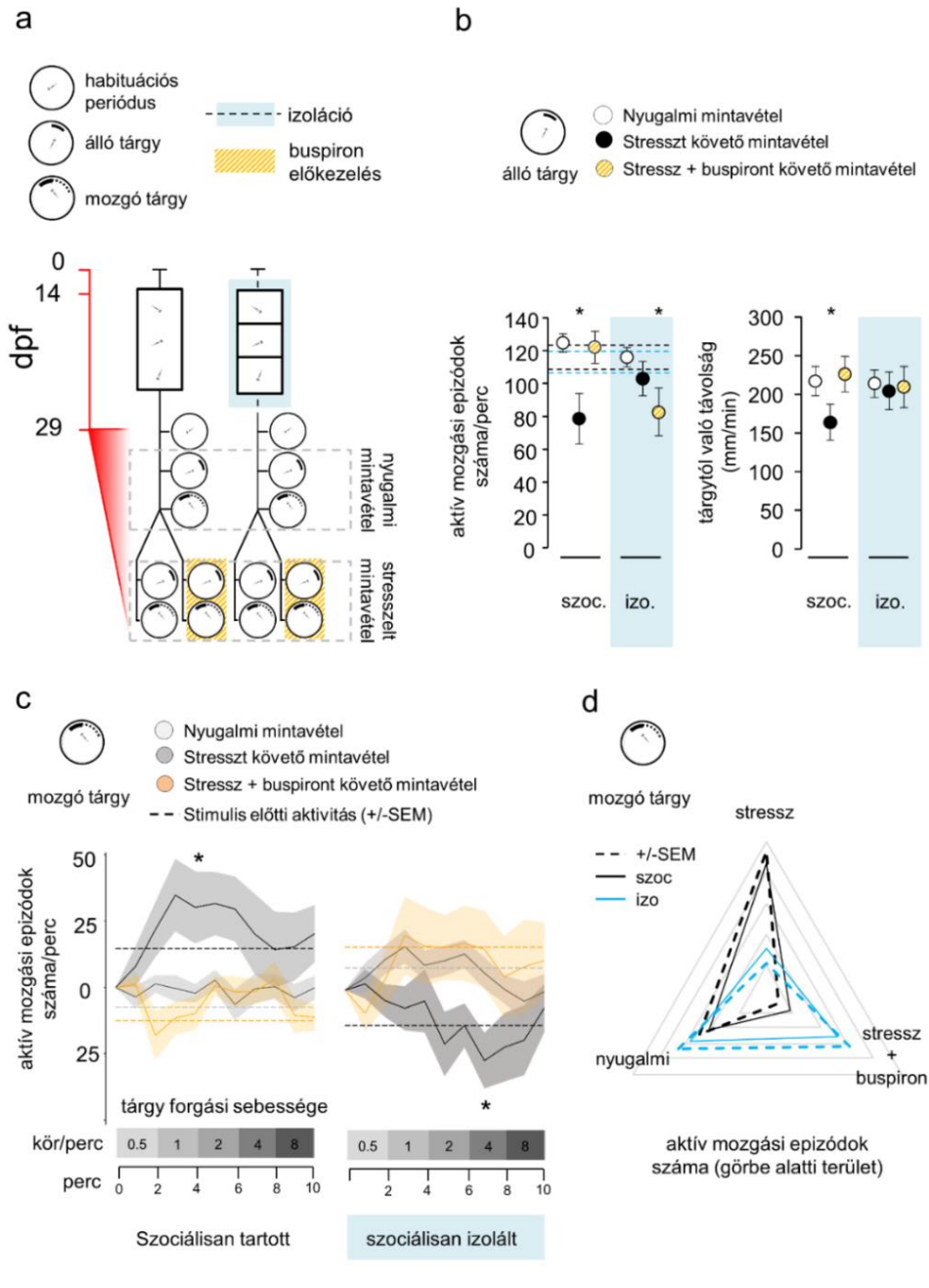
**11. Táblázat: a 10. kísérlet statisztikai adatai.** (SE: standard hiba)

Kísérlet	Változó	Teszt statisztika	Referencia szint	Kontraszt	Becslés	SE	n	t-érték	p-érték		
10	elkerülés index	Lineáris kevert modell	szoc/viv	szoc/busp	0,0210	0,142	31 vs 22	0,148	0,883		
			szoc/viv	izo/viv	-0,335	0,155	21 vs 14	-2,159	0,034*		
			szoc/viv	izo/viv	~	~	0,664	0,224	-	2,963	0,004*
			szoc/busp	izo/busp							
	5HT cc. (LFB)			szoc/viv	szoc/busp	1,117	1,591	8 vs 6	0,702	0,488	
				szoc/viv	izo/viv	3,004	1,131	8 vs 12	2,655	0,012*	
				izo/viv	izo/busp	-3,004	1,131	12 vs 10	2,655	0,012*	
				szoc/viv	izo/viv	~	~	-4,121	1,952	-	-2111
	5HT cc. (DPc)			szoc/busp	izo/busp						
				szoc/viv	szoc/busp	-0,952	1,293	9 vs 6	-0,736	0,467	
				szoc/viv	izo/viv	2,758	1,011	9 vs 12	2,729	0,010*	
				izo/viv	izo/busp	-2,320	1,077	12 vs 7	-2,153	0,039*	
	5HT cc. (VPr)		Lineáris modell	szoc/viv	izo/viv	~	~	-	-0,813	0,422	
				szoc/busp	izo/busp						
				szoc/viv	szoc/busp	0,132	0,452	8 vs 6	0,293	0,772	
				szoc/viv	izo/viv	-0,314	0,373	8 vs 7	-0,841	0,409	
	5HT cc. (DPr)			szoc/viv	izo/viv	~	~	-	0,155	0,878	
				szoc/busp	izo/busp						
				szoc/viv	szoc/busp	1,269	0,765	8 vs 6	1,658	0,112	
				szoc/viv	izo/viv	-0,620	0,726	8 vs 7	-0,841	0,410	
			szoc/viv	izo/viv	~	~	-	-1,537	0,140		
			szoc/busp	izo/busp							

**11.kísérlet** - A krónikus peri-metamorf szociális izoláció szerepe a juvenilis-korú állatok nyugalmi-és kihívás-indukált éberségének formálásában

A 11. kísérletben a peri-metamorf szociális izoláció szerepét vizsgáltuk a poszt-metamorf nyugalmi-, és kihívás-indukált éberségre. A kihívás-indukált éberség potenciális szerotonerg hátterének feltárásához az állatokat az újdonsághelyzet előtt buspiroonnal kezeltük. A kísérlet eredményeit a 15. ábra, statisztikai adatait a 12. táblázat tartalmazza.





**15. ábra:** **a)** a 11. kísérlet elrendezése. **b)** a krónikus szociális izoláció, az újdonság stressz és az akut buspiron kezelés hatása a megjelenő mozdulatlan tárgyra adott reakcióra. **c)** ugyan ezen körülmények hatása a mozgó tárgyra adott reakcióra. \*: szignifikáns különbség a vivőanyag kezelt, nyugalmi mintavételi reaktivitáshoz képest. **d)** csillagábra az egyes körülmények alatt mutatott mozgási epizódok görbéje alatti terület alapján.

A szociálisan tartott állatok nyugalmi körülmények között nem reagáltak mérhető módon a körcikkely megjelenésére (15b ábra), míg újdonsághelyzetben aktív epizódjaik száma és a cikkelytől való távolságuk is szignifikánsan csökkent. Míg a szociális csoportokban a buspiron mindkét fenti hatást kivédte, az izolált állatok csak az előkezelés hatására válaszoltak a cikkely megjelenésére. A szociálisan tartott csoport nyugalmi körülmények között egyáltalán nem reagált a körcikkely mozgására (15c ábra), míg újdonsághelyzetben aktív epizódjaik száma a mozgás sebességével nőtt, amely választ kivédett az előzetes buspiron kezelés. Ezzel ellentétben, az izolált állatok nyugalmi körülmények között növelték aktivitásukat, míg újdonsághelyzetben egy késleltetett, a nyugalmival és a szociálisan tartottak stressz-indukáltjával ellentétes irányú választ adtak. A buspiron előkezelés a saját nyugalmi válasszal, illetve a szociális újdonsághelyzetben adott válasszal megegyező aktivitást indukált.

Látható, hogy míg a szociálisan tartott állatok csak újdonsághelyzetben reagálnak aktívan az ingerre, addig az izoláltak csak nyugalmi körülmények között, illetve buspiron előkezelés hatására képesek ugyan erre a válaszra (15d ábra).

## 12. Táblázat: a 11. kísérlet statisztikai adatai.

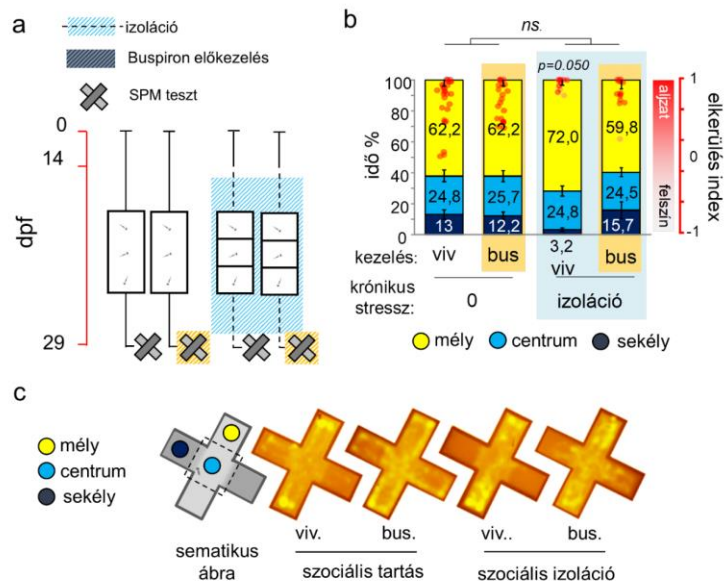
Kísérlet	Stimulus	Változó	Teszt stat.	Referencia szint	Kontraszt	Becslés	standard hiba	n	t-érték	P-érték	
11	álló	aktív epizód	lineáris kevert modell	szoc / izo	nyugalmi / nyugalmi	-8,141	10,605	27	-0,768	0,445	
		tárgytól való távolság			nyugalmi / nyugalmi	-5,355	25,217	vs 27	-0,212	0,832	
	mozgó	aktív epizód		szoc / szoc / busp	nyugalmi / busp	-5,326	6,786	27	-0,785	0,433	
		tárgytól való távolság			nyugalmi / busp	-4,074	12,377	vs 27	-0,329	0,743	
	álló	aktív epizód		szoc / szoc / busp	nyugalmi / busp	-	28,864	14	-0,368	0,714	
		tárgytól való távolság			nyugalmi / busp	10,613	28,864	vs 14	-0,368	0,714	
	mozgó	aktív epizód		szoc / szoc / busp	nyugalmi / busp	2,498	8,531	27	0,293	0,770	
		tárgytól való távolság			nyugalmi / busp	-	11,602	vs 27	-3,876	0,0002*	
	álló	aktív epizód		szoc / szoc / busp	nyugalmi / busp	44,972	11,602	13	-2,072	0,042*	
		tárgytól való távolság			nyugalmi / busp	-	27,018	vs 13	-2,072	0,042*	
	mozgó	aktív epizód		szoc / szoc / busp	nyugalmi / busp	17,476	8,341	27	2,095	0,037*	
		tárgytól való távolság			nyugalmi / busp	17,476	8,341	vs 27	2,095	0,037*	
	álló	aktív epizód		szoc / izo	nyugalmi / nyugalmi	~ / ~	29,634	16,617	-	-1,783	0,079*
		tárgytól való távolság			nyugalmi / nyugalmi	~ / ~	13,560	38,691	-	0,350	0,727
mozgó	aktív epizód	szoc / izo	nyugalmi / stresszelt	szoc / busp / izo / busp	-7,286	11,587	-	-0,629	0,530		
	tárgytól való távolság		nyugalmi / stresszelt	szoc / busp / izo / busp	32,381	16,804	-	1,927	0,058*		
álló	aktív epizód	szoc / izo	nyugalmi / stresszelt	nyugalmi / stresszelt	63,515	39,125	-	1,623	0,109		
	tárgytól való távolság		nyugalmi / stresszelt	nyugalmi / stresszelt	63,515	39,125	-	1,623	0,109		
mozgó	aktív epizód	szoc / izo	szoc / stresszelt	szoc / stresszelt	3,931	12,362	-	0,318	0,751		

## 12. kísérlet - A krónikus peri-metamorf szociális izoláció felszínelkerülésre gyakorolt hatásai és azok szerotonerg háttere

A 12. kísérletben a peri-metamorf szociális izoláció poszt-metamorf felszínelkerülésére gyakorolt hatását vizsgáltuk. Az alkalmazott SPM tesztben látott elkerülés előzetes eredményeink alapján elsősorban nem vizuális alapú, így az jó kontrasztként szolgál a teljesen vizuális ingerek által irányított LDT teszt mellett. Az izoláció felszínelkerülésre gyakorolt hatásainak potenciális szerotonerg hátterét buspiron előkezeléssel vizsgáltuk. A kísérlet eredményeit a 16. ábra, statisztikai adatait a 13. táblázat tartalmazza.

A szociálisan tartott állatok erős felszínelkerülést mutattak, míg az izolált csoport ezt marginálisan felülmúlta. A buspiron előkezelés ezt a hatást kivédte, míg szociális csoport viselkedését nem befolyásolta (16b és 16c ábrák).

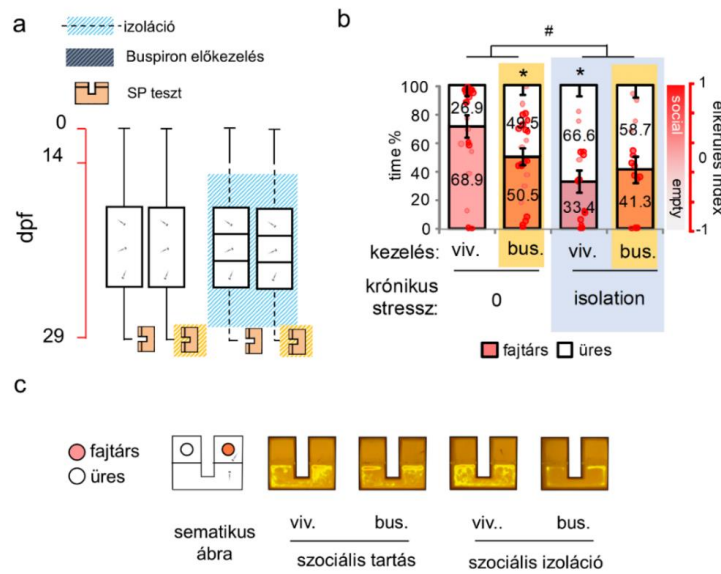
Látható, hogy a felszínelkerülés a világoelkerüléssel ellentétes irányban változik mind az izoláció, mind a szerotonerg jelátvitel csökkentésének hatására.



**16. ábra:** **a)** a 12. kísérlet elrendezése. **b)** a krónikus szociális izoláció és az akut buspiron kezelés hatása a juvenilis zebraadaniók felszínelkerülésére. **c)** reprezentatív hőterképek az egyes csoportokról.

### 13. kísérlet - A krónikus peri-metamorf szociális izoláció szociális aktivitásra gyakorolt hatásai és azok szerotonerg háttere

A 13. kísérletben a peri-metamorf szociális izoláció poszt-metamorf szociális aktivitásra gyakorolt hatását vizsgáltuk. A kísérletben szociálisan tartott és izolált, 30 dpf korú állatokat vetettünk alá az SP tesztnek. Az izoláció szociabilitásra gyakorolt hatásainak potenciális szerotonerg hátterét buspiron előkezeléssel vizsgáltuk. A kísérlet eredményeit a 17. ábra, statisztikai adatait a 13. táblázat tartalmazza.



**17. ábra: a)** a 13. kísérlet elrendezése. **b)** A krónikus szociális izoláció és az akut buspiron kezelés hatása a szociabilitásra. \*: szignifikáns különbség referencia szinten belül (kezelési csoportok között szociális tartásban, tartási körülmények között vivóanyag kezelt szinten). **c)** reprezentatív hőtérképek az egyes csoportokról.

A szociálisan tartott állatok erős szociális érdeklődést mutatnak, amit az előzetes buspiron kezelés elmosott (17b és 17c ábrák). Ezzel ellentétben az izolált állatok erős szociális elkerülést mutatnak, amit a buspiron szintén megakadályozott.

#### 13. táblázat: a 12. és 13. kísérlet statisztikai adatai.

Kísérlet	Teszt	Változó	Teszt statisztika	Referencia szint	Kontraszt	Becslés	SE	n	t-érték	P-érték
12	SPM	elkerülés index	Lineáris kevert modell	szoc/viv	izo/viv	-0,237	0,120	28 vs 17	-1,984	0,050*
				szoc/viv	szoc/busp	0,026	0,108	28 vs 24	0,240	0,811
				szoc/viv	izo/viv	0,287	0,173	-	1,661	0,101
				szoc/busp	izo/busp	-0,790	0,208	16 vs 17	-3,802	0,0003*
13	SP			szoc/viv	szoc/busp	-0,435	0,182	16 vs 25	-2,396	0,019*
				szoc/viv	izo/viv	0,703	0,292	-	2,404	0,019*
				szoc/busp	izo/busp					

## 6. Megbeszélés

Kísérleteink során validáltuk a zebra-dánió korai fejlődése során megjelenő védekező viselkedésrepertoárt és az azt vizsgáló tesztek, beleértve a thigmotaxis kiváltó OT-t, a szkototaxis kiváltó LDT-t, illetve a szociális aktivitást kiváltó SP-t, valamint új megközelítéseket fejlesztettünk ki a geotaxis és a stressz-indukálta éberség vizsgálatára az SPM és az SMR tesztek formájában. Ezt követően definiáltunk egy a viselkedési metamorfózissal egybeeső (peri-metamorf) érzékeny időszakot a fejlődés első hónapjában, ahol az egyedek plasztikusabb viselkedést mutattak a poszt-metamorf állapottal összevetve. Az ebben az időszakban alkalmazott szociális izoláció hatására a juvenilis zebra-dániók atipikus viselkedési és szerotonerg fenotípust mutattak. Míg a nem-vizuális újdonság (SPM), és a vizuális alapú szociális kihívás (SP) során erősebb elkerülést figyeltünk meg esetükben, addig a vizuális újdonság kihívás (LDT) esetén csökkent elkerülést és explorációt mértünk. Ennek mechanisztikus okait vizsgálva fedtük fel, hogy míg a szociálisan tartott állatok magasabb stressz-indukált éberséget mutatnak egy vizuális kihívás során (SMR), addig az izolált egyedek ugyanerre csak nyugalmi körülmények között képesek. Ezzel párhuzamosan míg a szociálisan tartott állatok egy vizuális kihívásra lezuhanó 5-HT szinttel válaszoltak, addig az izolált állatokat alacsonyabb nyugalmi, és magasabb kihívásra adott válasz jellemezte. Az 5-HT választ érintő eltérések megfigyelhetők voltak az előagyat szerotoninnal ellátó LFB rostkötegben, illetve az emlős amigdala és hippocampusz homológokat tartalmazó dorzális pallium kaudális részén. A stressz-indukált 5-HT változások kivédhetők voltak az előzetes 5HT<sub>1A</sub> receptor agonista buspiron alkalmazásával mind a teljesagy, mind pedig a dorzális pallium szintjén. Ezzel párhuzamban a buspiron képes volt helyreállítani a tipikus stressz-indukált éberséget és elkerülést egyaránt.

Az első kísérletek során a lárva és juvenilis állapotú zebra-dániók viselkedésrepertoárját jellemeztük. Az 1. Kísérletben az OT és az LDT tesztek hasonlítottuk össze azok környezeti és farmakológiai érzékenységét vizsgálva. Míg az OT-ben mért thigmotaxis mind az előzetes OT és LDT tesztelésre, mind pedig a buspiron előkezelésre érzékenynek bizonyult, addig az LDT-ben mért szkototaxis csak utóbbira reagált. Az OT teszt esetében, a thigmotaktikus elkerülési viselkedés csökkent, ha az állat már rendelkezett tapasztalattal a tesztről, és nőtt,

ha azt egy másik teszt (LDT) előzte meg. Ezt értelmezhetjük az tesztről szerzett előzetes tapasztalat habituáló és a más típusú kihívás akut stresszor hatásának. Ennek ellenére, az előzetes szorongásoldó kezelés az elkerülést növelte, mely alapján a thigmotaxis végpont a szorongással negatívan asszociálható. Ezzel ellentétben, az LDT teszt szkototaxis végpontja a vizsgált tapasztalati tényezőkre inszenzitív volt, míg a szorongásoldó hatására csökkent, így azt egy kísérleti körülményekre kevésbé érzékeny, szorongás-asszociált viselkedésnek tekinthetjük. Az OT és LDT tesztekben mért viselkedések ellentétes érzékenysége a tesztvégpontok, különös tekintettel a thigmotaktikus viselkedés újraértelmezését tette szükségessé. Ennek keretein belül a viselkedés fő jelzőjeként alkalmazott perifériás aktivitást több részre bontottuk, elkülönítettünk aljzati és felszíni thigmotaktikus viselkedést. Eredményeink szerint az erősebb thigmotaxist mutató egyedek valójában erősebb felszíni aktivitást – csökkent felszínkerülést – mutatnak. Ebből következően a thigmotaxis önmagában nem értelmezhető elkerülési viselkedésként, ezzel szemben az adult stádiumú halaknál széles körben vizsgált, szorongás-asszociált felszínkerülést<sup>284,292,367</sup> fontos lehet mérhetővé tenni a lárva és juvenilis stádiumokban egyaránt.

A 2., 3. és 4. Kísérletekben a felszínkerülés vizsgálatát célzó SPM tesztet fejlesztettük ki és validáltuk. Az 2A kísérletből látható, hogy a lárvakorú zebradániók az apparátus mély karját preferálják, annak centruma és sekély karjai ellenében. Feltételezzük, hogy ez a preferenciát az adult stádiumban leírt szorongás-asszociált felszínkerülő motiváció hozhatja létre. A hipotézist erősíti, hogy a mély kari preferencia a 2B kísérletben az adult jelenséghez hasonlóan reagál a humán szorongást befolyásoló ágensekre, így a szorongás validálásának „golden standardját” jelentő benzodiazepin származékra<sup>10</sup>, a GAS-ban hatékony klinikai szorongásoldó buspironra<sup>189</sup>, és az agitatív, szorongáskeltő koffeinre<sup>368,369</sup>. Fontos megjegyezni, hogy a két vizsgált, különálló mechanizmuson keresztül ható szorongásoldó ágens, a CDP és a buspiron, azonos körülmények között ritkán fejt ki azonos hatást rágcsáló modellekben<sup>11,21</sup>, így ez mind a zebradánió modell, mind az SPM teszt előnyeként tárgyalandó. Az adult felszínkerüléssel való kapcsolatot erősíti továbbá, hogy a mélykari preferencia hasonlóan jelenik meg és hasonlóan befolyásolható a 3. kísérletben, tehát a viselkedési metamorfózist követő állapotban is, ami alapján a fenti végpontok valószínűleg

egyazon motiváció különálló viselkedési jelzői lehetnek. Itt fontos megjegyezni, hogy bár a vivőanyagkezelte halak explorációs mintázata nagyon hasonló volt a lárva és a juvenilis állatok esetében, utóbbi esetében a buspiron kezelés csak hosszabb inkubáció mellett fejte ki hatást az elkerülésre. Ez lehetséges egyrészt az anyagok fejlődési állapotoként eltérő felvétele miatt, másrészt a központi idegrendszer fejlettsége miatt is. Mind a lárva, mind a juvenilis egyedek esetében az anyagok abszorpciója történhet a bőrfelületen és a kopolyún keresztül is, bár minél idősebb az egyed, annál inkább az utóbbi felé tolódik a hangsúly, míg ennek megfelelően a kopolyún keresztüli anyagáramlás jellege is megváltozik<sup>370</sup>. Ezen túl, a lárva testfelület-tömeg aránya nagyobb az adult állapotoknál, valamint bőrük is áteresztőbb, a gerincesekre jellemző 3 rétegu epidermisz csak a morfológiai metamorfóziskor jelenik meg<sup>357</sup>. Összességében tehát a lárva külső és belső környezete között nagyobb anyagáramlást feltételezhetünk. Ezek ellenére, az eredményeink sokkal inkább központi idegrendszeri különbséget feltételeznek, mivel például minden alkalmazott inkubáció befolyásolta a lokomotoros aktivitást, míg a lárva esetében egyik sem. Ezen felül a lárva körülbelül 3 napos kortól már rendelkeznek a gerincesekre jellemző fejlettségu vér-agy gáttal<sup>371</sup>, így a bejutott anyagok központi reprezentációjában nem várunk eltérést. A 4. kísérlet fő tanulsága, hogy az SPM a kísérleti körülményekre kevésbé érzékeny teszt. Juvenilis zebradániókat tesztelve nem találtunk példát a fényintenzitás erősségének, a fény és látható ingerek teljes hiányának, vagy az előzetes teszt-tapasztalatnak bármilyen befolyásoló hatására. Fontos megjegyezni, hogy a rágszálómodellek esetén, ezek a tényezők erősen befolyásolják egy teszt viselkedési végpontjait<sup>372,373</sup>, ami ellentét a zebradánió és az SPM paradigma előnyére válhat a nagy-áteresztőképességu farmakológiai szűrésekben és annak limitációját jelentheti az etiológiai megközelítésekben. Megjegyzendő, hogy bár egyik esetben sem láttunk statisztikailag szignifikáns eredményt, trend szintű hatás figyelhető meg a tesztismétléseknél (4C Kísérlet), ahol az 1 órás intervallumnál marginális excitáció, míg a 24 órás intervallumnál marginális habituáció sejtető minden vizsgált változó esetében. A kísérletek másik fontos üzenete, hogy bár a juvenilis egyedek explorációját nem befolyásolták a vizuális ingerek, a 10 napos lárva láthatóan erősebb elkerülést és lokomotoros aktivitást mutatnak sötétben. A lokomotoros aktivitás ilyen jellegű változásai ismertek a zebradánió irodalomból<sup>353</sup>, aminek lehet másodlagos következménye az ezzel

párhuzamosan változó elkerülési aktivitás is. Ugyanakkor az, hogy az elkerülés fény-sötét érzékenysége korfüggő jelenség, arra utal, hogy a teszt explorációjához nem szükségesek vizuális ingerek, illetve azt mutatja, hogy poszt-metamorf állatok feltérképező viselkedése kevésbé érzékeny a környezet megszakító ingereire. Összefoglalva tehát, az LDT és az SPM tesztek a kísérleti körülményekre kevésbé, míg farmakológiai manipulációkra erősen érzékeny tesztek, amelyekben a megnyilvánuló viselkedés valószínűleg az emlősöknél látott szorongás-asszociált elkerülési viselkedéssel rokonítható. Ezek a tesztek potenciálisan alkalmasak lehetnek modelleink fenotipizálására.

A pre-metamorf lárva és poszt-metamorf juvenilis egyek saját adatainkból és irodalomból ismert eltérő érzékenységu és irányú viselkedése a viselkedési metamorfózis elmélete felé irányította vizsgálatainkat. Az 5. és 6. Kísérletekben a viselkedési metamorfózis irodalomból ismert formáit<sup>261,279</sup> szándékoztuk reprodukálni, illetve azt párhuzamba állítani a környezeti ingerekre való érzékenységet jelző habituációs képességgel. Látható, hogy a sötét-elkerülés világos-elkerülésbe fordulása a fejlődés 1. és 2. hete közé, míg az aktív szociális érdeklődés a fejlődés 2. és 4. hete közé tehető. Míg Lau és Guo a sötét/világos averzió átfordulást a 2. és 4. hét között, tehát a mi vizsgálatunkban látottakhoz képest később tapasztalta, addig Dreosti és munkatársai a szociális aktivitás megjelenésére a mi kísérletünkkel megegyező fejlődési dinamikát írt le. Érdekes módon a vizsgálatokban a metamorfózis közös pontjaként megjelenő 2. hét volt a leginkább plasztikus viselkedéssel társuló időszak. Itt az állatok döntő többsége, a máshol tapasztaltaknál jóval erősebb viselkedési változást mutatott az ismételt kihívás hatására. Ez a változás prediktálható volt az első napi teszteléskor mutatott elkerülés mértékéből, vagyis az erősebben elkerülők reaktívabbak voltak. Ez valószínűleg nem csak az első tesztelési magas elkerülésnek köszönhető, hiszen annak mértéke az 1 hetes állatoknál is hasonlóan alakult, de ott ezt nem követte megegyező mértékű habituáció. Ezek alapján az eredmények alapján tehát a viselkedési metamorfózis egybeesik egy a környezeti ingerekre kiemelkedően érzékeny periódussal.

Látva ezt a viselkedés szempontjából érzékeny időszakot, a 7. kísérletben akut kihívásnak és/vagy szociális izolációnak vetettük alá az egyedeket a 2. és a 4. hét között,



majd vizsgáltuk poszt-metamorf elkerülő viselkedésüket, egy etiológiai modell beállításának céljával. Fontos kiemelni, hogy mind az akut kihívás, mind az izoláció azon a mintavételi ponton történt/kezdődött, ahol az állatok már adult jellegű elkerülést mutatnak, de még erősen fogékonyak voltak a környezetükre, ezzel kizárva a lárva jellegek izoláció okozta konzerválásának lehetőségét. A krónikus szociális izoláció hatására az állatok egy LDT kihívás során csökkent elkerülést és lokomotoros aktivitást mutattak a 7., 8. és 10. kísérletekben egyaránt. Ez a több alkalommal is reprodukált csökkent elkerülés igen meglepő, hiszen az LDT teszt egy farmakológiai<sup>258</sup>, viselkedési<sup>283</sup> és élettani<sup>338</sup> eszközökkel validált szorongás-teszt, tehát a környezeti perturbáció e szerint egy alacsony szorongású fenotípust hozott létre. Ez azonban több szempontból is kontraintuitív; egyrészt 1) a fejlődéskori krónikus stressz, köztük a szociális izoláció a szociális fajoknál jellemzően növeli vagy legalábbis (egyes elszigetelt esetekben) nem befolyásolja a szorongást<sup>45</sup>, másrészt 2) más elkerülő viselkedésformákban, az SPM-ben és az SP-ben ezzel ellenétes irányú reakciót láttunk, valamint 3) a szorongásoldó buspiron előkezelés visszafordította a csökkent elkerülést, tehát a széleskörben elfogadott hatásával ellenétes módon, anxiogenikumként hatott<sup>12</sup>. A fenti okokból kifolyólag lehetséges, hogy a mért csökkent elkerülés a nem megfelelő mértékű viselkedési stressz-válaszra vezethető vissza. Érzékeny fejlődési időszakban krónikus szociális izolációt, vagy maternális szeparációt elszenvedett rágcsálók esetében gyakran megfigyelnek megkésett explorációt, magasabb mozgási latenciákat, illetve a neofóbiát, amelyek jellemzően a környezet újdonságával és averzivitásával voltak összefüggésben<sup>43,44,46</sup>. Emellett zebradániók szociális izolációját követően szintén több esetben leírtak már csökkent elkerülést és alacsony lokomotoros aktivitást<sup>262,264,308</sup>. Mind a rágcsáló, mind a zebradánió eredményekkel összhangban, az általunk megfigyelt csökkent elkerülés a teszt első felére korlátozódott, tehát potenciálisan egy megkésett választ detektáltunk. A zebradániók esetében mind a szociális izoláció, mind pedig az egészséges populációkban megfigyelt megnőtt explorációs latenciák összefüggésbe hozhatók a csökkent fiziológiás stressz-válasszal<sup>263,299,311–313</sup>, illetve rágcsálók esetében az izoláció a nyugalmi-, és stressz-indukált belső állapotok eltolódásával járhat együtt, ami eredmények mind az inadekvát stressz-válasz elméletét erősítik. Ennek feltárása érdekében végeztük az SMR tesztet a nyugalmi és stresszt követő állapotokban megjelenő éberség

vizsgálatára, ahol látható, hogy míg a szociálisan tartott állatok stresszt követően a mozgó stimulushoz igazítják aktivitásukat, addig erre az izolált állatok csak nyugalmi állapotban képesek. A szociális és izolált viselkedési fenotípust összehasonlítva tehát, azok az állatok lehetnek hatékony elkerülők egy az LDT-hez hasonló vizuális kihívás során, akik képesek az újdonság-stressz hatására adekvát éberségi állapotot kialakítani, míg az érzékeny időszakban izolált társaik csak késve képesek reagálni a stresszorra. Érdekes módon az SPM és SP tesztekben az LDT-vel ellentétes, erős elkerülést mutattak az izolált állatok. Az SP-ben látott erős szociális averzió nem meglepő eredmény, az ilyen jellegű válasz ugyanis a leggyakrabban megjelenő viselkedési elváltozás krónikus szociális stresszt követően mind rágcsálók<sup>45,47,53</sup>, mind zebradániók esetében<sup>262,264,306,309</sup>. Az SPM-ben látott ellentétes eredmény, amennyiben elfogadjuk, hogy a mélykari preferencia a felszínelkerülés mérőszáma, szintén nem példa nélküli az irodalomban. Érdekes módon szorongásukat tekintve eltérő törzsekben<sup>341</sup>, vagy szorongásoldó kezeléseket követően vizsgálva azonos irányban alakulnak a két teszt elkerülési végpontjai<sup>253,321,337,345,348–350</sup>, míg bizonyos környezeti perturbációk<sup>299–302</sup>, illetve a szerotonin jelátvitel akut csökkenése<sup>255,337</sup> vagy növekedése<sup>337,342–344</sup> minden esetben ellentétesen hat ezekben a tesztekben. Az anomáliát legrészletesebben vizsgáló Maximino és munkatársai szerint az ellentmondás abban gyökerezik, hogy míg a felszínelkerülés egy menekülési válasz, addig a világos-elkerülés háttérben egy megközelítés-elkerülés konfliktus áll, és így, a rágcsálóknál leírt Daekin-Graeff hipotézist alkalmazva, a kettőt a szerotonerg jelátvitel ellentétes irányban befolyásolja<sup>298,321,374</sup>. Bár ez a munkahipotézis több ellentét feloldására alkalmas, a bevezetésben tárgyaltakból látszik, hogy a Daekin-Graeff némileg meghaladott elmélet, az SPM elkerülés a teszt jellege miatt pedig nem lehet menekülési válasz, így esetünkben feltételezhetően nem állja meg a helyét.

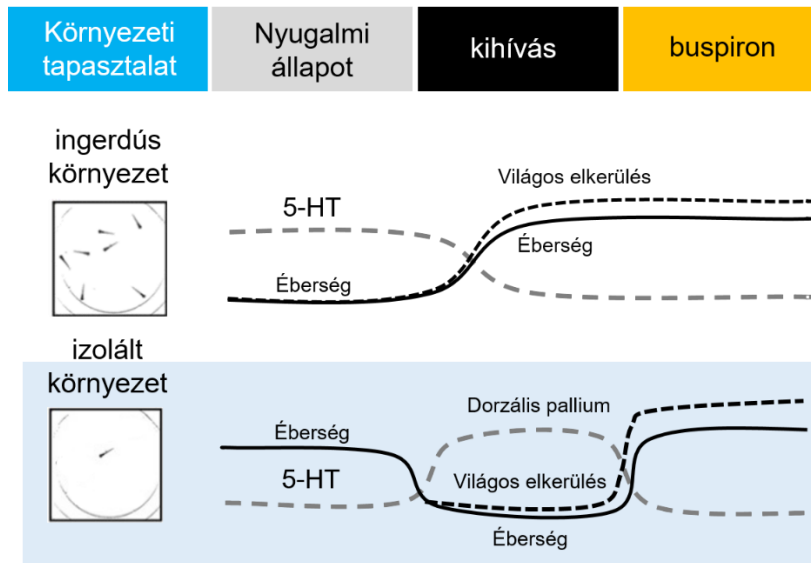
A megfigyelt defenzív viselkedési fenotípus potenciális szerotonerg háttérét vizsgáltuk a 8., 9., 10., 11., 12., és 13. Kísérletekben. Szociálisan tartott állatokban azt LDT kihívás hatására lecsökken a központi 5-HT koncentráció, mely csökkent szint máfél órával később is fennmarad. Ezzel szemben az izolált egyedekben nyugalmi állapotban alacsonyabb, míg az újdonság kihívás hatására drasztikusan megnövő 5-HT szint tapasztalható. Az 5-HT

különbségek megjelennek az LFB és a DPc területén is másfél órával a stressz után. Az LDT kihívás által kiváltott 5-HT növekedés a teljes agy és az előagyi területek szintjén is megelőzhető volt az előzetes buspiron kezeléssel, anélkül, hogy az más monoaminokat, vagy a szociálisan tartott állatok 5-HT szintjét befolyásolta volna. Ugyanez a buspiron kezelés visszaállította a szociálisan tartott egyedeknél tapasztalt világos-elkerülést, felszínelkerülést és stressz-indukálta éberségi állapotot. A szociálisan nevelt állatok esetén látott kihívás-indukált 5-HT zuhanás nem vág egybe a Maximino és munkatársai által leírtakkal, akik enyhe 5-HT növekedésről számoltak be LDT-t követően. Meg kell azonban jegyezni, hogy a csoport egyrészt extracelluláris 5-HT koncentrációt mért, másrészt kontrollnak kizárólag „handling” stressznek alávetett állatokat alkalmazott<sup>337</sup>. Az elrendezés limitációja, hogy a nyugalmi koncentrációk ismeretének hiányában nem tudhatjuk, hogy a handling stressz és az újdonság kihívás hatásai alacsonyabb szintről való eltérően megemelkedett koncentrációk, vagy magasabb tónus eltérő mértékű csökkenései voltak-e. A csoport interpretációja szerint a központi 5-HT koncentráció a világos-elkerüléssel, mint megközelítés-elkerülés konfliktuson alapuló viselkedéssel pozitívan, míg a menekülés alapú felszínelkerüléssel negatívan korrelál. Amennyiben az általunk stressz után közvetlenül mért szinteket vetjük ezzel össze, ennek fordítottját láthatjuk. Az ellentét feloldása akkor lehetséges, ha a rágszáló irodalom tanulságait felhasználva nem az aktuális 5-HT koncentrációkra és azok szorongás-asszociált viselkedéshez való viszonyára fókuszálunk, hanem az 5-HT változások irányát és dinamikáját, illetve azok több viselkedési dimenzióra gyakorolt hatását vizsgáljuk. Fontos észrevenni, hogy a kihívás hatására lecsökkenő 5-HT koncentráció nagyobb stressz-indukálta éberséggel és erős elkerüléssel, míg az izoláltan nevelt állatok esetében megfigyelt alacsonyabb nyugalmi szint, megnőtt reaktivitással, míg annak növekedése a reaktivitás és a vizuális alapú elkerülés csökkenésével asszociálódott. Ez alapján tehát a központi 5-HT változások fordítottan arányosak egy vizuális kihívás során tapasztalható reaktivitással. Ezzel összhangban van a Dreosti labor egy jelenleg még publikálás alatt álló vizsgálata, ami jelenleg a mi megközelítésünkön kívül az egyetlen olyan zebradánió modell, ahol a környezeti perturbációt a viselkedési metamorfózishoz igazították<sup>309</sup>. Eredményeik szerint a fejlődés első 3 hetében szociálisan izolált zebradániók megnövekedett idegi aktivitást mutatnak a vizuális percepcióval és stressz-válasszal összeköthető területeken, míg ez az

aktivitás egy szociális kihívás hatására alábbhagy. A nyugalmi-, és stressz-indukált belső állapotok felcserélődése tehát lehet az érzékeny időszakban fennálló ingermentes környezet következménye. Eredményeink megtámogathatók továbbá, az emlős irodalomból ismert 5-HT funkciókkal is. Míg az 5-HT tónusnak létezik egy elkerülő viselkedéssel asszociálható szerepe, annak akut csökkenése a viselkedés reorientációjával korrelál<sup>150</sup>, valamint farmakológiai<sup>172-175</sup>, optogenetikai, vagy léziós gátlása<sup>215-217,255</sup> teret enged az újdonság-indukálta lokomóciónak, valamint szenzoros percepciónak<sup>176-178</sup>, tehát egy általános, új környezet explorációt támogató, válaszkészséget növelő hatása lehet. Ezzel ellentétben az 5-HT akut emelkedése, például SSRI-k alkalmazásával, elmoshatja az újdonságkihívás által kiváltott viselkedést, például fokozott lokomóciót vagy erős elkerülést<sup>190,299,342</sup>. Ennek mintájára tehát, a szociálisan nevelt zebradániók éberségét és elkerülő viselkedését az újdonság-helyzet általt kiváltott 5-HT csökkenés facilitálhatta, míg az izolált állatok az abnormálisan megemelkedett szint miatt nem voltak képesek a fiziológias stresszindukált reaktivitás kialakítására. A kihívás előtt alkalmazott buspiron a szociálisan nevelt állatok 5-HT szintjét nem befolyásolta, mivel az egy erős csökkenést mutatott, míg az izoláltak stressz-indukálta megemelkedését képes volt kivédeni. Ez magyarázhatja egyrészt, hogy esetünkben a buspiron miért csak az izolált állatok viselkedését befolyásolta, másrészt az általános jelenséget, hogy a buspiron jellemzően csak egy stresszindukálta belső tónus jelenlétében hatékony<sup>11,21</sup>. A szerotonerg változások megjelentek az előagy, defenzív viselkedés szabályozásában központi szerepet játszó<sup>279</sup> dorzális pallium területén, azon belül annak kaudális részén, ahol az emlős BLA és hippocampusz homológ struktúrák először jelennek meg mint teljesen különálló sejtpopulációk. A BLA filogenetikailag levezetettebb gerincesekben, köztük a humán vizsgálatokban is az újdonság averzítésének kódolásában, illetve ennek nyomán a viselkedési és fiziológias stressz-válasz irányításában játszik szerepet, amely funkciót a szerotonerg rendszerrel szoros együttműködésben látja el. A zebradánióban megjelenő ilyen jellegű funkcionális kapcsolatról ezidáig nem volt adatunk.

A munkahipótezisünk tehát, hogy az 5-HT tónus nyugalmi körülmények között megszüri az ingereket, illetve arra adott válaszokat, ezzel nem-impulzív keretek közé szorítva a viselkedést. Újdonság stressz hatására a lezuhanó 5-HT szint teret enged a stressz-asszociált

fiziológias működéseknek és éberségnek, ezzel facilitálva a viselkedési választ, potenciálisan a dorzális pallimon keresztül. Ezzel ellentétben az izoláltan tartott állatok esetében látott, nyugalmi-, és stressz-indukált állapotok „felcserélődése” inadekvát reaktivitással és elkerüléssel járhat együtt. A modellünk grafikus összefoglalását a 18. ábra mutatja. Fontos azonban hozzátenni, hogy modellünk első sorban vizuális kihívásokra alkalmazható, hiszen nem-vizuális újdság során a hatások ellentétesen alakulnak. Bár ez az ellentét nem egyedülálló az irodalomban, azt jellemzően az eltérő kihívások által kiváltott viselkedésformák szabályozásának különbözőségével magyarázzák. Ezzel szemben, a mi modellünk a kihívás vizuális vagy nem-vizuális jellegére, illetve az ez által kiváltott eltérő szabályozó funkciókkal magyarázza az eltérő viselkedést.



**18. ábra: A korai szociális izoláció hatása a stresszindukált válaszkészség szerotonerg szabályozására.** Szociálisan tartott állatokban a nyugalmi körülmények között magas 5-HT tónus megszűri a környezeti ingereket, míg kihívás hatására az lecsökken, teret engedve a stresszindukált éberségnek és az adekvát elkerülési válasznak. A fejlődés során izolált zebradániók nyugalmi körülmények között alacsonyabb 5-HT szintje nem képes az ingerek szűrésére, így magas éberség jellemzi az állatokat, míg a kihívás hatására megnöve 5-HT koncentráció ezzel ellentétesen hat.

## 7. Következtetések

Kísérleteink során sikerrel állítottunk be már publikált, és fejlesztettünk új fenotipizálási eszközöket a zebradánió korai defenzív viselkedérepertoárjának vizsgálatára. Ezen felül a tesztekben mutatott viselkedés környezeti érzékenységét és fejlődését eddigi ismereteinknél részletesebben karakterizáltuk. Ezek a tesztek, különös tekintettel az SPM paradigmára, kiemelkedően hasznosak lehetnek mind a nagy-áteresztőképességű farmakológiai és genetikai szűrővizsgálatokban, mind a komplexebb etiológiai modellek fenotipizálásában, mind pedig a zebradánióra elérhető *in vivo* képalkotó eljárások alkalmazásával vizsgált élettani aspektusok viselkedési korrelátumainak leírásában. Az SPM az első modell, amely 1) képes a zebradánió legrobosztusabb szorongás-asszociált viselkedését, a felszínelkerülést több tíz állaton szimultán mérni, 2) a kísérleti körülményekre csak mérsékelten érzékeny, ami nagyban megkönnyíti az ilyen jellegű vizsgálatokat, végül pedig 3) a benne látott viselkedési végpont az fejlődés során nem változik, tehát alkalmazható a korai időszakok fenotípusának longitudinális jellemzésére. Ezen felül létrehoztunk egy szociális izolációt követő akut kihívásra adott válaszkészségen alapuló modellt, amiből számos értékes információt nyertünk és nyerhetünk a jövőben. Egyrészt 4) leírtuk, hogy az állatok fejlődésének első hónapjában történő viselkedési metamorfózis egy a viselkedés rövidtávú kifejeződése szempontjából érzékeny, és a viselkedés hosszútávú kialakulása szempontjából kritikus időszakot jelöl ki. Ebben a potenciálisan „környezeti mintavételező” szerepű időszakban, a szociális izoláció, vagyis 5) a környezeti ingerek tartós hiánya egy atipikus szerotonerg és ezzel összefüggésben szétkapcsolódott viselkedési fenotípust hozott létre, aminek vizsgálata értékes adatokkal szolgálhat az korai plasztikus időszakok fenotípusformáló szerepéről. Ugyanakkor mivel 6) a modellben mind a szociálisan tartott, mind a szociálisan izolált állatok esetében nagyon karatkeres és meglepően szimmetrikus nyugalmi-, és stressz-indukált 5-HT válaszokat detektáltunk, az alkalmas lehet a szerotonerg jelátvitel általános hatásainak vizsgálatára is. Végül, de nem utolsó sorban, 7) a modell számos, a zebradánió irodalomból ezidáig hiányzó információt szolgáltatott, ami a viselkedésneurobiológia és stressz-kutatás ezen még gyerekcipőben járó, de ígéretes ágát szolgálhatja.

## 8. Összefoglalás

A viselkedési stresszválasz inadekvát megjelenése egyes pszichiátriai betegségek központi tünete, így ezek idegrendszeri hátterét, különös tekintettel a terápiás potenciállal bíró szerotonerg rendszerre, fontos ismernünk. A stressz-kutatásban sikeres, etiológiai faktorokat alkalmazó rágcsló modellek tanulsága, hogy a szerotonerg rendszer és a viselkedési válasz kapcsolatát csak megfelelő környezeti kontrollal és részletes fenotipizálással érthetjük meg. Az utóbbi évek legdinamikusabban teret nyerő redukcionista megközelítése a zebradánió (*Danio rerio*) modell, amely sikerét az emlősökéhez hasonló, de egyszerűbb felépítésű idegrendszerének, valamint a fajra alkalmazható élettani vizsgálmódszerek egyedülálló idő-, és térbeli felbontásának köszönheti. Bár a zebradánió így alkalmas lehet az inadekvát stressz-válasz hátterében álló kérdések megválaszolására, a fajra alkalmazható etiológiai és viselkedési fenotipizálási eszköztár limitált. Doktori munkám során célul tűztem ki a zebradánió védekező viselkedésének és szerotonerg működéseinek kapcsolatát az eddigieknél részletesebben feltárni, a korai környezeti tapasztalatra épülő etiológiai megközelítéssel és a viselkedést vizsgáló eszköztár fejlesztésével. Karakterizáltam a zebradánió korai fejlődése során megjelenő védekező viselkedésformákat, korábban publikált tesztek részletesebb jellemzésével és az ún. úszó keresztpalló teszt fejlesztésével, amely elsőként alkalmas a zebradánió legrobosztusabb, szorongás-asszociált felszínkerülő viselkedésének nagy-áteresztőképességű vizsgálatára. Ezen felül leírtam egy a halak viselkedési metamorfózisával együttálló érzékeny periódust, ahol az egyedek plasztikusabb viselkedésre képesek. Az ebben az időszakban alkalmazott szociális izoláció a védekező viselkedési repertoár, valamint az azt támogató stressz-indukált éberség szétkapcsolását eredményezi, egy eddig ismeretlen szerotonerg mechanizmuson keresztül. Az izoláció hatására megváltozott 5-HT választ buspironnal csillapítva mind az éberségi, mind pedig a elkerülési válaszok megmenthetők voltak. Összefoglalva, rendelkezésünkre áll egy gerinces modell, amelyben a rágcsló vizsgálatokat felülmúló részletességű élettani vizsgálmódszereket ötvözhetjük a klasszikus etiológiai megközelítéssel és viselkedési fenotipizálással, amely révén potenciálisan eddig ismeretlen idegrendszeri mechanizmusokat és terápiás célpontokat tárhatunk fel.

## 9. Summary

Forming effective responses to environmental threats is crucial for the survival of individuals and are under control of the serotonergic system. It was previously reported that understanding the complex mediating role of serotonin requires etiological models with strong environmental control and detailed description of phenotypes. The zebrafish (*Danio rerio*) model is a promising reductionist approach to understand such phenomena due to its relatively simple central nervous system and the accessibility of state-of-the-art physiological monitoring methods. However, there are only a few etiological approaches and behavioral testing tools available in the species. In my doctoral work I aimed to give a detailed description of the serotonergic modulation of defensive behavioral responses by introducing an early life environmental perturbation based model and by developing new behavior-phenotyping tests. We characterised the early life emergence of the defensive behavioral repertoire of zebrafish by validating previously published and developing novel behavior sampling tools, e.g. the swimming plus-maze test (SPM). Best to our knowledge, the SPM is the first method that is able to measure the anxiety-associated surface avoidance behavior of larval and juvenile zebrafish in a high-throughput manner. Based on our findings, SPM is highly sensitive to pharmacological manipulations affecting human anxiety, while relatively insensitive to experimental circumstances. In addition, we described a sensitive period during the early development of zebrafish, traced out by its behavioral metamorphosis that is accompanied by enhanced behavioral plasticity. Social isolation during this period disrupts defensive behavior and stress-induced arousal by establishing an atypical serotonergic phenotype. Decreasing isolation-induced enhanced 5-HT response by the clinical anxiolytic buspirone rescued changes in stress-induced arousal state and defensive behaviour as well. In summary, we introduced a model that allows us to combine zebrafish based state-of-the-art physiological screening methods with classical etiological approaches and detailed behavioral analysis.



## 10. Irodalomjegyzék

1. Pariante, C. M. Preface. In: Pariante C. M. & Lapiz-Bluhm M. D., (szerk.) Behavioural Neurobiology of Stress-related Disorders. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2014: 6-10.
2. Risbrough V., Behavioral Correlates of Anxiety. In: Stein M. B. & Steckler T. (szerk.) Behavioral Neurobiology of Anxiety and Its Treatment. Springer-Verlag, New York, 2010: 205-228.
3. Carobrez, A. P. & Bertoglio, L. J. (2005) Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29: 1193–1205.
4. Blanchard, D. C. & Blanchard, R. J. Chapter 2.4 Defensive behaviors, fear, and anxiety. In: Blanchard, R. J., Blanchard, D. C., Griebel, G. & Nutt, D. (szerk.) *Handbook of Behavioral Neuroscience*, Elsevier, 2008: vol 17 63–79.
5. Edmunds, M. *Defence in animals: a survey of anti-predator defences*. Longman Publishing Group, Harlow, 1974
6. Kalueff, A. V., Gebhardt M., Stewart A. M., Cachat J. M., Brimmer M., Chawla J. S., Craddock C., Kyzar E. J., Roth A., Landsman S., Gaikwad S., Robinson K., Baatrup E., Tierney K., Shamchuk A., Norton W., Miller N., Nicolson T., Braubach O., Gilman C. P., Pittman J., Rosemberg D.B., Gerlai R., Echevarria D., Lamb E., Neuhauss S. C. F., Weng W., Bally-Cuif L., Schneider H., ZNRC (2013) Towards a Comprehensive Catalog of Zebrafish Behavior 1.0 and Beyond. *Zebrafish* 10: 70–86.
7. Caroline Blanchard, D., Hynd, A. L., Minke, K. A., Minemoto, T. & Blanchard, R. J. (2001) Human defensive behaviors to threat scenarios show parallels to fear- and anxiety-related defense patterns of non-human mammals. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 25: 761–770.
8. Perkins, A. M. & Corr, P. J. (2006) Reactions to threat and personality: Psychometric differentiation of intensity and direction dimensions of human defensive behaviour. *Behav. Brain Res.* 169: 21–28.
9. Green, S. & Hodges, H. Animal models of anxiety. In: Willner P. (szerk.) *Behavioural models in psychopharmacology: Theoretical, industrial and clinical perspectives*. Cambridge University Press, Cambridge, 1991: 21–49.

10. Willner, P. (1990) Animal models of depression: an overview. *Pharmacol. Ther.* 45: 425–455.
11. Haller, J., Baranyi, J., Bakos, N. & Halász, J. (2004) Social instability in female rats: effects on anxiety and buspirone efficacy. *Psychopharmacology (Berl.)* 174: 197–202.
12. Loane, C. (2012) Buspirone: What is it all about? *Brain Res.* 1461: 111–118.
13. Rodgers, R. J. & Dalvi, A. (1997) Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 21: 801–810.
14. Blanchard, D. C., Griebel, G. & Blanchard, R. J. (2001) Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 25: 205–218.
15. Blanchard, D. C., Griebel, G. & Blanchard, R. J. (2003) The Mouse Defense Test Battery: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Eur. J. Pharmacol.* 463: 97–116.
16. Haller, J., Aliczki, M. & Gyimesi Pelczer, K. (2013) Classical and novel approaches to the preclinical testing of anxiolytics: A critical evaluation. *Neurosci Biobehav Rev.* 42: 2318–30.
17. Haller, J. & Aliczki, M. (2012) Current animal models of anxiety, anxiety disorders, and anxiolytic drugs. *Curr Opin Psychiatry.* 25: 59-64.
18. Mcmillin, W. P. (1973) Oxprenolol in anxiety. *The Lancet* 301: 1193.
19. McMillin, W. P. (1975) Oxprenolol in the treatment of anxiety due to environmental stress. *Am. J. Psychiatry* 132: 965–966.
20. Fuxe, K., Agnati L., Bolme P. (1975) The possible involvement of GABA mechanisms in the action of benzodiazepines on central catecholamine neurons. *Psychopharmacol Bull.* 11: 55-6
21. Rodgers, R. J. & Johnson, N. J. T. (1995) Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 52: 297–303.
22. Köks, S., Männistö P. T., Bourin M., Shlik J., Vasar V., Vasar E. (2000) Cholecystokinin-induced anxiety in rats: relevance of pre-experimental stress and seasonal variations. *J. Psychiatry Neurosci. JPN* 25: 33–42.

23. Wang, H., Spiess, J., Wong, P. T.-H. & Zhu, Y. Z. (2011) Blockade of CRF1 and CCK2 receptors attenuated the elevated anxiety-like behavior induced by immobilization stress. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 98: 362–368.
24. Guidotti, A., Dong, E., Matsumoto, K., Pinna, G., Rasmusson, A. M., Costa, E. (2001) The socially-isolated mouse: a model to study the putative role of allopregnanolone and 5 $\alpha$ -dihydroprogesterone in psychiatric disorders. *Brain Res. Rev.* 37: 110–115.
25. Griebel, G., Simiand, J., Serradeil-Le, G. C., Wagnon, J., Pascal, M., Scatton, B., Maffrand, J. P., Soubrie, P. (2002) Anxiolytic- and antidepressant-like effects of the non-peptide vasopressin V1b receptor antagonist, SSR149415, suggest an innovative approach for the treatment of stress-related disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99: 6370–6375.
26. Heinrichs, S. C., De Souza, E. B., Schulteis, G., Lapsansky, J. L. & Grigoriadis, D. E. (2002) Brain penetrance, receptor occupancy and antistress in vivo efficacy of a small molecule corticotropin releasing factor type I receptor selective antagonist. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 27: 194–202.
27. Schoepp, D. D., Wright, R. A., Levine, L. R., Gaydos, B. & Potter, W. Z. (2003) LY354740, an mGlu2/3 receptor agonist as a novel approach to treat anxiety/stress. *Stress Amst. Neth.* 6: 189–197.
28. Sorregotti, T., Mendes-Gomes, J., Rico, J. L., Rodgers, R. J. & Nunes-de-Souza, R. L. (2013) Ethopharmacological analysis of the open elevated plus-maze in mice. *Behav. Brain Res.* 246: 76–85.
29. Bessa, J. M., Mesquita, A. R., Oliveira, M., Pêgo, J. M., Cerqueira, J. J., Palha, J. A., Almeida, O. F. X., Sousa, N. (2009) A trans-dimensional approach to the behavioral aspects of depression. *Front. Behav. Neurosci.* 3:1.
30. de Andrade, J. S., Céspedes, I. C., Abrão, I. C., Dos Santos, T. B., Diniz, L., Britto, L. R. G., Spadari-Bratfisch, R. C., Ortolani, D., Melo-Thomas, L., da Silva, R. C. B., Viana, M. B. (2013) Chronic unpredictable mild stress alters an anxiety-related defensive response, Fos immunoreactivity and hippocampal adult neurogenesis. *Behav. Brain Res.* 250: 81–90.
31. Malki, K., Mineur, Y. S., Tosto, M. G., Campbell, J., Karia, P., Jumabhoy, I., Sluyter, F., Crusio, W. E., Schalkwyk, L. C. (2015) Pervasive and opposing effects of Unpredictable

Chronic Mild Stress (UCMS) on hippocampal gene expression in BALB/cJ and C57BL/6J mouse strains. *BMC Genomics* 16:262.

32. Dubowitz, H. & Bennett, S. (2007) Physical abuse and neglect of children. *Lancet Lond. Engl.* 369: 1891–1899.

33. Bath, K. G., Russo, S. J., Pleil, K. E., Wohleb, E. S., Duman, R. S., Radley, J. J. (2017) Circuit and synaptic mechanisms of repeated stress: Perspectives from differing contexts, duration, and development. *Neurobiol. Stress* 7: 137–151.

34. McKim, D. B., Patterson, J. M., Wohleb, E. S., Jarrett, B. L., Reader, B. F., Godbout, J. P., Sheridan, J. F. (2016) Sympathetic Release of Splenic Monocytes Promotes Recurring Anxiety Following Repeated Social Defeat. *Biol. Psychiatry* 79: 803–813.

35. Ramirez, K., Shea, D. T., McKim, D. B., Reader, B. F. & Sheridan, J. F. (2015) Imipramine attenuates neuroinflammatory signaling and reverses stress-induced social avoidance. *Brain. Behav. Immun.* 46: 212–220.

36. Ramirez, K., Fornaguera-Trías, J. & Sheridan, J. F. (2017) Stress-Induced Microglia Activation and Monocyte Trafficking to the Brain Underlie the Development of Anxiety and Depression. *Curr. Top. Behav. Neurosci.* 31: 155–172.

37. Ramirez, K. & Sheridan, J. F. (2016) Antidepressant imipramine diminishes stress-induced inflammation in the periphery and central nervous system and related anxiety- and depressive- like behaviors. *Brain. Behav. Immun.* 57: 293–303.

38. Stein, D. J., Vasconcelos, M. F., Albrechet-Souza, L., Ceresér, K. M. M. & de Almeida, R. M. M. (2017) Microglial Over-Activation by Social Defeat Stress Contributes to Anxiety- and Depressive-Like Behaviors. *Front. Behav. Neurosci.* 11: 207.

39. Tong, L., Gong, Y., Wang, P., Hu, W., Wang, J., Chen, Z., Zhang, W., Huang, C. (2017) Microglia Loss Contributes to the Development of Major Depression Induced by Different Types of Chronic Stresses. *Neurochem. Res.* 42: 2698–2711.

40. Wohleb, E. S., McKim, D. B., Sheridan, J. F. & Godbout, J. P. (2014) Monocyte trafficking to the brain with stress and inflammation: a novel axis of immune-to-brain communication that influences mood and behavior. *Front. Neurosci.* 8: 447.

41. Arakawa, H. (2005) Interaction between isolation rearing and social development on exploratory behavior in male rats. *Behav. Processes* 70: 223–234.

42. Arakawa, H. (2007) Ontogeny of sex differences in defensive burying behavior in rats: effect of social isolation. *Aggress. Behav.* 33: 38–47.
43. Einon, D. F. & Morgan, M. J. (1977) A critical period for social isolation in the rat. *Dev. Psychobiol.* 10: 123–132.
44. Lukkes, J. L., Summers, C. H., Scholl, J. L., Renner, K. J. & Forster, G. L. (2009) Early life social isolation alters corticotropin-releasing factor responses in adult rats. *Neuroscience* 158: 845–855.
45. Lukkes, J. L., Watt, M. J., Lowry, C. A. & Forster, G. L. (2009) Consequences of Post-Weaning Social Isolation on Anxiety Behavior and Related Neural Circuits in Rodents. *Front. Behav. Neurosci.* 3:18.
46. Parker, M. O., Millington, M. E., Combe, F. J., Brennan, C. H. (2012) Housing Conditions Differentially Affect Physiological and Behavioural Stress Responses of Zebrafish, as well as the Response to Anxiolytics. *Plos One* 7: e34992.
47. Weiss, I. C., Pryce, C. R., Jongen-Rêlo, A. L., Nanz-Bahr, N. I. & Feldon, J. (2004) Effect of social isolation on stress-related behavioural and neuroendocrine state in the rat. *Behav. Brain Res.* 152: 279–295.
48. Wright, I. K., Upton, N. & Marsden, C. A. (1991) Resocialisation of isolation-reared rats does not alter their anxiogenic profile on the elevated X-maze model of anxiety. *Physiol. Behav.* 50: 1129–1132.
49. Brenes, J. C., Rodríguez, O. & Fornaguera, J. (2008) Differential effect of environment enrichment and social isolation on depressive-like behavior, spontaneous activity and serotonin and norepinephrine concentration in prefrontal cortex and ventral striatum. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 89: 85–93.
50. Brenes, J. C. & Fornaguera, J. (2009) The effect of chronic fluoxetine on social isolation-induced changes on sucrose consumption, immobility behavior, and on serotonin and dopamine function in hippocampus and ventral striatum. *Behav. Brain Res.* 198: 199–205.
51. Thorsell, A., Slawecki, C. J., El Khoury, A., Mathe, A. A. & Ehlers, C. L. (2006) The effects of social isolation on neuropeptide Y levels, exploratory and anxiety-related behaviors in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 83: 28–34.

52. Fulford, A. J. & Marsden, C. A. (1998) Effect of isolation-rearing on conditioned dopamine release in vivo in the nucleus accumbens of the rat. *J. Neurochem.* 70: 384–390.
53. Fulford, A. J. & Marsden, C. A. (1998) Conditioned release of 5-hydroxytryptamine in vivo in the nucleus accumbens following isolation-rearing in the rat. *Neuroscience* 83: 481–487.
54. Holmes, A., le Guisquet, A. M., Vogel, E., Millstein, R. A., Leman, S., Belzung, C. (2005) Early life genetic, epigenetic and environmental factors shaping emotionality in rodents. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29: 1335–1346.
55. Caldji, C., Diorio, J. & Meaney, M. J. (2000) Variations in maternal care in infancy regulate the development of stress reactivity. *Biol. Psychiatry* 48: 1164–1174.
56. Huot, R. L., Thirivikraman, K. V., Meaney, M. J. & Plotsky, P. M. (2001) Development of adult ethanol preference and anxiety as a consequence of neonatal maternal separation in Long Evans rats and reversal with antidepressant treatment. *Psychopharmacology (Berl.)* 158: 366–373.
57. Patchev, V. K., Montkowski, A., Rouskova, D., Koranyi, L., Holsboer, F., Almeida, O. F. (1997) Neonatal treatment of rats with the neuroactive steroid tetrahydrodeoxycorticosterone (THDOC) abolishes the behavioral and neuroendocrine consequences of adverse early life events. *J. Clin. Invest.* 99: 962–966.
58. Menard, J. L., Champagne, D. L. & Meaney, M. J. P. (2004) Variations of maternal care differentially influence ‘fear’ reactivity and regional patterns of cFos immunoreactivity in response to the shock-probe burying test. *Neuroscience* 129: 297–308.
59. Pryce, C. R., Bettschen, D., Bahr, N. I. & Feldon, J. (2001) Comparison of the effects of infant handling, isolation, and nonhandling on acoustic startle, prepulse inhibition, locomotion, and HPA activity in the adult rat. *Behav. Neurosci.* 115: 71–83.
60. Ogawa, T., Mikuni, M., Kuroda, Y., Muneoka, K., Mori, K. J., Takahashi K. (1994) Periodic maternal deprivation alters stress response in adult offspring: potentiates the negative feedback regulation of restraint stress-induced adrenocortical response and reduces the frequencies of open field-induced behaviors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 49: 961–967.
61. Matthews, K., Hall, F. S., Wilkinson, L. S. & Robbins, T. W. (1996) Retarded acquisition and reduced expression of conditioned locomotor activity in adult rats following repeated

early maternal separation: effects of prefeeding, d-amphetamine, dopamine antagonists and clonidine. *Psychopharmacology (Berl.)* 126: 75–84.

62. Gray, J. A. *The Neuropsychology of Anxiety. SECOND EDITION*, Oxford Medical Publications, Oxford, 2003

63. Gray, J. A. & McNaughton, N. *The Neuropsychology of Anxiety: An Enquiry into the Functions of the Septo-Hippocampal System*. In: Gray, J. A. (szerk.) *The Neuropsychology of Anxiety SECOND EDITION*, Oxford Medical Publications, Oxford, 2003

64. Tamamaki, N. & Nojyo, Y. (1995) Preservation of topography in the connections between the subiculum, field CA1, and the entorhinal cortex in rats. *J. Comp. Neurol.* 353: 379–390.

65. van Groen, T. & Wyss, J. M. (1990) Extrinsic projections from area CA1 of the rat hippocampus: olfactory, cortical, subcortical, and bilateral hippocampal formation projections. *J. Comp. Neurol.* 302: 515–528.

66. Vinogradova, O. S. (2001) Hippocampus as comparator: role of the two input and two output systems of the hippocampus in selection and registration of information. *Hippocampus* 11: 578–598.

67. Witter, M. P., Griffioen, A. W., Jorritsma-Byham, B. & Krijnen, J. L. (1988) Entorhinal projections to the hippocampal CA1 region in the rat: an underestimated pathway. *Neurosci. Lett.* 85: 193–198.

68. Hale, M. W., Bouwknecht, J. A., Spiga, F., Shekhar, A. & Lowry, C. A. (2006) Exposure to high- and low-light conditions in an open-field test of anxiety increases c-Fos expression in specific subdivisions of the rat basolateral amygdaloid complex. *Brain Res. Bull.* 71: 174–182.

69. McHugh, S. B., Deacon, R. M. J., Rawlins, J. N. P. & Bannerman, D. M. (2004) Amygdala and ventral hippocampus contribute differentially to mechanisms of fear and anxiety. *Behav. Neurosci.* 118: 63–78.

70. Kjelstrup, K. G., Tuvnes, F. A., Steffenach, H., Murison, R., Moser, E. I., Moser M. (2002) Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99: 10825–10830.

71. Bertoglio, L. J., Joca, S. R. L. & Guimarães, F. S. (2006) Further evidence that anxiety and memory are regionally dissociated within the hippocampus. *Behav. Brain Res.* 175: 183–188.
72. Degroot, A. & Treit, D. (2004) Anxiety is functionally segregated within the septo-hippocampal system. *Brain Res.* 1001: 60–71.
73. Nascimento Häckl, L. P. & Carobrez, A. P. (2007) Distinct ventral and dorsal hippocampus AP5 anxiolytic effects revealed in the elevated plus-maze task in rats. *Neurobiol. Learn. Mem.* 88: 177–185.
74. Singewald, N., Salchner, P. & Sharp, T. (2003) Induction of c-Fos expression in specific areas of the fear circuitry in rat forebrain by anxiogenic drugs. *Biol. Psychiatry* 53: 275–283.
75. File, S. E. & Gonzalez, L. E. (1996) Anxiolytic effects in the plus-maze of 5-HT<sub>1A</sub>-receptor ligands in dorsal raphé and ventral hippocampus. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 54: 123–128.
76. Sajdyk, T. J. & Shekhar, A. (1997) Excitatory amino acid receptor antagonists block the cardiovascular and anxiety responses elicited by gamma-aminobutyric acidA receptor blockade in the basolateral amygdala of rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 283: 969–977.
77. Sajdyk, T. J. & Shekhar, A. (2000) Sodium lactate elicits anxiety in rats after repeated GABA receptor blockade in the basolateral amygdala. *Eur. J. Pharmacol.* 394: 265–273.
78. Spiga, F., Lightman, S. L., Shekhar, A. & Lowry, C. A. (2006) Injections of urocortin 1 into the basolateral amygdala induce anxiety-like behavior and c-Fos expression in brainstem serotonergic neurons. *Neuroscience* 138: 1265–1276.
79. Shekhar, A., Keim, S. R., Simon, J. R. & McBride, W. J. (1996) Dorsomedial hypothalamic GABA dysfunction produces physiological arousal following sodium lactate infusions. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 55: 249–256.
80. Graeff, F. G., Guimarães, F. S., De Andrade, T. G. & Deakin, J. F. (1996) Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 54: 129–141.
81. Dampney, R. A. (1994) Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. *Physiol. Rev.* 74: 323–364.



82. de Bortoli, V. C., Nogueira, R. L. & Zangrossi, H. (2008) Alprazolam potentiates the antiaversive effect induced by the activation of 5-HT(1A) and 5-HT (2A) receptors in the rat dorsal periaqueductal gray. *Psychopharmacology (Berl.)* 198: 341–349.
83. Bueno, C. H., Zangrossi, H., Nogueira, R. L., Soares, V. P. & Viana, M. B. (2005) Panicolytic-like effect induced by the stimulation of GABAA and GABAB receptors in the dorsal periaqueductal grey of rats. *Eur. J. Pharmacol.* 516: 239–246.
84. de Menezes, R. C. A., Zaretsky, D. V., Sarkar, S., Fontes, M. A. P. & Dimicco, J. A. (2008) Microinjection of muscimol into the periaqueductal gray suppresses cardiovascular and neuroendocrine response to air jet stress in conscious rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 295: R881-890.
85. Jenck, F., Moreau, J. L. & Martin, J. R. (1995) Dorsal periaqueductal gray-induced aversion as a simulation of panic anxiety: elements of face and predictive validity. *Psychiatry Res.* 57: 181–191.
86. Graeff, F. G., Brandão, M. L., Audi, E. A. & Schütz, M. T. (1986) Modulation of the brain aversive system by GABAergic and serotonergic mechanisms. *Behav. Brain Res.* 22: 173–180.
87. van Groen, T., Kadish, I. & Wyss, J. M. (1999) Efferent connections of the anteromedial nucleus of the thalamus of the rat. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 30: 1–26.
88. Vogt BA, Vogt L & Farber NB. Cingulate cortex and disease models. In Paxinos G (szerk.) *The rat nervous system*. Elsevier, San Diego, 2004: 705–727.
89. Sripanidkulchai, K., Sripanidkulchai, B. & Wyss, J. M. (1984) The cortical projection of the basolateral amygdaloid nucleus in the rat: a retrograde fluorescent dye study. *J. Comp. Neurol.* 229: 419–431.
90. Aggleton, J. P. & Brown, M. W. (1999) Episodic memory, amnesia, and the hippocampal-anterior thalamic axis. *Behav. Brain Sci.* 22: 425–444
91. Jay, T. M., Glowinski, J. & Thierry, A. M. (1989) Selectivity of the hippocampal projection to the prelimbic area of the prefrontal cortex in the rat. *Brain Res.* 505: 337–340.
92. Chiba, T., Kayahara, T. & Nakano, K. (2001) Efferent projections of infralimbic and prelimbic areas of the medial prefrontal cortex in the Japanese monkey, *Macaca fuscata*. *Brain Res.* 888: 83–101.

93. Freedman, L. J., Insel, T. R. & Smith, Y. (2000) Subcortical projections of area 25 (subgenual cortex) of the macaque monkey. *J. Comp. Neurol.* 421: 172–188.
94. Zhou, T. C., Geisler, S., Marinelli, M., Degarmo, B. A. & Zahm, D. S. (2009) The mesopontine rostromedial tegmental nucleus: A structure targeted by the lateral habenula that projects to the ventral tegmental area of Tsai and substantia nigra compacta. *J. Comp. Neurol.* 513: 566–596.
95. McDonald, A. J., Mascagni, F. & Guo, L. (1996) Projections of the medial and lateral prefrontal cortices to the amygdala: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study in the rat. *Neuroscience* 71: 55–75.
96. Sesack, S. R., Deutch, A. Y., Roth, R. H. & Bunney, B. S. (1989) Topographical organization of the efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tract-tracing study with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *J. Comp. Neurol.* 290: 213–242.
97. Takagishi, M. & Chiba, T. (1991) Efferent projections of the infralimbic (area 25) region of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tracer PHA-L study. *Brain Res.* 566: 26–39.
98. Vertes, R. P. (2004) Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synap. N. Y. N.* 51: 32–58.
99. Hajós, M., Richards, C. D., Székely, A. D. & Sharp, T. (1998) An electrophysiological and neuroanatomical study of the medial prefrontal cortical projection to the midbrain raphe nuclei in the rat. *Neuroscience* 87: 95–108.
100. Nitschke, J. B., Sarinopoulos, I., Oathes, D. J., Johnstone, T., Whalen, P. J., Davidson, R. J., Kalin, N. H. (2009) Anticipatory activation in the amygdala and anterior cingulate in generalized anxiety disorder and prediction of treatment response. *Am. J. Psychiatry* 166: 302–310.
101. Straube, T., Schmidt, S., Weiss, T., Mentzel, H.-J. & Miltner, W. H. R. (2009) Dynamic activation of the anterior cingulate cortex during anticipatory anxiety. *NeuroImage* 44: 975–981.

102. Salchner, P., Sartori, S. B., Sinner, C., Wigger, A., Frank, E., Landgraf, R., Singewald N. (2006) Airjet and FG-7142-induced Fos expression differs in rats selectively bred for high and low anxiety-related behavior. *Neuropharmacology* 50: 1048–1058.
103. Salomé, N., Salchner, P., Viltart, O., Sequeira, H., Wigger, A., Landgraf, R., Singewald, N. (2004) Neurobiological correlates of high (HAB) versus low anxiety-related behavior (LAB): differential Fos expression in HAB and LAB rats. *Biol. Psychiatry* 55: 715–723.
104. Radley, J. J., Arias, C. M. & Sawchenko, P. E. (2006) Regional differentiation of the medial prefrontal cortex in regulating adaptive responses to acute emotional stress. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26: 12967–12976.
105. Azmitia, E. C. & Segal, M. (1978) An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. *J. Comp. Neurol.* 179: 641–667.
106. Deakin, J. F. & Graeff, F. G. (1991) 5-HT and mechanisms of defence. *J. Psychopharmacol. Oxf. Engl.* 5: 305–315.
107. Kirby, L. G., Pernar, L., Valentino, R. J. & Beck, S. G. (2003) Distinguishing characteristics of serotonin and non-serotonin-containing cells in the dorsal raphe nucleus: electrophysiological and immunohistochemical studies. *Neuroscience* 116: 669–683.
108. Kosofsky, B. E. & Molliver, M. E. (1987) The serotonergic innervation of cerebral cortex: different classes of axon terminals arise from dorsal and median raphe nuclei. *Synap. N. Y. N.* 1: 153–168.
109. Wilson, M. A., Mamounas, L. A., Fasman, K. H., Axt, K. J. & Molliver, M. E. (1993) Reactions of 5-HT neurons to drugs of abuse: neurotoxicity and plasticity. *NIDA Res. Monogr.* 136: 155–178; discussion 178-187.
110. Balázsfi, D., Zelena, D., Demeter, K., Miskolczi, C., Varga, Z. K., Nagyvárad, A., Nyíri, G., Cserép, Cs., Baranyi, M., Sperlág, B., Haller, J. (2018) Differential Roles of the Two Raphe Nuclei in Amiable Social Behavior and Aggression - An Optogenetic Study. *Front. Behav. Neurosci.* 12: 163.
111. Grahame-Smith, D. G. (1964) Tryptophan hydroxylation in brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 16: 586–592.

112. Ruddick, J. P., Evans, A. K., Nutt, D. J., Lightman, S. L., Rook, G. A. W., Lowry, C. A. (2006) Tryptophan metabolism in the central nervous system: medical implications. *Expert Rev. Mol. Med.* 8: 1–27.
113. Walther, D. J. & Bader, M. (2003) A unique central tryptophan hydroxylase isoform. *Biochem. Pharmacol.* 66: 1673–1680.
114. Nakamura, K., Sugawara, Y., Sawabe, K., Ohashi, A., Tsurui, H., Xiu, Y., Ohtsuji, M., Lin, Q. S., Nishimura, H., Hasegawa, H., Hirose, S. (2006) Late developmental stage-specific role of tryptophan hydroxylase 1 in brain serotonin levels. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26: 530–534.
115. Miwa, S., Watanabe, Y. & Hayaishi, O. (1985) 6R-L-erythro-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin as a regulator of dopamine and serotonin biosynthesis in the rat brain. *Arch. Biochem. Biophys.* 239: 234–241.
116. Yamauchi, T. & Fujisawa, H. (1983) Purification and characterization of the brain calmodulin-dependent protein kinase (kinase II), which is involved in the activation of tryptophan 5-monooxygenase. *Eur. J. Biochem.* 132: 15–21.
117. Evans, A. K., Reinders, N., Ashford, K. A., Christie, I. N., Wakerley, J. B., Lowry, C. A. (2008) Evidence for serotonin synthesis-dependent regulation of in vitro neuronal firing rates in the midbrain raphe complex. *Eur. J. Pharmacol.* 590: 136–149.
118. Azmitia, E. C. & McEwen, B. S. (1974) Adrenalcortical influence on rat brain tryptophan hydroxylase activity. *Brain Res.* 78: 291–302.
119. Evans, A. K., Heerkens, J. L. T. & Lowry, C. A. (2009) Acoustic stimulation in vivo and corticotropin-releasing factor in vitro increase tryptophan hydroxylase activity in the rat caudal dorsal raphe nucleus. *Neurosci. Lett.* 455: 36–41.
120. Schuldiner, S., Shirvan, A. & Linial, M. (1995) Vesicular neurotransmitter transporters: from bacteria to humans. *Physiol. Rev.* 75: 369–392.
121. Blakely, R. D., DeFelice, L. J. & Galli, A. (2005) Biogenic amine neurotransmitter transporters: just when you thought you knew them. *Physiol. Bethesda Md* 20: 225–231.
122. Murphy, D. L., Lerner, A., Rudnick, G. & Lesch, K.-P. (2004) Serotonin transporter: gene, genetic disorders, and pharmacogenetics. *Mol. Interv.* 4: 109–123.

123. Beck, O., Borg, S., Edman, G., Fyrö, B., Oxenstierna, G., Sedvall, G. (1984) 5-hydroxytryptophol in human cerebrospinal fluid: conjugation, concentration gradient, relationship to 5-hydroxyindoleacetic acid, and influence of hereditary factors. *J. Neurochem.* 43: 58–61.
124. Bortolato, M., Godar, S. C., Davarian, S., Chen, K. & Shih, J. C. (2009) Behavioral disinhibition and reduced anxiety-like behaviors in monoamine oxidase B-deficient mice. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 34: 2746–2757.
125. Sabelli, H. C. & Javaid, J. I. (1995) Phenylethylamine modulation of affect: therapeutic and diagnostic implications. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* 7: 6–14.
126. Barnes, N. M. & Sharp, T. (1999) A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 38: 1083–1152.
127. Bockaert, J., Claeysen, S., Bécamel, C., Dumuis, A. & Marin, P. (2006) Neuronal 5-HT metabotropic receptors: fine-tuning of their structure, signaling, and roles in synaptic modulation. *Cell Tissue Res.* 326: 553–572.
128. Hoyer, D., Hannon, J. P. & Martin, G. R. (2002) Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 71: 533–554.
129. Lowry, C. A., Johnson, P. L., Hay-Schmidt, A., Mikkelsen, J. & Shekhar, A. (2005) Modulation of anxiety circuits by serotonergic systems. *Stress Amst. Neth.* 8: 233–246.
130. Kerman, I. A., Shabrang, C., Taylor, L., Akil, H. & Watson, S. J. (2006) Relationship of presympathetic-premotor neurons to the serotonergic transmitter system in the rat brainstem. *J. Comp. Neurol.* 499: 882–896.
131. Imai, H., Steindler, D. A. & Kitai, S. T. (1986) The organization of divergent axonal projections from the midbrain raphe nuclei in the rat. *J. Comp. Neurol.* 243: 363–380.
132. McCall, R. B. & Aghajanian, G. K. (1979) Serotonergic facilitation of facial motoneuron excitation. *Brain Res.* 169: 11–27.
133. Pum, M., Carey, R. J., Huston, J. P. & Müller, C. P. (2007) Dissociating effects of cocaine and d-amphetamine on dopamine and serotonin in the perirhinal, entorhinal, and prefrontal cortex of freely moving rats. *Psychopharmacology (Berl.)* 193: 375–390.

134. Pum, M. E., Huston, J. P., De Souza Silva, M. A. & Müller, C. P. (2008) Visual sensory-motor gating by serotonin activation in the medial prefrontal and occipital, but not in the rhinal, cortices in rats. *Neuroscience* 153: 361–372.
135. White, S. R. & Neuman, R. S. (1980) Facilitation of spinal motoneurone excitability by 5-hydroxytryptamine and noradrenaline. *Brain Res.* 188: 119–127.
136. Arnsten, A. F. & Goldman-Rakic, P. S. (1984) Selective prefrontal cortical projections to the region of the locus coeruleus and raphe nuclei in the rhesus monkey. *Brain Res.* 306: 9–18.
137. Jodo, E., Chiang, C. & Aston-Jones, G. (1998) Potent excitatory influence of prefrontal cortex activity on noradrenergic locus coeruleus neurons. *Neuroscience* 83: 63–79.
138. Kaehler, S. T., Singewald, N. & Philippu, A. (1999) Dependence of serotonin release in the locus coeruleus on dorsal raphe neuronal activity. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 359: 386–393.
139. Luppi, P. H., Aston-Jones, G., Akaoka, H., Chouvet, G. & Jouvet, M. (1995) Afferent projections to the rat locus coeruleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing with cholera-toxin B subunit and Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *Neuroscience* 65: 119–160.
140. Vertes, R. P. & Kocsis, B. (1994) Projections of the dorsal raphe nucleus to the brainstem: PHA-L analysis in the rat. *J. Comp. Neurol.* 340: 11–26.
141. Beart, P. M. & McDonald, D. (1982) Neurochemical studies of the mesolimbic dopaminergic pathway: [<sup>3</sup>H]spiperone labels two bindings sites in homogenates of the nucleus accumbens of rat brain. *J. Neurochem.* 39: 1452–1460.
142. Broderick, P. A. & Phelix, C. F. I. (1997) Serotonin (5-HT) within dopamine reward circuits signals open-field behavior. II. Basis for 5-HT--DA interaction in cocaine dysfunctional behavior. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 21: 227–260.
143. Hervé, D., Pickel, V. M., Joh, T. H. & Beaudet, A. (1987) Serotonin axon terminals in the ventral tegmental area of the rat: fine structure and synaptic input to dopaminergic neurons. *Brain Res.* 435: 71–83.
144. Nedergaard, S., Bolam, J. P. & Greenfield, S. A. (1988) Facilitation of a dendritic calcium conductance by 5-hydroxytryptamine in the substantia nigra. *Nature* 333: 174–177.

145. Van Bockstaele, E. J., Cestari, D. M. & Pickel, V. M. (1994) Synaptic structure and connectivity of serotonin terminals in the ventral tegmental area: potential sites for modulation of mesolimbic dopamine neurons. *Brain Res.* 647: 307–322.
146. Maier, S. F. & Watkins, L. R. (2005) Stressor controllability and learned helplessness: the roles of the dorsal raphe nucleus, serotonin, and corticotropin-releasing factor. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29: 829–841.
147. Linthorst, A. C., Flachskamm, C., Barden, N., Holsboer, F. & Reul, J. M. (2000) Glucocorticoid receptor impairment alters CNS responses to a psychological stressor: an in vivo microdialysis study in transgenic mice. *Eur. J. Neurosci.* 12: 283–291.
148. Linthorst, A. C. E. & Reul, J. M. H. M. CHAPTER 4.1 - The Impact of Stress on Serotonergic Neurotransmission. In Müller, C. P. & Jacobs, B. L (szerk.) *Handbook of Behavioral Neuroscience*, Elsevier, 2010: vol. 21 475–491
149. Rueter, L. E. & Jacobs, B. L. (1996) A microdialysis examination of serotonin release in the rat forebrain induced by behavioral/environmental manipulations. *Brain Res.* 739: 57–69.
150. Jacobs, B. L. & Fornal, C. A. (1991) Activity of brain serotonergic neurons in the behaving animal. *Pharmacol. Rev.* 43: 563–578.
151. Stutzmann, G. E., McEwen, B. S. & LeDoux, J. E. (1998) Serotonin modulation of sensory inputs to the lateral amygdala: dependency on corticosterone. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 18: 9529–9538.
152. Fornal, C. A., Metzler, C. W., Gallegos, R. A., Veasey, S. C., McCreary, A. C., Jacobs, B. L. (1996) WAY-100635, a potent and selective 5-hydroxytryptamine<sub>1A</sub> antagonist, increases serotonergic neuronal activity in behaving cats: comparison with (S)-WAY-100135. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 278: 752–762.
153. Beekman, M., Flachskamm, C. & Linthorst, A. C. E. (2005) Effects of exposure to a predator on behaviour and serotonergic neurotransmission in different brain regions of C57bl/6N mice. *Eur. J. Neurosci.* 21: 2825–2836.
154. Linthorst, A. C. E., Flachskamm, C. & Reul, J. M. H. M. (2008) Water temperature determines neurochemical and behavioural responses to forced swim stress: An in vivo microdialysis and biotelemetry study in rats. *Stress* 11: 88–100.

155. Muchimapura, S., Fulford, A. J., Mason, R. & Marsden, C. A. (2002) Isolation rearing in the rat disrupts the hippocampal response to stress. *Neuroscience* 112: 697–705.
156. Wilkinson, L. S., Humby, T., Killcross, S., Robbins, T. W. & Everitt, B. J. (1996) Dissociations in hippocampal 5-hydroxytryptamine release in the rat following Pavlovian aversive conditioning to discrete and contextual stimuli. *Eur. J. Neurosci.* 8: 1479–1487.
157. Amat, J., Baratta, M. V., Paul, E., Bland, S. T., Watkins, L. R., Maier, S. F. (2005) Medial prefrontal cortex determines how stressor controllability affects behavior and dorsal raphe nucleus. *Nat. Neurosci.* 8: 365–371.
158. Heinsbroek, R. P., van Haaren, F., Feenstra, M. G., Boon, P. & van de Poll, N. E. (1991) Controllable and uncontrollable footshock and monoaminergic activity in the frontal cortex of male and female rats. *Brain Res.* 551: 247–255.
159. Grønli, J., Fiske, E., Murison, R., Bjorvatn, B., Sørensen, E., Ursin, R., Portas, C. M. (2007) Extracellular levels of serotonin and GABA in the hippocampus after chronic mild stress in rats. A microdialysis study in an animal model of depression. *Behav. Brain Res.* 181: 42–51.
160. Adell, A., Garcia-Marquez, C., Armario, A. & Gelpi, E. (1988) Chronic stress increases serotonin and noradrenaline in rat brain and sensitizes their responses to a further acute stress. *J. Neurochem.* 50: 1678–1681.
161. Bickerdike, M. J., Wright, I. K. & Marsden, C. A. (1993) Social isolation attenuates rat forebrain 5-HT release induced by KCI stimulation and exposure to a novel environment. *Behav. Pharmacol.* 4: 231–236.
162. Miura, H., Qiao, H. & Ohta, T. (2002) Attenuating effects of the isolated rearing condition on increased brain serotonin and dopamine turnover elicited by novelty stress. *Brain Res.* 926: 10–17.
163. Miura, H., Qiao, H. & Ohta, T. (2002) Influence of aging and social isolation on changes in brain monoamine turnover and biosynthesis of rats elicited by novelty stress. *Synap. N. Y.* N 46: 116–124.
164. Jones, G. H., Hernandez, T. D., Kendall, D. A., Marsden, C. A. & Robbins, T. W. (1992) Dopaminergic and serotonergic function following isolation rearing in rats: study of



behavioural responses and postmortem and in vivo neurochemistry. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 43: 17–35.

165. Whitaker-Azmitia, P., Zhou, F., Hobin, J. & Borella, A. (2000) Isolation-rearing of rats produces deficits as adults in the serotonergic innervation of hippocampus. *Peptides* 21: 1755–1759.

166. Gos, T., Becker, K., Bock, J., Malecki, U., Bogerts, B., Poeggel, G., Braun, K. (2006) Early neonatal and postweaning social emotional deprivation interferes with the maturation of serotonergic and tyrosine hydroxylase-immunoreactive afferent fiber systems in the rodent nucleus accumbens, hippocampus and amygdala. *Neuroscience* 140: 811–821.

167. Lehmann, K., Lesting, J., Polascheck, D. & Teuchert-Noodt, G. (2003) Serotonin fibre densities in subcortical areas: differential effects of isolated rearing and methamphetamine. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 147: 143–152.

168. Beaulieu, J., Zhang, X., Rodriguiz, R. M., Sotnikova, T. D., Cools, M. J., Wetsel, W. C., Gainetdinov, R. R., Caron, M. G. (2008) Role of GSK3 beta in behavioral abnormalities induced by serotonin deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105: 1333–1338.

169. Griebel, G., Belzung, C., Perrault, G. & Sanger, D. J. (2000) Differences in anxiety-related behaviours and in sensitivity to diazepam in inbred and outbred strains of mice. *Psychopharmacology (Berl.)* 148: 164–170.

170. Hendricks, T. J., Fyodorov, D. V., Wegman, L. J., Lelutiu, N. B., Pehek, E. A., Yamamoto, B., Silver, J., Weeber, E. J., Sweatt, J. D., Deneris, E. S. (2003) Pet-1 ETS gene plays a critical role in 5-HT neuron development and is required for normal anxiety-like and aggressive behavior. *Neuron* 37: 233–247.

171. Dai, J., Han, H., Tian, M., Cao, J., Xiu, J., Song, N., Huang, Y., Xu, T., Ding, Y., Xu, L. (2008) Enhanced contextual fear memory in central serotonin-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105: 11981–11986.

172. Depue, R. A. & Spoont, M. R. (1986) A Behavioral Dimension of Constraint. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 487: 47–62.

173. Soubrié, P. (1986) Reconciling the role of central serotonin neurons in human and animal behavior. *Behavioral and Brain Sciences.* 9: 319-335

174. Spoont, M. R. (1992) Modulatory role of serotonin in neural information processing: Implications for human psychopathology. *Psychol. Bull.* 112: 330–350.
175. Gerson, S. C. & Baldessarini, R. J. (1980) Motor effects of serotonin in the central nervous system. *Life Sci.* 27: 1435–1451.
176. Brody, J. F. (1970) Behavioral effects of serotonin depletion and of p-chlorophenylalanine (a serotonin depletor) in rats. *Psychopharmacologia* 17: 14–33.
177. Mabry, P. D. & Campbell, B. A. (1974) Ontogeny of serotonergic inhibition of behavioral arousal in the rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 86: 193–201.
178. Mabry, P. D. & Campbell, B. A. (1973) Serotonergic inhibition of catecholamine-induced behavioral arousal. *Brain Res.* 49: 381–391.
179. Fukui, M., Rodriguiz, R. M., Zhou, J., Jiang, S. X., Phillips, L. E., Caron, M. G., Wetsel, W. C. (2007) Vmat2 heterozygous mutant mice display a depressive-like phenotype. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27: 10520–10529.
180. Carroll, J. C., Boyce-Rustay, J. M., Millstein, R., Yang, R., Wiedholz, L. M., Murphy, D. L., Holmes, A. (2007) Effects of mild early life stress on abnormal emotion-related behaviors in 5-HTT knockout mice. *Behav. Genet.* 37: 214–222.
181. Holmes, A., Lit, Q., Murphy, D. L., Gold, E. & Crawley, J. N. (2003) Abnormal anxiety-related behavior in serotonin transporter null mutant mice: the influence of genetic background. *Genes Brain Behav.* 2: 365–380.
182. Holmes, A., Yang, R. J., Lesch, K.-P., Crawley, J. N. & Murphy, D. L. (2003) Mice lacking the serotonin transporter exhibit 5-HT(1A) receptor-mediated abnormalities in tests for anxiety-like behavior. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 28: 2077–2088.
183. Kalueff, A. V., Fox, M. A., Gallagher, P. S. & Murphy, D. L. (2007) Hypolocomotion, anxiety and serotonin syndrome-like behavior contribute to the complex phenotype of serotonin transporter knockout mice. *Genes Brain Behav.* 6: 389–400.
184. Kalueff, A. V., Jensen, C. L. & Murphy, D. L. (2007) Locomotory patterns, spatiotemporal organization of exploration and spatial memory in serotonin transporter knockout mice. *Brain Res.* 1169: 87–97.

185. Olivier, J. D. A., Van Der Hart, M. G. C., Van Swelm, R. P. L., Dederen, P. J., Homberg, J. R., Cremers, T., Deen, P. M. T., Cuppen, E., Cools, A. R., Ellenbroek, B. A. (2008) A study in male and female 5-HT transporter knockout rats: an animal model for anxiety and depression disorders. *Neuroscience* 152: 573–584.
186. Zhao, S., Edwards, J., Carroll, J., Wiedholz, L., Millstein, R. A., Jaing, C., Murphy, D. L., Lanthorn, T. H., Holmes, A. (2006) Insertion mutation at the C-terminus of the serotonin transporter disrupts brain serotonin function and emotion-related behaviors in mice. *Neuroscience* 140: 321–334.
187. Ansorge, M. S., Zhou, M., Lira, A., Hen, R. & Gingrich, J. A. (2004) Early-life blockade of the 5-HT transporter alters emotional behavior in adult mice. *Science* 306: 879–881.
188. Jennings, K. A., Loder, M. K., Sheward, W. J., Pei, Q., Deacon, R. M. J., Benson, M. A., Olverman, H. J., Hastie, N. D., Harmar, A. J., Shen, S., Sharp, T. (2006) Increased expression of the 5-HT transporter confers a low-anxiety phenotype linked to decreased 5-HT transmission. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26: 8955–8964.
189. Baldwin, D. S., Bridle, D. & Anders, E. *Pharmacotherapy of Anxiety Disorders*. In: Kasper, S., Den Boer, J. M. Sitsen, A. (szerk.) *Handbook of Depression and Anxiety*. Marcel Dekker Inc, New York, 2003: 733-756.
190. Norcross, M., Mathur, P., Enoch, A. J., Karlsson, R., Brigman, J. L., Cameron, H. A., Harvey-White, J., Holmes, A. (2008) Effects of adolescent fluoxetine treatment on fear-, anxiety- or stress-related behaviors in C57BL/6J or BALB/cJ mice. *Psychopharmacology (Berl.)* 200: 413–424.
191. Cases, O. Seif, I., Grimsby, J., Gaspar, P., Chen, K., Pournin, S., Müller, U., Aguet, M., Babinet, C., Shih, J. C. (1995) Aggressive behavior and altered amounts of brain serotonin and norepinephrine in mice lacking MAOA. *Science* 268: 1763–1766.
192. Godar, S. C., Bortolato, M., Frau, R., Dousti, M., Chen, K., Shih, J. C. (2011) Maladaptive defensive behaviours in monoamine oxidase A-deficient mice. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 14: 1195–1207.
193. Scott, A. L., Bortolato, M., Chen, K. & Shih, J. C. (2008) Novel monoamine oxidase A knock out mice with human-like spontaneous mutation. *Neuroreport* 19: 739–743.

194. Vishnivetskaya, G. B., Skrinskaya, J. A., Seif, I. & Popova, N. K. (2007) Effect of MAO A deficiency on different kinds of aggression and social investigation in mice. *Aggress. Behav.* 33: 1–6.
195. Gross, C., Zhuang, X., Stark, K., Ramboz, S., Oosting, R., Kirby, L., Santarelli, L., Beck, S., Hen, R. (2002) Serotonin1A receptor acts during development to establish normal anxiety-like behaviour in the adult. *Nature* 416: 396–400.
196. Heisler, L. K., Chu, H. M., Brennan, T. J., Danao, J. A., Bajwa, P., Parsons, L. H., Tecott, L. H. (1998) Elevated anxiety and antidepressant-like responses in serotonin 5-HT1A receptor mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95: 15049–15054.
197. Klemenhagen, K. C., Gordon, J. A., David, D. J., Hen, R. & Gross, C. T. (2006) Increased fear response to contextual cues in mice lacking the 5-HT1A receptor. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 31: 101–111.
198. Parks, C. L., Robinson, P. S., Sibille, E., Shenk, T. & Toth, M. (1998) Increased anxiety of mice lacking the serotonin1A receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95: 10734–10739.
199. Ramboz, S., Oosting, R., Amara, D. A., Kung, H. F., Blier, P., Mendelsohn, M., Mann, J. J., Brunner, D., Hen, R. (1998) Serotonin receptor 1A knockout: an animal model of anxiety-related disorder. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95: 14476–14481.
200. Santarelli, L., Saxe, M., Gross, C., Surget, A., Battaglia, F., Dulawa, S., Weisstaub, N., Lee, J., Duman, R., Arancio, O., Belzung, C., Hen, R. (2003). Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 301: 805–809
201. Kusserow, H., Davies, B., Hörtnagl, H., Voigt, I., Stroh, T., Bert, B., Deng, D. R., Fink, H., Veh, R. W., Theuring, F. (2004) Reduced anxiety-related behaviour in transgenic mice overexpressing serotonin 1A receptors. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 129: 104–116.
202. Bouwknecht, J. A., Hijzen, T. H., van der Gugten, J., Maes, R. A., Hen, R., Olivier, B. (2001) Absence of 5-HT(1B) receptors is associated with impaired impulse control in male 5-HT(1B) knockout mice. *Biol. Psychiatry* 49: 557–568.
203. Malleret, G., Hen, R., Guillou, J. L., Segu, L. & Buhot, M. C. (1999) 5-HT1B receptor knock-out mice exhibit increased exploratory activity and enhanced spatial memory performance in the Morris water maze. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 19: 6157–6168.

204. Sibille, E., Su, J., Leman, S., Le Guisquet, A. M., Ibarguen-Vargas, Y., Joeyen-Waldorf, J., Glorioso, C., Tseng, G. C., Pezzone, M., Hen, R., Belzung, C. (2007) Lack of serotonin1B receptor expression leads to age-related motor dysfunction, early onset of brain molecular aging and reduced longevity. *Mol. Psychiatry* 12: 1042–1056, 975.
205. Zhuang, X., Gross, C., Santarelli, L., Compan, V., Trillat, A. C., Hen, R. (1999) Altered Emotional States in Knockout Mice Lacking 5-HT1A or 5-HT1B Receptors. *Neuropsychopharmacology* 21: 52S-60S.
206. Weisstaub, N. V., Zhou, M., Lira, A., Lambe, E., González-Maeso, J., Hornung, J., Sibille, E., Underwood, M., Itohara, S., Dauer, W. T., Ansorge, M. S., Morelli, E., Mann, J. J., Toth, M., Aghajanian, G., Sealfon, S. C., Hen, R., Gingrich, J. A. (2006) Cortical 5-HT2A receptor signaling modulates anxiety-like behaviors in mice. *Science* 313: 536–540.
207. Tecott, L. H., Logue, S. F., Wehner, J. M. & Kauer, J. A. (1998) Perturbed dentate gyrus function in serotonin 5-HT2C receptor mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95: 15026–15031.
208. Harrell, A. V. & Allan, A. M. (2003) Improvements in hippocampal-dependent learning and decremental attention in 5-HT(3) receptor overexpressing mice. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N.* 10: 410–419.
209. Metz, A. V., Chynoweth, J. & Allan, A. M. (2006) Influence of genetic background on alcohol drinking and behavioral phenotypes of 5-HT3 receptor over-expressing mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 84: 120–127.
210. Davis, M. & Sheard, M. H. (1974) Habituation and sensitization of the rat startle response: effects of raphe lesions. *Physiol. Behav.* 12: 425–431.
211. Kostowski, W., Giacalone, E., Garattini, S. & Valzelli, L. (1968) Studies on behavioural and biochemical changes in rats after lesion of midbrain raphé. *Eur. J. Pharmacol.* 4: 371–376.
212. Lorens, S. A., Sorensen, J. P. & Yunger, L. M. (1971) Behavioral and neurochemical effects of lesions in the raphe system of the rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 77: 48–52.
213. Neill, D. B., Grant, L. D. & Grossman, S. P. (1972) Selective potentiation of locomotor effects of amphetamine by midbrain raphé lesions. *Physiol. Behav.* 9: 655–657.

214. Jacobs, B. L., Trimbach, C., Eubanks, E. E. & Trulson, M. (1975) Hippocampal mediation of raphe lesion- and PCPA-induced hyperactivity in the rat. *Brain Res.* 94: 253–261.
215. Geyer, M. A., Puerto, A., Menkes, D. B., Segal, D. S. & Mandell, A. J. (1976) Behavioral studies following lesions of the mesolimbic and mesostriatal serotonergic pathways. *Brain Res.* 106: 257–269.
216. Geyer, A., Puerto, A., Dawsey, W. J., Knapp, S., Bullard, W. P., Mandell, A. J. (1976) Histologic and enzymatic studies of the mesolimbic and mesostriatal serotonergic pathways. *Brain Res.* 106: 241–256.
217. Balázsfı, D., Zelena, D., Farkas, L., Demeter, K., Barna, I., Cserép, Cs., Takács, V. T., Nyíri, G., Göllöncsér, F., Sperlágh, B., Freund, T. F., Haller, J. (2017) Median raphe region stimulation alone generates remote, but not recent fear memory traces. *PloS One* 12: e0181264.
218. Andrade, T. G., Zangrossi, H. & Graeff, F. G. (2013) The median raphe nucleus in anxiety revisited. *J. Psychopharmacol. Oxf. Engl.* 27: 1107–1115.
219. Andrade, T. G. C. S., Macedo, C. E. A., Zangrossi, H. & Graeff, F. G. (2004) Anxiolytic-like effects of median raphe nucleus lesion in the elevated T-maze. *Behav. Brain Res.* 153: 55–60.
220. dos Santos, L., de Andrade, T. G. C. S. & Zangrossi, H. (2005) Serotonergic neurons in the median raphe nucleus regulate inhibitory avoidance but not escape behavior in the rat elevated T-maze test of anxiety. *Psychopharmacology (Berl.)* 179: 733–741.
221. Dos Santos, L., de Andrade, T. G. C. S. & Zangrossi Junior, H. (2008) 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the dorsal hippocampus mediate the anxiogenic effect induced by the stimulation of 5-HT neurons in the median raphe nucleus. *Eur. Neuropsychopharmacol. J. Eur. Coll. Neuropsychopharmacol.* 18: 286–294.
222. Pobbe, R. L. H. & Zangrossi, H. (2005) 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptors in the rat dorsal periaqueductal gray mediate the antipanic-like effect induced by the stimulation of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. *Psychopharmacology (Berl.)* 183: 314–321.

223. Sena, L. M., Bueno, C., Pobbe, R. L. H., Andrade, T. G. C. S., Zangrossi Jr, H., Viana, M. B. (2003) The dorsal raphe nucleus exerts opposed control on generalized anxiety and panic-related defensive responses in rats. *Behav. Brain Res.* 142: 125–133.
224. Spiacci, A., Coimbra, N. C. & Zangrossi, H. (2012) Differential involvement of dorsal raphe subnuclei in the regulation of anxiety- and panic-related defensive behaviors. *Neuroscience* 227: 350–360.
225. Lieschke, P. D. & Currie, G. J. (2007) Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat. Rev. Genet.* 8:353–367.
226. Lovett-Barron, M., Andalman, A. S., Allen, W. E., Vesuna, S., Kauvar, I., Burns, V. M., Deisseroth, K. (2017) Ancestral Circuits for the Coordinated Modulation of Brain State. *Cell* 171: 1411-1423.e17.
227. Jing, J., Gillette, R. & Weiss, K. R. (2009) Evolving concepts of arousal: insights from simple model systems. *Rev. Neurosci.* 20: 405–427.
228. Geduldig, D. & Junge, D. (1968) Sodium and calcium components of action potentials in the *Aplysia* giant neurone. *J. Physiol.* 199: 347–365.
229. Junge, D. (1967) Multi-ionic action potentials in molluscan giant neurones. *Nature* 215: 546–548.
230. Moreton, R. B. (1968) Ionic mechanism of the action potentials of giant neurones of *Helix aspersa*. *Nature* 219: 70–71.
231. Koester, J., Mayeri, E., Liebeswar, G. & Kandel, E. R. (1974) Neural control of circulation in *Aplysia*. II. Interneurons. *J. Neurophysiol.* 37: 476–496.
232. Mayeri, E., Koester, J., Kupfermann, I., Liebeswar, G. & Kandel, E. R. (1974) Neural control of circulation in *Aplysia*. I. Motoneurons. *J. Neurophysiol.* 37: 458–475.
233. Maximino, C., Costa, B. P., Lima, M. G., A (2016) review of monoaminergic neuropsychopharmacology in zebrafish, 6 years later Towards paradoxes and their solution. *Curr. Psychopharmacology*, 5: 96 - 138.
234. Mueller, T., Vernier, P. & Wullimann, M. F. (2004) The adult central nervous cholinergic system of a neurogenetic model animal, the zebrafish *Danio rerio*. *Brain Res.* 1011: 156–169.

235. Norton, W. H. J., Folchert, A. & Bally-Cuif, L. (2008) Comparative analysis of serotonin receptor (HTR1A/HTR1B families) and transporter ( *slc6a4a/b* ) gene expression in the zebrafish brain. *J. Comp. Neurol.* 511: 521–542.
236. Broglio, C., Gómez, A., Durán, E., Ocaña, F. M., Jiménez-Moya, F., Rodríguez, F., Salas, C. (2005) Hallmarks of a common forebrain vertebrate plan: specialized pallial areas for spatial, temporal and emotional memory in actinopterygian fish. *Brain Res. Bull.* 66: 277–281.
237. Kalueff, A. V., Echevarria, D. J. & Stewart, A. M. (2014) Gaining translational momentum: More zebrafish models for neuroscience research. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 55: 1–6.
238. Panula, P., Chen, Y., Priyadarshini, M., Kudo, H., Semenova, S., Sundvik, M., Sallinen, V. (2010) The comparative neuroanatomy and neurochemistry of zebrafish CNS systems of relevance to human neuropsychiatric diseases. *Neurobiol. Dis.* 40: 46–57.
239. Stewart, A. & Kalueff, A. V. (2014) Zebrafish models for translational neuroscience research: from tank to bedside. *Trends Neurosci.* 37: 264–278.
240. Howe, K., Clark, M., Torroja, C. et al. (2013) The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496: 498–503.
241. Sison, M., Cawker, J., Buske, C. & Gerlai, R. (2006) Fishing for genes influencing vertebrate behavior: zebrafish making headway. *Lab Anim.* 35: 33–39.
242. Maximino, C., Lima, M. G., Oliveira, K. R. M., Batista, E. de J. O. & Herculano, A. M. (2013) “Limbic associative” and “autonomic” amygdala in teleosts: A review of the evidence. *J. Chem. Neuroanat.* 48–49: 1–13.
243. Mueller, T. & Guo, S. (2009) The distribution of GAD67-mRNA in the adult zebrafish (teleost) forebrain reveals a prosomeric pattern and suggests previously unidentified homologies to tetrapods. *J. Comp. Neurol.* 516: 553–568.
244. Rink, E. & Wullimann, M. F. (2001) The teleostean (zebrafish) dopaminergic system ascending to the subpallium (striatum) is located in the basal diencephalon (posterior tuberculum). *Brain Res.* 889: 316–330.



245. Rink, E. & Wullimann, M. F. (2002) Connections of the ventral telencephalon and tyrosine hydroxylase distribution in the zebrafish brain (*Danio rerio*) lead to identification of an ascending dopaminergic system in a teleost. *Brain Res. Bull.* 57: 385–387.
246. Rink, E. & Wullimann, M. F. (2004) Connections of the ventral telencephalon (subpallium) in the zebrafish (*Danio rerio*). *Brain Res.* 1011: 206–220.
247. Wulliman, M. F., Rupp, B. & Reichert, H. *Neuroanatomy of the Zebrafish Brain: A Topological Atlas.* Birkhäuser, Basel, 2012.
248. Wullimann, M. F. & Meyer, D. L. (1993) Possible multiple evolution of indirect telencephalo-cerebellar pathways in teleosts: studies in *Carassius auratus* and *Pantodon buchholzi* *Cell Tissue Res.* 274: 447–455.
249. Alsop, D. & Vijayan, M. (2009) The zebrafish stress axis: Molecular fallout from the teleost-specific genome duplication event. *Gen. Comp. Endocrinol.* 161: 62–66.
250. Alsop, D. & Vijayan, M. M. (2008) Development of the corticosteroid stress axis and receptor expression in zebrafish. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 294: R711–R719.
251. Alsop, D. & Vijayan, M. M. (2009) Molecular programming of the corticosteroid stress axis during zebrafish development. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 153: 49–54.
252. Maximino C., Lima, M. G., Araujo, J., Oliveira, K. R. M., Herculano, A. M., Stewart, A. M., Kyzar, E., Cachat, J. M., Kalueff, A. V. The serotonergic system of zebrafish: genomics, neuroanatomy and neuropharmacology. In: Hall, S., (szerk.) *Serotonin Biosynth. Regul. Health Implic.* Nova Sci., New York, 2013:53–67.
253. Bencan, Z. & Levin, E. D. (2009) Buspirone, chlordiazepoxide and diazepam effects in a zebrafish model of anxiety. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 94: 75–80.
254. Chen, F., Chen, S., Liu, S., Zhang, C. & Peng, G. (2015) Effects of lorazepam and WAY-200070 in larval zebrafish light/dark choice test. *Neuropharmacology* 95: 226–233.
255. Cheng, R.-K., Krishnan, S. & Jesuthasan, S. (2016) Activation and inhibition of tph2 serotonergic neurons operate in tandem to influence larval zebrafish preference for light over darkness. *Sci. Rep.* 6: 20788

256. Cong, L., Wang, Z., Chai, Y., Hang, W., Shang, C., Yang, W., Bai, L., Du, J., Wang, K. (2017) Rapid whole brain imaging of neural activity in freely behaving larval zebrafish (*Danio rerio*). *eLife* 6: e28158.
257. De Marco, R. J., Groneberg, A. H., Yeh, C.-M., Castillo Ramírez, L. A. & Ryu, S. (2013) Optogenetic elevation of endogenous glucocorticoid level in larval zebrafish. *Front. Neural Circuits* 7: 82.
258. Maximino, C., da Silva, A. W. B., Gouveia Jr, A., Herculano, A. M. (2011) Pharmacological analysis of zebrafish (*Danio rerio*) scototaxis. *Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 35: 624–631.
259. Richendrfer, H., Pelkowski, S. D., Colwill, R. M., Creton, R. (2012) On the edge: Pharmacological evidence for anxiety-related behavior in zebrafish larvae. *Behav. Brain Res.* 228: 99–106.
260. Wronikowska, O., Michalak, A., Skalicka-Woźniak, K., Crawford, A. D. & Budzyńska, B. (2020) Fishing for a deeper understanding of nicotine effects using zebrafish behavioural models. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 98: 109826.
261. Dreosti, E., Lopes, G., Kampff, A. R. & Wilson, S. W. (2015) Development of social behavior in young zebrafish. *Front. Neural Circuits* 9: 39.
262. Shams, S., Chatterjee, D. & Gerlai, R. (2015) Chronic social isolation affects thigmotaxis and whole-brain serotonin levels in adult zebrafish. *Behav. Brain Res.* 292: 283–287.
263. Shams, S., Seguin, D., Faccioli, A., Chatterjee, D. & Gerlai, R. (2017) Effect of social isolation on anxiety-related behaviors, cortisol, and monoamines in adult zebrafish. *Behav. Neurosci.* 131: 492–504.
264. Shams, S., Amlani, S., Buske, C., Chatterjee, D. & Gerlai, R. (2017) Developmental social isolation affects adult behavior, social interaction, and dopamine metabolite levels in zebrafish. *Dev. Psychobiol.* 60: 43-56.
265. Drapeau, P., Saint-Amant, L., Buss, R. R., Chong, M., McDearmid, J. R., Brustein, E. (2002) Development of the locomotor network in zebrafish. *Prog. Neurobiol.* 68: 85–111.

266. Li, J., Mack, J. A., Souren, M., Yaksi, E., Higashijima, S., Mione, M., Fetcho, J. R., Friedrich, R. W. (2005) Early Development of Functional Spatial Maps in the Zebrafish Olfactory Bulb. *J. Neurosci.* 25: 5784–5795.
267. Mack-Bucher, J. A., Li, J. & Friedrich, R. W. (2007) Early functional development of interneurons in the zebrafish olfactory bulb. *Eur. J. Neurosci.* 25: 460–470.
268. Easter, S. S. & Nicola, G. N. (1996) The development of vision in the zebrafish (*Danio rerio*). *Dev. Biol.* 180: 646–663.
269. Brustein, E., Saint-Amant, L., Buss, R. R., Chong, M., McDermid, J. R., Drapeau, P. (2006) Steps during the development of the zebrafish locomotor network. *J. Physiol.* 97: 77–86.
270. Saint-Amant, L. & Drapeau, P. (2000) Motoneuron activity patterns related to the earliest behavior of the zebrafish embryo. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 20: 3964–3972.
271. Saint-Amant, L. & Drapeau, P. (2001) Synchronization of an embryonic network of identified spinal interneurons solely by electrical coupling. *Neuron* 31: 1035–1046.
272. Roberts, A. C., Bill, B. R. & Glanzman, D. L. (2013) Learning and memory in zebrafish larvae. *Front. Neural Circuits* 7: 126.
273. Andersson, M. Å., Ek, F. & Olsson, R. (2015) Using visual lateralization to model learning and memory in zebrafish larvae. *Sci. Rep.* 5: 8667.
274. Engeszer, R. E., Barbiano, L. A. DA., Ryan, M. J., Parichy, D. M. (2007) Timing and plasticity of shoaling behaviour in the zebrafish, *Danio rerio*. *Anim. Behav.* 74: 1269–1275.
275. Engeszer, R. E., Ryan, M. J. & Parichy, D. M. (2004) Learned Social Preference in Zebrafish. *Curr. Biol.* 14: 881–884.
276. Gerlach, G., Hodgins-Davis, A., Avolio, C. & Schunter, C. (2008) Kin recognition in zebrafish: a 24-hour window for olfactory imprinting. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 275: 2165–2170.
277. Buske, C. & Gerlai, R. (2012) Maturation of Shoaling Behavior Is Accompanied by Changes in the Dopaminergic and Serotonergic Systems in Zebrafish. *Dev. Physiol.* 54: 28–35.
278. Carreño Gutiérrez, H., Vacca, I., Pons, A. I. & Norton, W. H. J. (2018) Automatic quantification of juvenile zebrafish aggression. *J. Neurosci. Methods* 296: 23–31.

279. Lau, B. Y. B., Mathur, P., Gould, G. G., Guo, S. (2011) Identification of a brain center whose activity discriminates a choice behavior in zebrafish. *PNAS* 108: 2581–2586.
280. Carrillo, A. & McHenry, M. J. (2016) Zebrafish learn to forage in the dark. *J. Exp. Biol.* 219: 582–589.
281. Gerlai, R. Learning and memory in zebrafish (*Danio rerio*). In *Methods in Cell Biology*, Elsevier, 2016: vol. 134 551–586.
282. Blaser, R. E. & Goldsteinholm, K. (2012) Depth preference in zebrafish, *Danio rerio*: control by surface and substrate cues. *Anim. Behav.* 83: 953–959.
283. Blaser, R. E. & Rosemberg, D. B. (2012) Measures of Anxiety in Zebrafish (*Danio rerio*): Dissociation of Black/White Preference and Novel Tank Test. *PLOS ONE* 7: e36931.
284. Blaser, R. E. (2010) Behavioral measures of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav. Brain Res.* 208: 56–62.
285. Blaser, R. E., Peñalosa, Y. M., (2011) Stimuli affecting zebrafish (*Danio rerio*) behavior in the light/dark preference test. *Physiol. Behav.* 104: 831–837.
286. Jesuthasan, S. (2012) Fear, anxiety, and control in the zebrafish. *Dev. Neurobiol.* 72: 395–403.
287. Kysil, E. V., Meshalkina, D. A., Frick, E. E., Echevarria, D. J., Rosemberg, D. B., Maximino, C., Lima, M. G., Abreu, M. S., Giacomini, A. C., Barcellos, L. J. G., Song, C., Kalueff, A. V. (2017) Comparative Analyses of Zebrafish Anxiety-Like Behavior Using Conflict-Based Novelty Tests. *Zebrafish* 14: 197–208.
288. Maximino, C., de Brito, T. M., de Mattos Dias, C. A. G., Gouveia Jr, A., Morato, S. (2010) Scototaxis as anxiety-like behavior in fish. *Nat. Protoc.* 5: 209–216.
289. Maximino, C., de Brito, T. M., da Silva Batista, W. A., Herculano, A. M., Morato, S., Gouveia Jr, A. Measuring anxiety in zebrafish: A critical review. *Behav. Brain Res.* 214: 157–171.
290. Maximino, C., de Brito, T. M., Colmanetti, R., Pontes, A. A. A., de Castro, H. M., de Lacerda, R. I. T., Morato, S., Gouveia Jr, A. (2010) Parametric analyses of anxiety in zebrafish scototaxis. *Behav. Brain Res.* 210: 1–7.

291. Maximino, C., de Brito, T. M. & Gouveia Jr., A. (2010) Construct validity of behavioral models of anxiety: Where experimental psychopathology meets ecology and evolution. *Psychol. Neurosci.* 3: 117–123.
292. Levin, E. D., Bencan, Z., Cerutti, D. T., (2007) Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish. *Physiol. Behav.* 90: 54–58.
293. Gould, G. G. Aquatic Light/Dark Plus Maze Novel Environment for Assessing Anxious Versus Exploratory Behavior in Zebrafish (*Danio rerio*) and Other Small Teleost Fish. In Kalueff, A. V. & Cachat, J. M. (szerk.) *Zebrafish Neurobehavioral Protocols*, Humana Press, 2011: 99–108.
294. Steenbergen, P. J., Richardson, M. K., Champagne, D. L. (2011) Patterns of avoidance behaviours in the light/dark preference test in young juvenile zebrafish: A pharmacological study. *Behav. Brain Res.* 222: 15–25.
295. Egan, R. J., Bergner, C. L., Hart, P. C., Cachat, J. M., Canavello, P. R., Elegante, M. F., Elkhayat, S. I., Bartels, B. K., Tien, A. K., Tien, D. H., Mohnot, S., Beeson, E., Glasgow, E., Amri, H., Zukowska, Z., Kalueff, A. V. (2009) Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behav. Brain Res.* 205: 38–44.
296. Kalueff, A. V. & Cachat, J. M. *Zebrafish Neurobehavioral Protocols*, Humana Press, 2011
297. Yokogawa, T., Hannan, M. C. & Burgess, H. A. (2012) The Dorsal Raphe Modulates Sensory Responsiveness during Arousal in Zebrafish. *J. Neurosci.* 32: 15205–15215.
298. Lima-Maximino, M., Pyterson, M. P., do Carmo Silva, R. X., Gomes, G. C. V., Rocha, S. P., Herculano, A. M., Rosemberg, D. B., Maximino, C. (2020) Phasic and tonic serotonin modulate alarm reactions and post-exposure behavior in zebrafish. *J. Neurochem.* 153: 495–509.
299. Giacomini, A. C. V. V., Abreu, M. S., Giacomini, L. V., Siebel, A. M., Zimmerman F. F., Rambo, C. L., Mocelin, R. Bonan, C. D., Piato, A. L., Barcellos, L. J. G. (2016) Fluoxetine and diazepam acutely modulate stress induced-behavior. *Behav. Brain Res.* 296: 301–310.
300. Mocelin, R., Herrmann, A. P. Marcon, M., Rambo, C. L., Rohden, A., Bevilaqua, F., de Abreu, M. S., Zanatta, L., Elisabetsky, E., Barcellos, L. J. G., Lara, D. R., Piato, A. L. (2015)

N-acetylcysteine prevents stress-induced anxiety behavior in zebrafish. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 139 Pt B: 121–126.

301. Piato, A. L., Capiotti, K. M., Tamborski, A. R., Oses, J. P., Barcellos, L. J. G., Bogo, M. R., Lara, D. R., Vianna, M. R., Bonan, C. D. (2011) Unpredictable chronic stress model in zebrafish (*Danio rerio*): Behavioral and physiological responses. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 35: 561–567.

302. Champagne, D. L., Hoefnagels, C. C. M., de Kloet, R. E. & Richardson, M. K. (2010) Translating rodent behavioral repertoire to zebrafish (*Danio rerio*): relevance for stress research. *Behav. Brain Res.* 214: 332–342.

303. Ghisleni, G., Capiotti, K. M., Da Silva, R. S., Oses, J. P., Piato, A. L., Soares, V., Bogo, M. R., Bonan, C. D. (2012) The role of CRH in behavioral responses to acute restraint stress in zebrafish. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 36: 176–182.

304. Bai, Y., Liu, H., Huang, B., Wagle, M. & Guo, S. (2016) Identification of environmental stressors and validation of light preference as a measure of anxiety in larval zebrafish. *BMC Neurosci.* 17: 63.

305. Chakravarty, S., Reddy, B. M., Sudhakar, S. R. Saxena, S., Das, T., Meghah, V., Swamy, C. V. B., Kumar, A., Idris, M. M. (2013) Chronic unpredictable stress (CUS)-induced anxiety and related mood disorders in a zebrafish model: altered brain proteome profile implicates mitochondrial dysfunction. *PloS One* 8: e63302.

306. Fulcher, N., Tran, S., Shams, S., Chatterjee, D. & Gerlai, R. (2017) Neurochemical and Behavioral Responses to Unpredictable Chronic Mild Stress Following Developmental Isolation: The Zebrafish as a Model for Major Depression. *Zebrafish* 14: 23–34.

307. Song, C., Liu, B., Zhang, Y., Peng, Z., Wang, J., Collier, A. D., Echevarria, D. J., Savelieva, K. V., Lawrence, R. F., Rex, C. S., Meshalkina, D. A., Kalueff, A. V. (2018) Modeling consequences of prolonged strong unpredictable stress in zebrafish: Complex effects on behavior and physiology. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 81: 384–394.

308. Collymore, C., Tolwani, R. J. & Rasmussen, S. (2015) The Behavioral Effects of Single Housing and Environmental Enrichment on Adult Zebrafish (*Danio rerio*). *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 54: 280-5

309. Tunbak, H., Vazquez-Prada, M., Ryan, T., Kampff, A. R. & Dreosti, E. The lonely fish is not a loner fish: whole-brain mapping reveals abnormal activity in socially isolated zebrafish. (2020) bioRxiv 2020.01.22.915520
310. Groneberg, A. H., Marques, J. C., Martins, A. L., Polavieja, G. G. de & Orger, M. B. Early-life social experience shapes social avoidance reactions in larval zebrafish. (2020) bioRxiv 2020.03.02.972612
311. Forsatkar, M. N., Safari, O. & Boiti, C. (2017) Effects of social isolation on growth, stress response, and immunity of zebrafish. *Acta Ethologica* 20: 255–261.
312. Giacomini, A. C. V. V., de Abreu, M. S., Koakoski, G., Idalêncio, R., Kalichak, F., Oliveira, T. A., da Rosa, J. G. S., Gusso, D., Piato, A. L., Barcellos, L. J. G. (2015) My stress, our stress: Blunted cortisol response to stress in isolated housed zebrafish. *Physiol. Behav.* 139: 182–187.
313. von Krogh, K., Sørensen, C., Nilsson, G. E. & Øverli, Ø. (2010) Forebrain cell proliferation, behavior, and physiology of zebrafish, *Danio rerio*, kept in enriched or barren environments. *Physiol. Behav.* 101: 32–39.
314. Demin, K. A., Taranov, A. S., Ilyin, N. P., Lakstygai, A. M., Volgin, A. D., de Abreu, M. S., Strelakova, T., Kalueff, A. V. (2020) Understanding neurobehavioral effects of acute and chronic stress in zebrafish. *Stress Amst. Neth.* 1–18
315. Vom Berg-Maurer, C. M., Trivedi, C. A., Bollmann, J. H., De Marco, R. J. & Ryu, S. (2016) The Severity of Acute Stress Is Represented by Increased Synchronous Activity and Recruitment of Hypothalamic CRH Neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 36: 3350–3362.
316. Wagle, M., Mathur, P. & Guo, S. (2011) Corticotropin-Releasing Factor Critical for Zebrafish Camouflage Behavior Is Regulated by Light and Sensitive to Ethanol. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31: 214–224.
317. de Abreu, M. S., Koakoski, G., Ferreira, D., Oliveira, T. A., da Rosa, J. G. S., Gusso, D., Giacomini, A. C. V. V., Piato, A. L., Barcellos, L. J. G. (2014) Diazepam and fluoxetine decrease the stress response in zebrafish. *PloS One* 9: e103232.

318. Winberg, S., Nilsson, A., Hylland, P., Söderstöm, V. & Nilsson, G. E. (1997) Serotonin as a regulator of hypothalamic-pituitary-interrenal activity in teleost fish. *Neurosci. Lett.* 230: 113–116.
319. Okamoto, H., Agetsuma, M., Aizawa, H. (2011) Genetic Dissection of the Zebrafish Habenula, a Possible Switching Board for Selection of Behavioral Strategy to Cope with Fear and Anxiety. *Dev. Neurobiol.* 72: 386–394.
320. Agetsuma, M., Aizawa, H., Aoki, T., Nakayama, R., Takahoko, M., Goto, M., Sassa, T., Amo, R., Shiraki, T., Kawakami, K., Hosoya, T., Higashijima S., Okamoto H. (2010) The habenula is crucial for experience-dependent modification of fear responses in zebrafish. *Nat. Neurosci.* 13: 1354.
321. Herculano, A. M. & Maximino, C. (2014) Serotonergic modulation of zebrafish behavior: Towards a paradox. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 55: 50–66.
322. Barreiro-Iglesias, A., Cornide-Petronio, M. E., Anadón, R. & Rodicio, M. C. (2009) Serotonin and GABA are colocalized in restricted groups of neurons in the larval sea lamprey brain: insights into the early evolution of neurotransmitter colocalization in vertebrates. *J. Anat.* 215: 435–443.
323. Kaslin, J. & Panula, P. (2001) Comparative anatomy of the histaminergic and other aminergic systems in zebrafish (*Danio rerio*). *J. Comp. Neurol.* 440: 342–377.
324. Meyer, A. & Schartl, M. (1999) Gene and genome duplications in vertebrates: the one-to-four (-to-eight in fish) rule and the evolution of novel gene functions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11: 699–704.
325. Meyer, A. & Van de Peer, Y. (2005) From 2R to 3R: evidence for a fish-specific genome duplication (FSGD). *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 27: 937–945.
326. Ren, G., Li, S., Zhong, H. & Lin, S. (2013) Zebrafish tyrosine hydroxylase 2 gene encodes tryptophan hydroxylase. *J. Biol. Chem.* 288: 22451–22459.
327. Wen, L., Wei, W., Gu, W., Huang, P., Ren, X., Zhang, Z., Zhu, Z., Lin, S., Zhang B. (2008) Visualization of monoaminergic neurons and neurotoxicity of MPTP in live transgenic zebrafish. *Dev. Biol.* 314: 84–92.



328. Severinsen, K., Sinning, S., Müller, H. K. & Wiborg, O. (2008) Characterisation of the zebrafish serotonin transporter functionally links TM10 to the ligand binding site. *J. Neurochem.* 105: 1794–1805.
329. Anichtchik, O., Sallinen, V., Peitsaro, N. & Panula, P. (2006) Distinct structure and activity of monoamine oxidase in the brain of zebrafish (*Danio rerio*). *J. Comp. Neurol.* 498: 593–610.
330. Arslan, B. K. & Edmondson, D. E. (2010) Expression of zebrafish (*Danio rerio*) monoamine oxidase (MAO) in *Pichia pastoris*: purification and comparison with human MAO A and MAO B. *Protein Expr. Purif.* 70: 290–297.
331. Setini, A., Pierucci, F., Senatori, O. & Nicotra, A. (2005) Molecular characterization of monoamine oxidase in zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 140: 153–161.
332. Schneider, H., Fritzky, L., Williams, J., Heumann, C., Yochum, M., Pattar, K., Noppert, G., Mock, V., Hawley, E. (2012) Cloning and expression of a zebrafish 5-HT<sub>2C</sub> receptor gene. *Gene* 502: 108–117.
333. Sourbron, J., Schneider, H., Kecskés, A., Liu, Y., Buening, E. M., Lagae, L., Smolders, I., de Witte, P. (2016) Serotonergic Modulation as Effective Treatment for Dravet Syndrome in a Zebrafish Mutant Model. *ACS Chem. Neurosci.* 7: 588–598.
334. Barba-Escobedo, P. A. & Gould, G. G. (2012) Visual social preferences of lone zebrafish in a novel environment: strain and anxiolytic effects. *Genes Brain Behav.* 11: 366–373.
335. McLean, D. L. & Fetcho, J. R. (2004) Ontogeny and innervation patterns of dopaminergic, noradrenergic, and serotonergic neurons in larval zebrafish. *J. Comp. Neurol.* 480: 38–56.
336. McLean, D. L. & Fetcho, J. R. (2004) Relationship of tyrosine hydroxylase and serotonin immunoreactivity to sensorimotor circuitry in larval zebrafish. *J. Comp. Neurol.* 480: 57–71.
337. Maximino, C., Puty, B., Benzecry, R., Araújo, J., Lima, M. G., Batista, E. J. O., Oliveira, K. R. M. Crespo-Lopez, M. E., Herculano, A. M. (2013) Role of serotonin in zebrafish (*Danio rerio*) anxiety: Relationship with serotonin levels and effect of buspirone, WAY

- 100635, SB 224289, fluoxetine and para-chlorophenylalanine (pCPA) in two behavioral models. *Neuropharmacology* 71: 83–97.
338. Chen, F., Chen, S., Liu, S., Zhang, C. & Peng, G. (2015) Effects of lorazepam and WAY-200070 in larval zebrafish light/dark choice test. *Neuropharmacology* 95: 226–233.
339. Ralf-Peter Behrendt. *Neuroanatomy of Social Behaviour: An Evolutionary and Psychoanalytic Perspective*. Routledge, 2011.
340. Kyzar, E., Stewart, A. M., Landsman, S., Collins, C., Gebhardt, M., Robinson, K., Kalueff, A. V. (2013) Behavioral effects of bidirectional modulators of brain monoamines reserpine and d-amphetamine in zebrafish. *Brain Res.* 1527: 108–116.
341. Maximino, C., Puty, B., Matos Oliveira, K. R. & Herculano, A. M. (2013) Behavioral and neurochemical changes in the zebrafish leopard strain. *Genes Brain Behav.* 12: 576–582.
342. Singer, M. L., Oreschak, K., Rhinehart, Z. & Robison, B. D. (2016) Anxiolytic effects of fluoxetine and nicotine exposure on exploratory behavior in zebrafish. *PeerJ* 4: e2352.
343. Stewart, A., Wu, N., Cachat, J., Hart, P., Gaikwad, S., Wong, K., Utterback, E., Gilder, T., Kyzar, E., Newman, A., Carlos, D., Chang, K., Hook, M., Rhymes, C., Caffery, M., Greenberg, M., Zadina, J., Kalueff, A. V. (2011) Pharmacological modulation of anxiety-like phenotypes in adult zebrafish behavioral models. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 35: 1421–1431.
344. Stewart, A. M., Cachat, J., Gaikwad, S., Robinson, K. S. L., Gebhardt, M., Kalueff, A. V. (2013) Perspectives on experimental models of serotonin syndrome in zebrafish. *Neurochem. Int.* 62: 893–902.
345. Griffiths, B. B., Schoonheim, P. J., Ziv, L., Voelker, L., Baier, H., Gahtan, E. A (2012) zebrafish model of glucocorticoid resistance shows serotonergic modulation of the stress response. *Front. Behav. Neurosci.* 6: 68.
346. Ziv, L., Muto, A., Schoonheim, P. J., Meijnsing, S. H., Strasser, D., Ingraham, H. A., Schaaf, M. J. M., Yamamoto, K. R., Baier, H. (2013) An affective disorder in zebrafish with mutation of the glucocorticoid receptor. *Mol. Psychiatry* 18: 681–691.
347. Maximino, C., Lima, M. G., Costa, C. C., Guedes, I. M. L. & Herculano, A. M. (2014) Fluoxetine and WAY 100,635 dissociate increases in scototaxis and analgesia induced by

conspecific alarm substance in zebrafish (*Danio rerio* Hamilton 1822). *Pharmacol. Biochem. Behav.* 124: 425–433.

348. Chanrion, B., la Cour, C. M., Bertaso, F., Lerner-Natoli, M., Freissmuth, M., Millan, M. J., Bockaert, J., Marin, P. (2007) Physical interaction between the serotonin transporter and neuronal nitric oxide synthase underlies reciprocal modulation of their activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104: 8119–8124.

349. Connors, K. A., Valenti, T. W., Lawless, K., Sackerman, J., Onaivi, E. S., Brooks, B. W., Gould, G. G. (2014) Similar anxiolytic effects of agonists targeting serotonin 5-HT1A or cannabinoid CB receptors on zebrafish behavior in novel environments. *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 151: 105–113.

350. Maaswinkel, H., Zhu, L. & Weng, W. (2012) The immediate and the delayed effects of buspirone on zebrafish (*Danio rerio*) in an open field test: a 3-D approach. *Behav. Brain Res.* 234: 365–374.

351. Nowicki, M., Tran, S., Muraleetharan, A., Markovic, S. & Gerlai, R. (2014) Serotonin antagonists induce anxiolytic and anxiogenic-like behavior in zebrafish in a receptor-subtype dependent manner. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 126: 170–180.

352. Westerfield, M. *The Zebrafish Book : A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish.* [http://zfin.org/zf\\_info/zfbook/zfbk.html](http://zfin.org/zf_info/zfbook/zfbk.html) (2000).

353. MacPhail, R. C., Brooks, J., Hunter, D. L., Padnos, B., Irons, T. D., Padilla, D. (2009) Locomotion in larval zebrafish: Influence of time of day, lighting and ethanol. *Neurotoxicology* 30: 52–58.

354. Noldus L.P.J.J., Spink A.J. & Tegelenbosch R.A.J. (2001) EthoVision: A versatile video tracking system for automation of behavioral experiments. *Behav. Res. Methods Instrum. Comput.* 3: 398–414.

355. András Péter. Solomon Coder. (2017).

356. Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9: 671–675.

357. Guellec, D. L., Morvan-Dubois, G. & Sire, J.-Y. (2003) Skin development in bony fish with particular emphasis on collagen deposition in the dermis of the zebrafish (*Danio rerio*). *Int. J. Dev. Biol.* 48: 217–231.

358. Gobert, A., Rivet, J.-M., Cistarelli, L. & Millan, M. J. (1997) Buspirone Enhances Duloxetine- and Fluoxetine-Induced Increases in Dialysate Levels of Dopamine and Noradrenaline, but Not Serotonin, in the Frontal Cortex of Freely Moving Rats. *J. Neurochem.* 68: 1326–1329.
359. Gobert, A., Rivet, J.-M., Cistarelli, L., Melon, C. & Millan, M. J. (1999) Buspirone modulates basal and fluoxetine-stimulated dialysate levels of dopamine, noradrenaline and serotonin in the frontal cortex of freely moving rats: activation of serotonin<sub>1A</sub> receptors and blockade of  $\alpha$ -adrenergic receptors underlie its actions. *Neuroscience* 93: 1251–1262.
360. Lechin, F., van der Dijs, B., Jara, H., Orozco, B., Baez, S., Benaim, M., Lechin, M., Lechin, A. (1998) Effects of buspirone on plasma neurotransmitters in healthy subjects. *J. Neural Transm.* 105: 561–573.
361. Peroutka, S. J. (1988) 5-Hydroxytryptamine receptor subtypes: molecular, biochemical and physiological characterization. *Trends Neurosci.* 11: 496–500.
362. Shireen, E. & Haleem, D. J. (2005) Motor effects of buspirone: Relationship with dopamine and serotonin in the striatum. *J. Coll. Physicians Surg.--Pak. JCPSP* 15: 753–756.
363. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. (R Foundation for Statistical Computing, 2017).
364. Rosenblad, A. J.J. Faraway (2009). Extending the linear model with R: generalized linear, mixed effects and nonparametric regression models. *Comput Stat* 24: 369–370.
365. Bates, D., (2015) Fitting Linear Mixed-Effects Models Using {lme4}. *J. Stat. Softw.* 67: 1–48.
366. Kuznetsova, A., Brockhoff, P. B., Christensen, R. H. B., (2016) lmerTest: Tests in Linear Mixed Effects Models., *Journal of Statistical Software*, 82: 13.
367. Walsh-Monteiro, A., Pessoa, R. d. S., Sanches, É. M., Carvalho, A. C. C. d., Silva, Y. C. d. B. e, Chirinéa, G., & Gouveia, A., Jr. (2016) A new anxiety test for zebrafish: Plus maze with ramp. *Psychol. Neurosci.* 9: 457–464.
368. Neri, D., Ruberto, T., Mwaffo, V., Bartolini, T. & Porfiri, M. (2018) Social environment modulates anxiogenic effects of caffeine in zebrafish. *Behav. Pharmacol.* 30: 45-58.

369. Rosa, L. V., Ardais, A. P. Costa, F. V., Fontana, B. D., Quadros, V. A., Porciúncula, L. O., Rosemberg, D. B. (2018) Different effects of caffeine on behavioral neurophenotypes of two zebrafish populations. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 165: 1–8.
370. Richard T. Di Giulio & David E. Hinton. *The Toxicology of Fishes*. CRC Press, 2008.
371. Jeong, J., Kwon, H., Ahn, J., Kang, D., Kwon, S., Park, J. A., Kim, K. (2008) Functional and developmental analysis of the blood–brain barrier in zebrafish. *Brain Res. Bull.* 75: 619–628.
372. Haller, J., Aliczki, M., Pelczer, K. Gy., Spitzer, K., Balogh, Z., Kantor, S. (2013) Effects of the fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 on coping behavior under challenging conditions in mice. *Psychopharmacology (Berl.)* 231: 593–601.
373. Spence, J. C., Burgess, J., Rodgers, W. & Murray, T. (2009) Effect of pretesting on intentions and behaviour: a pedometer and walking intervention. *Psychol. Health* 24: 777–789.
374. Maximino, C., Benzecry, R., Oliveira, K. R. M., de Jesus Oliveira Batista, E., Herculano, A. M., Rosemberg, D. B., de Oliveira, D. L., Blaser, R. (2012) A comparison of the light/dark and novel tank tests in zebrafish. *Behaviour* 149: 1099–1123.

## 11.Saját publikációk jegyzéke

### Értekezés alapját képező publikációk

1. Varga, Z. K., Pejtsik, D., Biró, L., Zsigmond, Á., Varga, M., Tóth, B., Salamon, V., Annus, T., Mikics, É., Aliczki, M., (2020). Conserved serotonergic background of experience-dependent behavioral responsiveness in zebrafish (*Danio rerio*). *JNeurosci*, 40: 4551-4564
2. Varga, Z. K., Zsigmond, Á., Pejtsik, D., Varga, M., Demeter, K., Mikics, É., Haller, J., Aliczki, M. (2018). The swimming plus-maze test: a novel high-throughput model for assessment of anxiety-related behaviour in larval and juvenile zebrafish (*Danio rerio*). *Scientific reports*, 8:16590

### Egyéb publikációk

1. Balogh, Z., Szente, L., Biro, L., Varga, Z. K., Haller, J., Aliczki, M. (2018). Endocannabinoid interactions in the regulation of acquisition of contextual conditioned fear. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 90: 84-91.
2. Balázsfi, D., Zelena, D., Demeter, K., Miskolczi, C., Varga, Z. K., Nagyvárad, Á., Nyiri, G., Cserép, Cs., Baranyi, M., Sperlág, B., Haller, J. (2018). Differential roles of the two raphe nuclei in amiable social behaviour and aggression - an optogenetic study. *Frontiers In Behavioral Neuroscience*, 2; 12:163.
3. Aliczki, M., Varga, Z. K., Balogh, Z., Haller, J. (2015) Involvement of 2-arachidonoylglycerol signaling in social challenge responding of male CD1 mice.. *Psychopharmacology*, 232: 2157-67.
4. Aliczki, M., Zelena, D., Mikics, E., Varga, Z. K., Pinter, O., Venczkone, B. N., Varga, J., Haller, J. (2013). Monoacylglycerol lipase inhibition-induced changes in plasma corticosterone levels, anxiety and locomotor activity in male CD1 mice. *Horm Behav*, 63: 752-758.

## 12. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet fejezem ki Aliczki Manónak, aki az utóbbi csaknem 10 évben, TDK hallgató időszakom első napjától kezdve témavezetőként és barátként segítette pályám. Az általa átadott, a szakterületre és az általános tudományos módszertanra egyaránt kiterjedő tudás az egyik legértékesebb amit hallgató kaphat, szakmához való hozzáállása pedig mindig példa értékű lesz számomra.

Köszönöm Biró Lacinak, aki rengeteget segített a munkában, nem csak a szigorú értelemben vett szakmai, de a munkára való ösztökélés és biztatás szempontjából is. Csillapíthatatlan szakmai tudásvágya és munkabírása példa értékű számomra.

Köszönöm Pejtsik Dinának rengeteg segítségét és hogy a projekt iránt mindig lelkes és kitartó maradt. Jelenléte engem is kitartásra és fejlődésre sarkallt, munkája emelte a kísérletek színvonalát és hangulatát egyaránt.

Köszönöm Mikics Évának a támogató hozzáállását, hogy bízott a projektben és minden erejével azon van, hogy profi, hatékony és kellemes munkakörnyezetet teremtsen a csoportban.

Köszönöm Varga Máténak, akinek szakmai támogatása nélkül a projekt sosem jöhetett volna létre. Máté mindig a végletekig segítőkész és az új ötletekre példátlanul nyitott volt, tudományhoz való hozzáállása példa értékű számomra.

Köszönöm Zsigmond Áronnak, aki megteremtette a halakkal való munka lehetőségét, megtanított kezelésükre, illetve mindig segítségem volt a kísérletek elvégzésében.

Köszönöm Tóth Blankának tömegspektrometriás mérések lehetőségének megteremtését, precíz munkáját és problémamegoldó képességét.

Köszönöm kollégáimnak, amiért mindennapi jelenlétükkel, szakmai tanácsaikkal és barátságukkal segítettek munkámat és mindig tanulhattam tőlük, különös tekintettel Tóth Mátéra, Balogh Zoltánra, Miskolci Christinára, Bruzsik Báborkára, Sente Lászlóra, Szabik Hubára és Barsvári Beára.

Köszönöm Anyukámnak Ottiliának és Bátyámnak Andrisnak, amiért mindig támogatták munkámat és biztattak.

Végül köszönöm feleségemnek Anitának, amiért kitartott mellettem és támogatott a sok lemondással járó tudományos pályán, minden elviselhetetlenségem ellenére is.