



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ:

Τμήμα Βιολογίας

ΠΜΣ: ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ - ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΧΕΡΣΑΙΩΝ ΚΑΙ
ΘΑΛΑΣΣΙΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΟΡΩΝ

**Επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης, κατά το
εμβρυϊκό στάδιο, στην παρεγκεφαλίδα του *Danio rerio***



Κούφαλης Ευάγγελος,
Ηράκλειο 2019



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ:
Τμήμα Βιολογίας

ΠΜΣ: ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ-ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΧΕΡΣΑΙΩΝ ΚΑΙ
ΘΑΛΑΣΣΙΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΟΡΩΝ

**Επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης, κατά το εμβρυϊκό στάδιο,
στην παρεγκεφαλίδα του *Danio rerio***
Κούφαλης Ευάγγελος

Υπεύθυνος καθηγητής: Κουμουνδούρος Γεώργιος
Συνυπεύθυνη καθηγήτρια: Σιδηροπούλου Κυριακή

Εξεταστική επιτροπή

Κουμουνδούρος Γεώργιος (Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Κρήτης)

Σιδηροπούλου Κυριακή (Επίκουρη καθηγήτρια, Πανεπιστήμιο Κρήτης)

Παυλίδης Μιχαήλ (Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Κρήτης)

Ηράκλειο 2019

Πρόλογος

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο του ΠΜΣ: «Περιβαλλοντική Βιολογία – Διαχείριση Χερσαίων και Θαλάσσιων Βιολογικών Πόρων». Πιο συγκεκριμένα, το σύνολο των πειραματικών διαδικασιών πραγματοποιήθηκε στα εργαστήρια Θαλάσσιας Βιολογίας και Βιολογίας Ιχθύων και Νευροφυσιολογίας και Συμπεριφοράς του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης. Όλα τα πειραματικά πρωτόκολλα πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με την Ελληνική (Οδηγία 63/2010) και Ευρωπαϊκή (Οδηγία 56/2013) νομοθεσία σχετικά με την καλή διαβίωση των ζώων. Όλα τα πρωτόκολλα εγκρίθηκαν από την Επιτροπή Περιφερειακής Φροντίδας Ζώων (Αριθμός Άδειας: 115488/19)

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την τριμελή επιτροπή μου, τον κ. Κουμουνδούρο Γεώργιο, την κ. Σιδηροπούλου Κυριακή και τον κ. Παυλίδη Μιχαήλ για τα σχόλια, τις παρατηρήσεις και την βοήθεια τους για την εκπόνηση της μεταπτυχιακής διατριβής.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες, στην υποψήφια διδάκτορα Αγγελική Βέλλη για την πολύτιμη βοήθεια της στις ιστολογικές τομές αλλά και για τις συμβουλές της κατά την διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων καθώς και στην προπτυχιακή φοιτήτρια Ανθή Ζαχοπούλου για την βοήθεια της στην εκτροφή των οργανισμών και την συνεισφορά της.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη των δύο εργαστηρίων, στα οποία εκπονήθηκε η πτυχιακή μου εργασία, για την άψογη συνεργασία που είχαμε κατά την παραμονή μου στους εργαστηριακούς αυτούς χώρους.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου και τους δικούς μου ανθρώπους για την καθημερινή τους υποστήριξη για να διεξαχθεί η συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία.

Abstract

Temperature is one of the most important factors, which can have a significant impact on ectotherm organisms. Temperature variations during early developmental stages of fish could affect their later stages. Temperature changes during the embryonic stage, has significant effects on the zebrafish cerebellum size. Fertilized eggs were exposed into three different developmental temperatures (TD = 24 °C, 28 °C, 32 °C) up to hatching and then all were maintained under common conditions (28 °C) till the end of metamorphosis. At the end of metamorphosis, the brain of juveniles of all treatments were removed and subjected to histological analysis. Using nissl staining, the area of three subregions of cerebellum was calculated: the anterior region (Valvula cerebelli, Va), the central region (Corpus Cerebelli, CCe) and the posterior region (Lobus Caudalis, LCa). The results showed that the area of these subregions was significantly increased in individuals that were initially exposed to 32 °C compared to those exposed to lower temperatures. Furthermore, the activation of c-Fos cells on the cerebellum of juveniles was studied as a response to prolonged swimming. Statistically significant differences between the groups did not noticed. Hence, our results indicate that even a short period of exposure to increased temperatures during the embryonic stage can affect later stages of zebrafish brain morphology, however it has no impact on the activation of c-Fos genes of cerebellum.

Keywords: phenotypic plasticity, swimming, zebrafish, nissl staining, immunohistochemistry

Περίληψη

Η θερμοκρασία είναι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες, ο οποίος μπορεί να έχει σημαντικό αντίκτυπο στους εξώθερμους οργανισμούς. Θερμοκρασιακές διακυμάνσεις κατά τα νεαρά αναπτυξιακά στάδια των ψαριών μπορούν να επηρεάσουν τα μεταγενέστερα στάδια τους. Αλλαγές στην θερμοκρασία ανάπτυξης, κατά το εμβρυικό στάδιο, έχουν σημαντικές επιπτώσεις στο μέγεθος της παρεγκεφαλίδας του zebrafish. Γονιμοποιημένα αυγά εκτέθηκαν, σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης (ΘΑ = 24 °C, 28 °C, 32 °C) μέχρι την εκκόλαψη και ύστερα διατηρήθηκαν υπό κοινές συνθήκες (28 °C) μέχρι το τέλος της μεταμόρφωσης. Στο τέλος της μεταμόρφωσης, απομονώθηκαν εγκεφαλοι από ιχθύδια και των τριών συνθηκών και υποβλήθηκαν σε ιστολογική μελέτη. Χρησιμοποιώντας χρώση nissl, υπολογίστηκε το εμβαδόν των τριών υποπεριοχών της παρεγκεφαλίδας: της πρόσθιας περιοχής (βαλβιδική παρεγκεφαλίδα), της κεντρικής περιοχής (κύρια παρεγκεφαλίδα) και της οπίσθιας περιοχής (προθάλαμο – πλευρικός λοβός). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το εμβαδόν αυτών των περιοχών αυξάνεται σημαντικά σε άτομα, τα οποία αρχικά είχαν εκτεθεί στους 32 °C σε σύγκριση με αυτά που εκτέθηκαν σε χαμηλότερες θερμοκρασίες. Επιπλέον, μελετήθηκε η ενεργοποίηση των c-Fos γονιδίων στην παρεγκεφαλίδα των ιχθυδίων, ως ανταπόκριση σε παρατεταμένη κολύμβηση. Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων δεν παρατηρήθηκαν. Επομένως, τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι ακόμα και μία σύντομη περίοδος έκθεσης σε αυξημένες θερμοκρασίες κατά το εμβρυικό στάδιο κατά το εμβρυικό στάδιο μπορεί να επηρεάσει τα μετέπειτα στάδια της μορφολογίας του εγκεφάλου του zebrafish. Παρ' όλα αυτά δεν έχει αντίκτυπο στην ενεργότητα των γονιδίων c-Fos της παρεγκεφαλίδας.

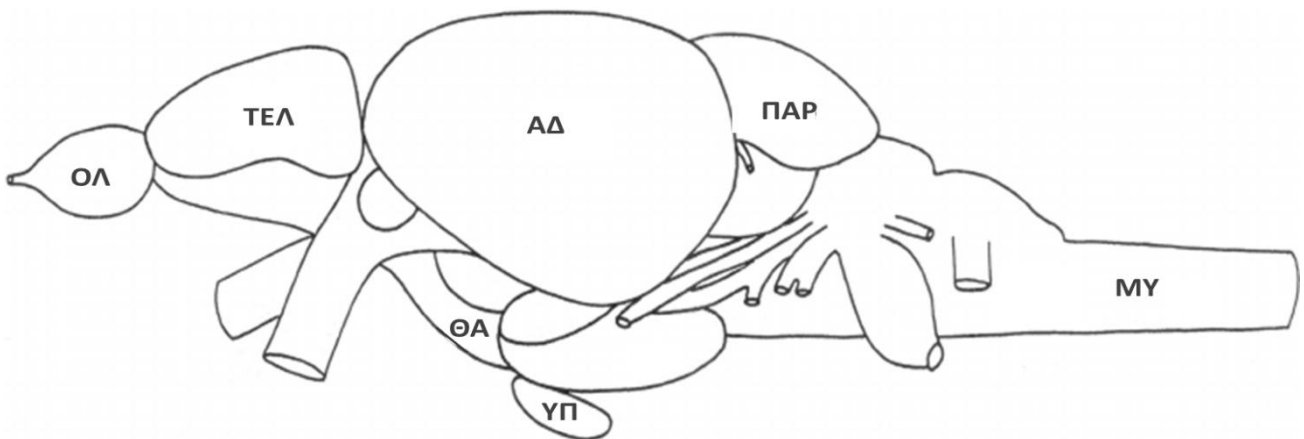
Λέξεις κλειδιά: Φαινοτυπική πλαστικότητα, κολύμβηση, zebrafish, χρώση nissl, ανοσοϊστοχημεία

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Δομή και νευρωνικά κυκλώματα της παρεγκεφαλίδας του zebrafish (*Danio rerio*)

A. Δομή Παρεγκεφαλίδας

Η παρεγκεφαλίδα (Cerebellum, Cc) είναι μία δομή του εγκεφάλου, η οποία στους τελεόστεους βρίσκεται στο ραχιαίο τμήμα του πρόσθιου οπισθεγέφαλου και συμμετέχει στον συντονισμό και την μάθηση κινήσεων (Hibi et al. 2017). Παρόλο που η βασική της δομή είναι συντηρημένη στα σπονδυλωτά, είναι ευρέως ποικιλόμορφη όσο αφορά την ακαθόριστη μορφολογία της και τα νευρωνικά κυκλώματά της, τα οποία εμπλέκουν ένα μικρό σχετικά αριθμό νευρωνικών τύπων (Hibi et al. 2017).



Εικόνα 1: Απεικόνιση του εγκεφάλου του zebrafish (*Danio rerio*): ΟΛ = Οσφρητικοί Λοβοί, ΤΕΛ = Τηλεγκέφαλος, ΑΔ = Άνω Διδύμιο, ΘΑ = Θάλαμος, ΥΠ = Υπόφυση, ΠΑΡ = Παρεγκεφαλίδα, ΜΥ = Μυελός (Kreke and Dietrich 2008)

Η παρεγκεφαλίδα των τελεόστεων έχει μια απλή δομή λοβού, η οποία διακρίνεται σε 3 χαρακτηριστικές δομές (Hibi et al. 2017) :

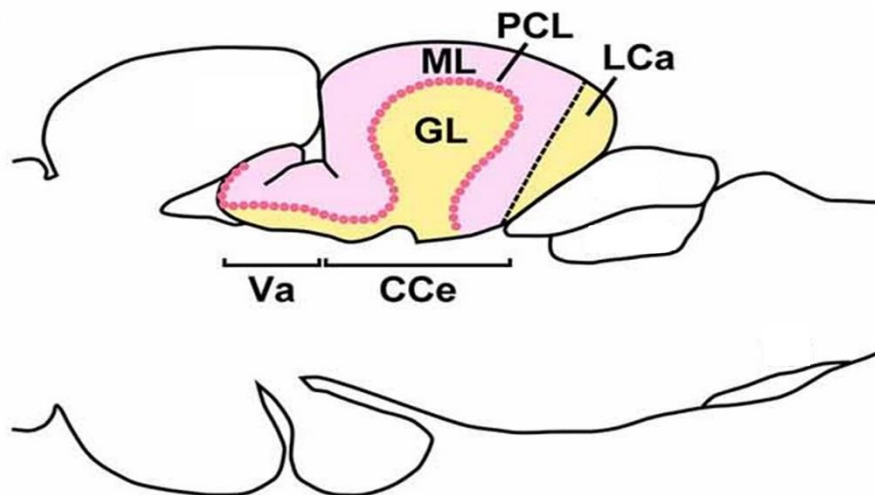
1. Την κύρια παρεγκεφαλίδα (Corpus Cerebelli, CCe)
2. Την βαλβιδική παρεγκεφαλίδα (Valvula Cerebelli, Va), η οποία αποτελεί ραμφοειδή επέκταση της κύριας παρεγκεφαλίδας

3. Τον προθάλαμο – πλευρικό λοβό (Vestibulo – lateral lobe), ο οποίος διακρίνεται στην Περιμηκή Κοκκώδη Περιοχή (Emimentia granularis, EG) και στον Ουραίο Λοβό (Lobus Caudalis, LCa)

Οι 2 πρώτες υποπεριοχές της παρεγκεφαλίδας περιλαμβάνουν, 2 λειτουργικές ομάδες παρεγκεφαλικών νευρώνων: Τα διεγερτικά κοκκώδη κύτταρα, τα οποία χρησιμοποιούν το γλουταμικό ως κύριο νευροδιαβιβαστή τους και τα ανασταλτικά κύτταρα Purkinje, τα οποία χρησιμοποιούν το GABA ως νευροδιαβιβαστή τους. Εκτός από αυτά τα κύτταρα, συμπληρωματικά στην παρεγκεφαλίδα συναντώνται και νευρογλοιακά κύτταρα (αστροκύτταρα και ολιγοδενδροκύτταρα), τα οποία μαζί με τις δύο παραπάνω κατηγορίες νευρώνων σχηματίζουν τρία διακριτά στρώματα ραχιαία προς κοιλιακά με την εξής σειρά (Hibi et al. 2017) :

1. Μοριακή στοιβάδα (Molecular Layer, ML)
2. Στοιβάδα κυττάρων Purkinje (Purkinje cell layer, PCL)
3. Στοιβάδα από κοκκώδη κύτταρα (Granule cell layer, GCL)

Αντίθετα στις υποπεριοχές του προθάλαμο – πλευρικού λοβού (EG – LCa) συναντώνται μόνο γλουταμινεργικά κύτταρα και δε διατηρείται η δομή της τριπλής στοιβάδας (Hashimoto and Hibi 2012). Οι άξονες των νευρώνων αυτής της υποπεριοχής, κάνουν συνάψεις με τους δενδρίτες των κυττάρων Purkinje στην παρεγκεφαλίδα και επεκτείνονται ουραία για να επικοινωνήσουν με κύτταρα του ραχιαίου οπισθεγέφαλου (Hibi et al. 2017).



Εικόνα 2: Σχήμα παρεγκεφαλίδας και των επιμέρους υποπεριοχών της : την κύρια παρεγκεφαλίδα (CCe), τη βαλβιδική παρεγκεφαλίδα (Va) και τον ουραίο λοβό (LCa). Επιπλέον, απεικονίζονται τα 3 διακριτά στρώματα νευρώνων που συναντώνται : η μοριακή στοιβάδα (ML), η στοιβάδα κυττάρων Purkinje (PCL) και η στοιβάδα κοκκωδών κυττάρων (GL) (Dohaku et al. 2019)

Η επιφανειακή μοριακή στοιβάδα (ML) περιλαμβάνει κυρίως δενδρίτες ανασταλτικών κυττάρων Purkinje, τους άξονες των γλουταμινεργικών κοκκωδών κυττάρων καθώς και νευρογλοιακά κύτταρα Bergmann (Hibi et al. 2017). Η στοιβάδα κυττάρων Purkinje (PCL) περιέχει τα σώματα των αντίστοιχων κυττάρων και κύτταρα Bergmann, όπως η μοριακή στοιβάδα (Hibi et al. 2017). Τέλος, η κοκκώδης στοιβάδα (GL) περιλαμβάνει πολλά μικρά γλουταμινεργικά κοκκώδη κύτταρα και ευρυδενδροειδή κύτταρα, τα οποία επικοινωνούν με τους άξονες των κυττάρων Purkinje (Hibi et al. 2017) (Εικ. 3). Τα ευρυδενδροειδή κύτταρα (eurydendroic cells, EC) συναντώνται μόνο στους εγκεφάλους των τελεόστεων. Πρόκειται για παρεγκεφαλικές προβολές γλουταμινεργικών νευρώνων, οι οποίες μεταδίδουν πληροφορίες από τα κύτταρα Purkinje σε εξωκυττάρια περιοχές και ο άξονας τους βρίσκεται εκτός παρεγκεφαλίδας (Hashimoto and Hibi 2012; Matsui 2017).

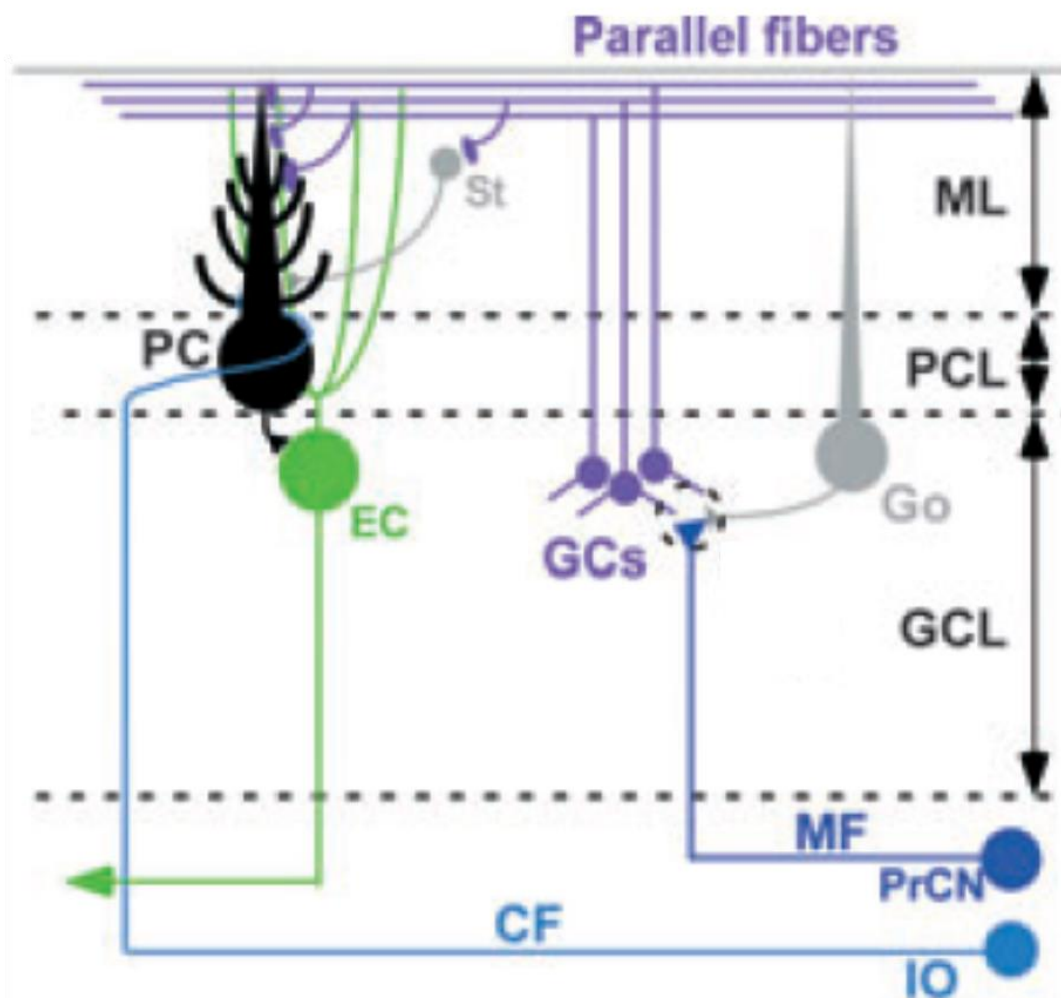
B. Νευρωνικά κυκλώματα της παρεγκεφαλίδας

Και οι δύο τύποι παρεγκεφαλικών νευρώνων λαμβάνουν διεγερτικά σήματα, από τον προπαραγκεφαλικό πυρήνα (precerebellar nuclei, PrCN) και από τον κατώτερο πυρήνα (inferior nuclei, IO) μέσω τριών τύπων συνδεδεμένων ιών:

1. Βρυωδών ιών (Mossy Fibers, MFs)
2. Αναρριχητικών ιών (Climbing Fibers, CFs)
3. Παράλληλων ιών (Parallel Fibers, PFs)

Οι αναρριχητικές ίνες (CFs) προέρχονται από τον κατώτερο πυρήνα (IO) και προβάλλουν στον ουραικοιλιακό οπισθεγέφαλο νευρώνοντας τους δενδρίτες των κυττάρων Purkinje (PC) στην μοριακή στοιβάδα (ML) (Hashimoto and Hibi 2012; Hibi et al. 2017). Οι βρυώδεις ίνες (MFs) προέρχονται από τον προπαραγκεφαλικό πυρήνα (PrCN) και συνάπτονται με τους δενδρίτες των γλουταμινεργικών κυττάρων (GC) (Hashimoto and Hibi 2012). Έτσι δημιουργείται ένα κύκλωμα, στο οποίο σήματα μεταφέρονται μέσω των βρυωδών ιών (MFs) στους άξονες των γλουταμινεργικών κυττάρων (GC) και μέσω των παράλληλων ιών, οι οποίες επεκτείνονται στον ραχιαίο οπισθεγέφαλο, στους δενδρίτες των κυττάρων Purkinje (PCs) (Hashimoto and Hibi 2012). Οπότε οι πληροφορίες ολοκληρώνονται και επεξεργάζονται από τα κύτταρα Purkinje. Τέλος, οι βρυώδεις ίνες (MFs) μεταφέρουν και πληροφορίες στον προθάλαμο – πλευρικό λοβό κάτι που δεν κάνουν οι αναρριχητικές ίνες (CFs) (Hibi et al. 2017). Η παρεγκεφαλίδα και τα νευρωνικά της δίκτυα έχουν ένα σημαντικό ρόλο για την εκμάθηση και τον συντονισμό κινήσεων (Matsui 2017). Πιο αναλυτικά, η νευρωνική δραστηριότητα των αναρριχητικών ιών (CFs) καταστέλλει την συναπτική μετάδοση από τις παράλληλες ίνες, όταν τα κύτταρα Purkinje λαμβάνουν ταυτόχρονα σήματα με έναν μηχανισμό

που λέγεται μακρόχρονη ύφεση (long – term depression, LTD), ο οποίος είναι σημαντικός για την μάθηση της κίνησης (Hashimoto and Hibi 2012).



Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση του βασικού νευρωνικού δικτύου και των νευρώνων της τριπλής στοιβάδας κυττάρων της παρεγκεφαλίδας. ML = Μοριακή στοιβάδα, PCL = Στοιβάδα κυττάρων Purkinje, GCL = Στοιβάδα κοκκωδών κυττάρων, PC = κύτταρο Purkinje, GCs = κοκκώδη κύτταρα, EC = ευρυδενδροειδή κύτταρα, MF = Βρυώδεις ίνες, CFs = Αναρριχητικές ίνες, Go = Κύτταρα Golgi, St = αστεροειδή κύτταρα, PrCN = προπαραγκεφαλικός πυρήνας, IO = κατώτερος πυρήνας (Hashimoto and Hibi 2012)

1.2 Ανάπτυξη και σχηματισμός της παρεγκεφαλίδας στο zebrafish

Η δημιουργία του νευρικού συστήματος ξεκινά με την δημιουργία του νευρικού σωλήνα στο έμβρυο, όπου τμήμα αυτού του σωλήνα εξειδικεύεται κατά την ανάπτυξη εκκρίνοντας σηματοδοτικά στοιχεία κατά μήκος του προ – οπίσθιου και ραχιαίο-κοιλιακού άξονα. Αυτά καθορίζουν την θέση κατά μήκος του νευρικού σωλήνα σχηματίζοντας προγενέστερες δομές των ενήλικών τελικών δομών (Hashimoto and Hibi 2012). Ο οπίσθιος εγκέφαλος πριν την τελική του μορφή χωρίζεται σε επιμέρους ρομβομερή, τα οποία σε τελικό στάδιο ενώνονται και τον συνθέτουν (Hashimoto and Hibi 2012).

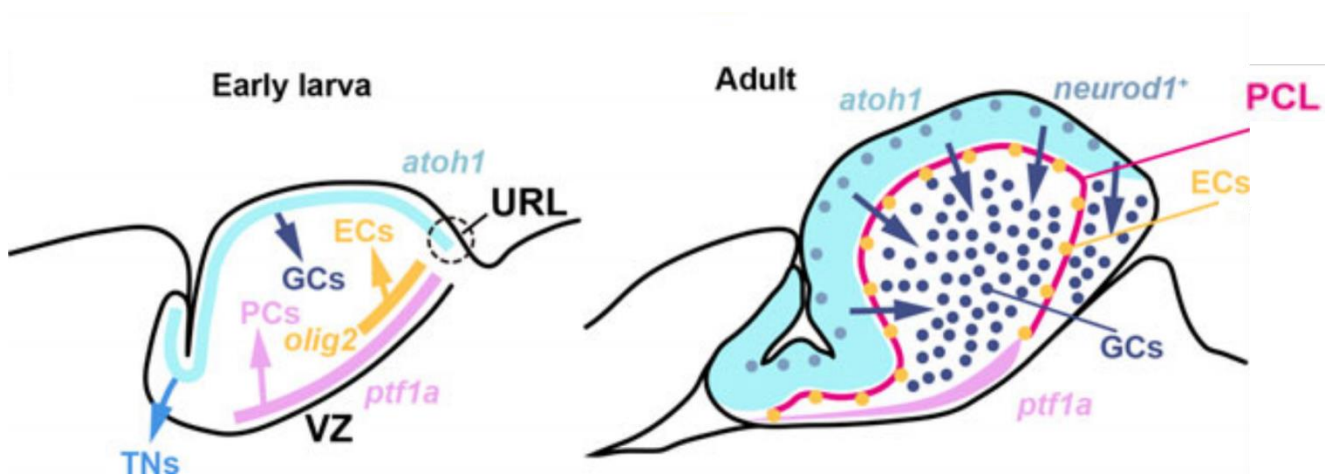
Πιο αναλυτικά, στην αρχή της ανάπτυξης εκφράζονται ανεξάρτητα και στις οπίσθιες και τις πρόσθιες περιοχές της νευρικής πλάκας δύο γονίδια (Otx2 και Gbx2), όπου οι περιοχές έκφρασης τους σε συνδυασμό με γονίδια που εκφράζονται σε αυτές τις περιοχές, καθορίζουν τα όρια μεταξύ του οπισθεγκέφαλου και του μεσεγκέφαλου (Acampora et al. 1999; Hashimoto and Hibi 2012). Συγκεκριμένα ο παράγοντας Wnt1 εκφράζεται στην ουραία περιοχή του μεσεγκέφαλου, στην οποία εκφράζεται και ο παράγοντας Otx2 και ο παράγοντας Fgf8 στην περιοχή του πρώτου ρομβομερούς, όπου εκφράζεται και ο παράγοντας Gbx2 (Hashimoto and Hibi 2012). Η Otx2 περιοχή είναι υπεύθυνη για τον μελλοντικό προσθεγκέφαλο και μεσεγκέφαλο, ενώ η Gbx2 για τον μελλοντικό οπισθεγκέφαλο και νωτιαία χορδή (Hashimoto and Hibi 2012). Συνοψίζοντας, τα όρια μεταξύ οπισθεγκέφαλου – μεσεγκέφαλου καθορίζονται από την σηματοδότηση μεταξύ Otx2/ Wnt1 και Gbx2/ Fgf8.

Η περιοχή στην οποία εκφράζεται ο Fgf8 καμπυλώνει προς τα μέσα σχηματίζοντας τον ισθμό και λειτουργεί ως το οργανωτικό κέντρο για την πρόιμη ανάπτυξη του οπισθεγκέφαλου, καταστέλλοντας την έκφραση των Otx2 (Reifers et al. 1998). Σε zebrafish τα οποία απουσίαζε ο παράγοντας Fgf8 δεν ήταν ξεκάθαρα τα όρια οπισθεγκέφαλου – μεσεγκέφαλου και απουσίαζε μια φυσιολογική δομή της παρεγκεφαλίδας υποδεικνύοντας την σημασία του Fgf8 ως διαμεσολαβητή της ισθμιακής οργανωτικής δραστηριότητας (Picker et al. 1999). Στη συνέχεια η ισθμιακή περιοχή στενεύει το αρχέγονο της παρεγκεφαλίδας και γίνεται διακριτό το τελικό πτερυγοειδές σχήμα της (Hashimoto and Hibi 2012).

Παράλληλα γεννώνται και οι νευρώνες της παρεγκεφαλίδας από δύο βλαστικές ζώνες:

1. Την κοιλιακή παρεγκεφαλική ζώνη (ventricular zone, VZ), η οποία δίνει γέννηση στα GABAεργικά κύτταρα (Purkinje και Golgi) αλλά και στα ευρυδενδροειδή κύτταρα
2. Το παρεγκεφαλικό ρομβικό χείλος (cerebellar rhombic lip, CRL), το οποίο δίνει γέννηση στους γλουταμεργικούς νευρώνες (Κοκκώδη παρεγκεφαλικά κύτταρα)

Τα κύτταρα Purkinje, σχηματίζονται πρώτα και μεταναστεύουν από τη περιοχή Ptf1a στην κοιλιακή πλευρά (VZ) της επιφάνειας της παρεγκεφαλίδας σχηματίζοντας την αντίστοιχη στοιβάδα κυττάρων. Ακολουθεί η γέννηση των προ - γλουταμινεργικών κυττάρων από νευροεπιθηλιακά κύτταρα της Atoh1⁺ περιοχής, η οποία βρίσκεται στο ραχιαίο τμήμα της παρεγκεφαλίδας. Μετά τη γέννηση τους, μεταναστεύουν εφαπτωμενικά σε ολόκληρη την επιφάνεια της παρεγκεφαλίδας σχηματίζοντας το εξωτερικό κοκκώδες στρώμα (Kani et al. 2010). Στη συνέχεια, τα προ - γλουταμινεργικά κύτταρα μαζί με το εξωτερικό κοκκώδες στρώμα μετακινούνται ακτινικά στο εσωτερικό κοκκώδες στρώμα και διαφοροποιούνται σε γλουταμινεργικά κύτταρα (Hashimoto and Hibi 2012). Πιο συγκεκριμένα, οι πρόδρομοι προ γεννήτορες του παρεγκεφαλικού ρομβικού χείλους, δίνουν γέννηση στους γλουταμινεργικούς νευρώνες της βαλβιδικής παρεγκεφαλίδας (Va) και της κύριας παρεγκεφαλίδας (CCe), αφού μεταναστεύσουν στο εσωτερικό της παρεγκεφαλίδας σχηματίζοντας την στοιβάδα από κοκκώδη κύτταρα (Hashimoto and Hibi 2012). Οι ουραίοι και πλευρικοί προ γεννήτορες του παρεγκεφαλικού ρομβικού χείλους, δημιουργούν τους γλουταμινεργικούς νευρώνες στον προθάλαμο - πλευρικό λοβό (Vestibulo - lateral lobe), ο οποίος διακρίνεται στον Περιμηκή Κοκκώδη (Emimentia granularis, EG) και στον Ουραίο Λοβό (Lobus Caudalis, LCA) και δε μεταναστεύουν (Hashimoto and Hibi 2012). Έτσι, σχηματίζεται το τελικό σχήμα της παρεγκεφαλίδας.



Εικόνα 4: Ανάπτυξη της παρεγκεφαλίδας στο zebrafish κατά το νυμφικό στάδιο (5 μέρες μετά τη γονιμοποίηση) και το ενήλικο στάδιο. URL = ανώτερο ρομβικό χείλος (upper rhombic lip), VZ = κοιλιακή παρεγκεφαλική ζώνη (ventricular zone), GCs = γλουταμινεργικοί νευρώνες, PCs = κύτταρα Purkinje, ECs = ευρυδενδροειδή κύτταρα, TN = τεκτονικός πυρήνας (Scalise et al. 2016)

1.3 Φαινοτυπική πλαστικότητα του εγκεφάλου των ψαριών

Ο όρος φαινοτυπική πλαστικότητα περιγράφει, ουσιαστικά, την ικανότητα ενός γονότυπου να παράγει μια μεγάλη ποικιλία φαινοτύπων ως απόκριση σε διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες. Αυτή η απόκριση μπορεί να εκφραστεί σε μορφολογικό, βιοχημικό, φυσιολογικό και αναπτυξιακό επίπεδο, ή ακόμα και μέσω αλλαγών στη συμπεριφορά και των προτύπων κίνησης (Agrawal 2001; Gilbert 2001). Τα ψάρια είναι μια ομάδα που χαρακτηρίζεται και από ευρεία φαινοτυπική πλαστικότητα, προσελκύνοντας έτσι το ερευνητικό ενδιαφέρον πλήθους εργασιών (Georga and Koumoundouros 2010; Loizides et al. 2014; Toli et al. 2017; Dimitriadi et al. 2018). Ειδικότερα, χαρακτηρίζονται από έντονη πλαστικότητα του νευρικού συστήματος. Για παράδειγμα, έχει αποδειχθεί, ότι το zebrafish διαθέτει μεγάλη αναγεννητική ικανότητα εγκεφαλικού ιστού, ακόμα και μετά από τραυματισμό (Cosacak et al. 2015). Τα νευρικά συστήματα των ιχθύων χαρακτηρίζονται από μια ποικιλία λειτουργικών δομών και σχημάτων, που λίγα όργανα μπορούν να ανταγωνιστούν (Kotrschal et al. 2012). Όσο αφορά, το μέγεθος του εγκεφάλου των ψαριών, φαίνεται να αυξάνεται με αύξηση του ολικού μεγέθους σώματος, αλλά ακόμα περιβαλλοντικοί παράγοντες, οι οποίοι μπορεί να προκαλούν τέτοιες αλλαγές δεν έχουν προσδιοριστεί (Toli et al. 2017; White and Brown 2015). Αυτή η απροσδιόριστη η ποικιλομορφία, μπορεί να είναι αποτέλεσμα της ανταπόκρισης των ατόμων σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα (Toli et al. 2017; Hibi et al. 2017). Ο μεγάλος αριθμός ειδών και η ανταπόκριση τους στα περιβαλλοντικά ερεθίσματα του υδάτινου περιβάλλοντος, οδήγησε στην ανάπτυξη εξειδικευμένων συμπεριφορών και προτύπων κίνησης, τα οποία μπορεί να οφείλονται σε διαφορές στην μορφολογία του εγκεφάλου (White and Brown 2015). Πολλές συγκριτικές μελέτες έχουν συνδέσει τις ποικιλομορφίες όσο αφορά τη δομή του εγκεφάλου με αλλαγές στο χωρικό περιβάλλον του είδους, οι οποίες αυξάνουν την ανάγκη σε γνωστικές απαιτήσεις, οδηγώντας στην εξέλιξη διαφορετικών δομών αλλά και προτύπων κίνησης ανάμεσα στα είδη (White and Brown 2015; Toli et al. 2017). Για παράδειγμα, το είδος *Bathygobius cocosensis*, το οποίο ζει σε πετρώδη περιβάλλοντα έχει αυξημένο μέγεθος τηλεγκεφάλου σε σχέση με *Favonigobius lentiginosus* το οποίο ζει σε αμμώδη περιβάλλοντα, ως απόκριση στις γνωστικές απαιτήσεις του περίπλοκου περιβάλλοντος διαβίωσης. Αντίθετα, το δεύτερο έχει μεγαλύτερο άνω διδύμιο, και ως αποτέλεσμα αυξημένη οπτική οξύτητα, ως ανταπόκριση του αχανούς περιβάλλοντος διαβίωσης (White and Brown 2015). Άλλες μεταβλητές, που φαίνεται να σχετίζονται με την ποικιλία που παρατηρείται όσο αφορά τη δομή του εγκεφάλου στα σπονδυλωτά είναι οι κοινωνικές αλληλεπιδράσεις (Gonzalez-Voyer et al. 2009), η διατροφή (Hutcheon et al. 2002), η γονική φροντίδα και οι στρατηγικές ζευγαρώματος (Young et al. 1998; Kolm et al. 2009), το φύλο (Kotrschal et al. 2012; Toli et al. 2017) καθώς και η θερμοκρασία περιβάλλοντος (Toli et al. 2017; Haesemeyer et al. 2018). Για παράδειγμα, υπάρχουν ενδείξεις, ότι η θερμοκρασία ανάπτυξης

επηρεάζει το μέγεθος συγκεκριμένων δομών του εγκεφάλου του *Gasterosteus aculeatus* όπως το άνω διδύμιο, ο ραχιαίος μυελός και η παρεγκεφαλίδα (Toli et al. 2017). Ιδιαίτερα, η θερμοκρασία είναι ένας από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες, με υψηλό αντίκτυπο στη φυσιολογία των εξώθερμων οργανισμών (Sheridan and Bickford 2011; Munday et al. 2008; Dimitriadi et al. 2018; Poloczanska et al. 2013).

1.4 Επίδραση της θερμοκρασίας περιβάλλοντος στον εγκέφαλο

Ένας από τους σημαντικότερους και περισσότερο μελετημένους περιβαλλοντικούς παράγοντες που προκαλεί φαινοτυπική πλαστικότητα στα ψάρια είναι η θερμοκρασία περιβάλλοντος (Dimitriadi et al. 2018; Munday et al. 2008; Poloczanska et al. 2013; Sheridan and Bickford 2011). Οι εξώθερμοι οργανισμοί είναι ιδιαίτερα ευαίσθητοι στην υπερθέρμανση του πλανήτη, επειδή η θερμοκρασία του σώματος τους και οι φυσιολογικές τους λειτουργίες ρυθμίζονται από τη θερμοκρασία περιβάλλοντος (Poloczanska et al. 2013).

Σε μοριακό επίπεδο, το πως τα ζώα αντιλαμβάνονται την θερμοκρασία είναι κατανοητό. Μία μεγάλη ομάδα από κανάλια υποδοχέων ενεργοποιούνται από την θερμοκρασία, και αναλόγως τα επίπεδα της, διαφορετικά κανάλια ενεργοποιούνται (Schepers and Ringkamp 2010). Νευρώνες με θερμορυθμιζόμενη δραστηριότητα βρίσκονται κατά μήκος του εγκεφάλου, με κάποιες περιοχές να έχουν αυξημένους (Haesemeyer et al. 2015). Στα σπονδυλωτά, οι νευρώνες που ενεργοποιούν τα θερμοευαίσθητα κανάλια είναι συγκεντρωμένοι στα αισθητήρια γάγγλια του τριδύμου (μια δομή που βρίσκεται στον οπισθεγέφαλο) και νευρώνουν το κεφάλι καθώς και γάγγλια που ανιχνεύουν ερεθίσματα κατά μήκος του κορμού και της ουράς (Schepers and Ringkamp 2010). Όπως και άλλες διεργασίες του αισθητικού συστήματος, η θερμοκρασία κωδικοποιείται και αναπαρίσταται από μια νευρολογική δραστηριότητα στους πρωτογενείς αισθητικούς νευρώνες και στη συνέχεια υποβάλλεται σε επεξεργασία ώστε να εξαχθούν αυτές οι πληροφορίες ως συμπεριφορικές ανταποκρίσεις (Haesemeyer et al. 2018). Μόλις ενεργοποιηθούν οι νευρώνες του τριδύμου, η δραστηριότητα τους ενεργοποιεί συμπλέγματα κινητικών κυττάρων στη ραχιαία παρεγκεφαλίδα, αλλά και στο ρομβομερές 5/6 του οπισθεγέφαλου, και παράγουν διαφορετικές συμπεριφορές κίνησης (Haesemeyer et al. 2018). Πρόσφατες μελέτες σε νύμφες zebrafish δείχνουν ότι μια παρατεταμένη διέγερση του τριδύμου προκαλεί αλλαγές στον οπισθεγέφαλο. Αυτές οι αλλαγές εξηγούν την αυξημένη κίνηση των συγκεκριμένων ατόμων, και ειδικότερα τις κινήσεις της ουράς τους (Haesemeyer et al. 2015). Πιο αναλυτικά, κατά το ερέθισμα παρατηρήθηκαν δύο πρότυπα κινήσεων. Το πρώτο πρότυπό που ήταν μια κυματοειδής κίνηση, προσομοιάζει την ευθεία κολύμβηση (swim), ενώ το δεύτερο πρότυπο κίνησης προσομοίαζε μία μονομερή και απότομη κίνηση, που μοιάζει με την κίνηση κατά τη στροφή

(flick). Ενώ η αναλογία flick/swim αυξανόταν όσο αυξανόταν η θερμοκρασία (το πιο ισχυρό ερέθισμα), οι ρυθμοί κολύμβησης ήταν αυξημένοι για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (Haesemeyer et al. 2018). Αυτό είναι ίσως αποτέλεσμα μιας προσαρμοστικής στρατηγικής ευνοώντας τις ευθείες κινήσεις (Haesemeyer et al. 2018). Οπότε η κωδικοποίηση του ερεθίσματος από κύτταρα της παρεγκεφαλίδας και του οπισθεγκεφάλου είναι ένα σημαντικό βήμα για την ανάπτυξη κάποιας συμπεριφοράς κίνησης. Αυτή η ποικιλία σε ανταποκρίσεις μπορεί να εξηγήσει και να συνδέσει τα διαφορετικά συμπεριφορικά μοτίβα με τα διαφορετικά περιβαλλοντικά ερεθίσματα (Haesemeyer et al. 2018).

Έχει παρατηρηθεί ότι αυξημένες θερμοκρασίες και επίπεδα CO₂ στον ωκεανό μπορεί να βλάψουν σημαντικά τις αισθητικές λειτουργίες και να προκληθούν αλλαγές στην συμπεριφορά των τελεόστεων και των ελασμοβράγχιων, οι οποίες πιθανώς οφείλονται και σε διαφορές στη δομή του εγκεφάλου (Simpson et al. 2011). Εξαιτίας της κλιματικής αλλαγής, πολλοί τελεόστεοι παρουσιάζουν μειωμένη ανάπτυξη και αλλάζουν κρίσιμες γνωστικές συμπεριφορές όπως το κοπάδιασμα (schooling) και η συμπεριφορά πλευρίωσης (behavioral lateralization), που προσφέρουν επιλεκτικά πλεονεκτήματα για την επιβίωση (Bisazza and Dadda 2005; Pouca et al. 2018). Δεδομένου ότι η συμπεριφορά πλευρίωσης αντικατοπτρίζει εγκεφαλικές ασυμμετρίες, μεταβολές σε αυτή τη συμπεριφορά προτείνουν ότι η ταχεία αύξηση της θερμοκρασίας περιβάλλοντος μπορεί να επηρεάσει τη δομή και τη μορφολογία του εγκεφάλου σε αρκετά είδη τελεόστεων και ελασμοβράγχιων (Pouca et al. 2018). Επομένως είναι κατανοητό ότι η περιβαλλοντική θερμοκρασία επηρεάζει την συμπεριφορά. Τα περισσότερα ζώα έχουν ένα στενό θερμοκρασιακό εύρος, στο οποίο ο μεταβολισμός τους λειτουργεί βέλτιστα και έτσι έχουν εξελίξει συμπεριφορές για αναζήτηση αυτών των θερμοκρασιακών ευρών (Haesemeyer et al. 2018).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η ανταπόκριση των εδραίων θαλάσσιων οργανισμών στις αυξημένες θερμοκρασίες περιβάλλοντος, όπως οι βενθικοί οργανισμοί, τα έμβρυα ή τα άτομα κατά τη περίοδο της κύησης, καθώς δεν έχουν την ικανότητα κίνησης για να αναζητήσουν, τα βέλτιστα θερμοκρασιακά εύρη (Pouca et al. 2018). Οπότε είναι εκτεθειμένοι στις επικρατούσες περιβαλλοντικές συνθήκες και δεν έχουν κάποια άλλη επιλογή από το να προσαρμοστούν στις εκάστοτε συνθήκες (Pouca et al. 2018). Υπό αυτές τις συνθήκες, έχει παρατηρηθεί, ότι αυξάνονται οι μεταβολικοί και αναπτυξιακοί ρυθμοί των εξώθερμων οργανισμών, με συνακόλουθα κόστη όσο αφορά την κατανομή της ενέργειας τους για την αύξηση και τις φυσιολογικές διεργασίες (Munday et al. 2008). Ένας μηχανισμός που χρησιμοποιείται από τα περισσότερα εδραία είδη για αντιστάθμιση των αυξήσεων στους μεταβολικούς και αναπτυξιακούς ρυθμούς είναι η ανακατανομή των ενεργειακών τους αποθεμάτων κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, η οποία αναμένεται να επηρεάσει

εξαιρετικά μεταβολικά δαπανηρά συστήματα όπως η νευρική ανάπτυξη (Sheridan and Bickford 2011; Rouca et al. 2018). Οπότε, παρατηρούνται διαφορές, όσον αφορά το μέγεθος και το σχήμα διαφορετικών οργάνων του σώματος ως ανταπόκριση στις υψηλότερες θερμοκρασίες ανάπτυξης όπως το σχήμα σώματος, η καρδιά και ο εγκέφαλος (Georga and Koumoundouros 2010; Dimitriadi et al. 2018; Rouca et al. 2018). Για παράδειγμα, έχει δειχθεί, και προτείνεται και για τους τελεόστεους, ότι σε ελασμοβράγχιους, οι οποίοι μεγάλωσαν σε αυξημένες θερμοκρασίες περιβάλλοντος, παρατηρήθηκε πιο απόλυτη πλευρίωση (διέθεταν πιο ασύμμετρους εγκεφάλους) και προτιμούσαν την δεξιά πλευρά σε σχέση με ελασμοβράγχιους, οι οποίοι εκτράφηκαν σε χαμηλότερες θερμοκρασίες ανάπτυξης (Rouca et al. 2018). Οι επίσημες επιδράσεις σε ένα εύρος αισθητήριων συμπεριφορών έχουν ήδη παρατηρηθεί σε ψάρια, προτείνοντας ότι οι προβλεπόμενες κλιματικές αλλαγές ίσως επηρεάσουν δυσανάλογα την ανάπτυξη και τη λειτουργία του εγκεφάλου τους (Rouca et al. 2018).

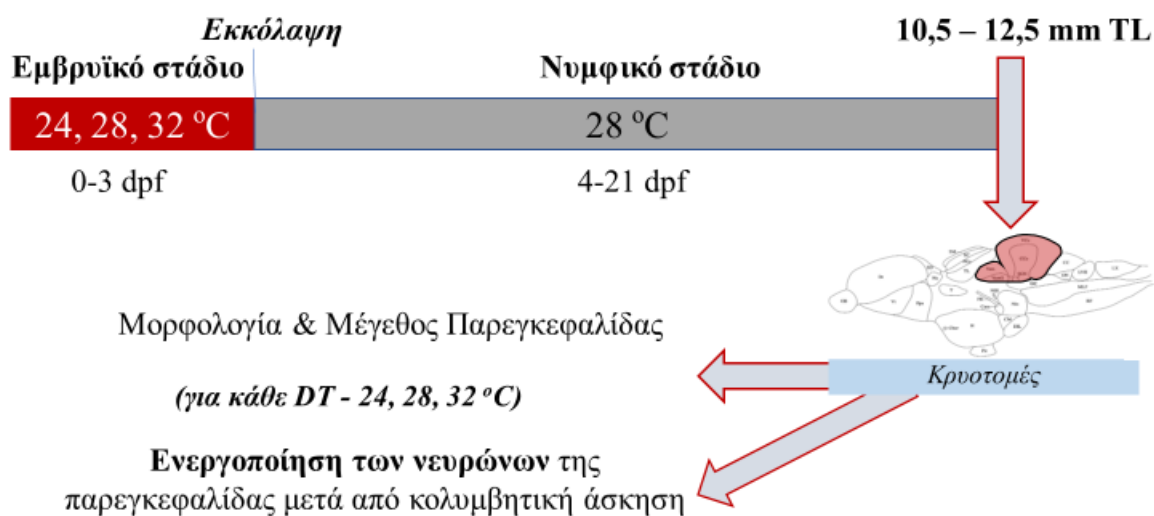
1.5 Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας, ήταν να ελεγχθεί η επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης κατά το εμβρυικό στάδιο στο μέγεθος της παρεγκεφαλίδας και την ενεργοποίηση των νευρώνων της, μετά από παρατεταμένη κολύμβηση, σε νύμφες zebrafish προς το τέλος της μεταμόρφωσης. Το συγκεκριμένο στάδιο επιλέχθηκε γιατί τα αυγά του zebrafish είναι βενθικά, και λόγω της έλλειψης της δυνατότητας κίνησης, είναι εκτεθειμένα στις επικρατούσες περιβαλλοντικές συνθήκες (Spence et al. 2007). Έχει παρατηρηθεί, ότι περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως υποθνησιγόνες συγκεντρώσεις ρύπων μπορεί να επηρεάσουν τα μετέπειτα στάδια της ανάπτυξης τους (Hicken et al. 2011). Επομένως στην παρούσα ερευνητική εργασία μελετήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης κατά το εμβρυικό στάδιο στην παρεγκεφαλίδα. Συγκεκριμένα, η παρεγκεφαλίδα ποικίλει μεταξύ των ατόμων όσον αφορά τα νευρωνικά δίκτυα και την ακαθόριστη μορφολογία της, καθώς συμμετέχει στον συντονισμό και την εκμάθηση κινήσεων, συνεισφέροντας στην ανάπτυξη διαφορετικών συμπεριφορών κολύμβησης (Hibi & Hashimoto 2012). Αλλαγές στο μέγεθος, την δομή και τα νευρωνικά δίκτυα της μπορεί να σηματοδοτούν την ανάπτυξη διαφορετικών συμπεριφορών και προτύπων κολύμβησης (Haesemeyer et al. 2018). Στη φύση, η ανάπτυξη του κατάλληλου προτύπου κίνησης συνδέεται με την αποφυγή θηρευτών, την μετανάστευση, την στρατολόγηση και την εύρεση τροφής (Spence et al. 2007). Ιδιαίτερα, η επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης (κατά το εμβρυϊκό στάδιο) στη μορφολογία του εγκεφάλου των ψαριών και των λειτουργιών οι οποίες ελέγχονται από αυτόν κατά τα μετέπειτα στάδια της ζωής τους (νύμφες, ιχθύδια και ενήλικα), δεν έχει μελετηθεί σε κανένα είδος. Οι φυσικοί πληθυσμοί zebrafish μπορεί να βιώνουν καθημερινές θερμοκρασιακές διακυμάνσεις της τάξης των 5 °C και επιβιώνουν εντός του θερμοκρασιακού εύρους 6 °C – 38 °C (Spence et al. 2007). Οι φυσικοί πληθυσμοί τυπικά αναπαράγονται κατά την περίοδο των μουσώνων, όπου η τροφή είναι άφθονη και οι θερμοκρασίες κυμαίνονται μεταξύ 23 °C και 31 °C (López-Olmeda and Sánchez-Vázquez 2011). Το εύρος των 24 °C – 32 °C θεωρήθηκε, ως κατάλληλο για την υπό έλεγχο υπόθεση.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Πειραματικός σχεδιασμός

Ο πειραματικός σχεδιασμός του πρωτοκόλλου περιλάμβανε δύο βιολογικές επαναλήψεις. Πιο αναλυτικά, πραγματοποιήθηκε σε κάθε επανάληψη έκθεση γονιμοποιημένων αυγών zebrafish σε διαφορετικές θερμοκρασίες (24 °C, 28 °C και 32 °C) κατά το εμβρυικό στάδιο, από το στάδιο του μοριδίου μέχρι την εκκόλαψη (2-3 dpf, ημέρες μετά τη γονιμοποίηση). Μετά την εφαρμογή των διαφορετικών συνθηκών και μόλις είχε εκκολαφθεί το 50 % των αυγών σε κάθε συνθήκη, οι λεκιθοφόρες νύμφες (στάδιο πριν την έναρξη της διατροφής) μεταφέρθηκαν σε κοινές συνθήκες (28 °C), όπου και παρέμειναν κατά το νυμφικό στάδιο, μέχρι και την μεταμόρφωση. Κατά τη διάρκεια της εκτροφής υπολογιζόταν ο ρυθμός αύξησης των πληθυσμών και προς το τέλος της μεταμόρφωσης, μόλις τα άτομα έφτασαν στο επιθυμητό μέγεθος (10,5 – 12,5 mm) πραγματοποιήθηκαν ιστολογικές τομές, με στόχο την εκτίμηση του σχετικού μεγέθους της παρεγκεφαλίδας και του ποσοστού των ενεργών νευρώνων της ως ανταπόκριση στην παρατεταμένη κολύμβηση.



Εικόνα 5: Πειραματικός σχεδιασμός της μελέτης. Γονιμοποιημένα έμβρυα εκτέθηκαν σε μία από τις τρεις θερμοκρασίες μέχρι την εκκόλαψη και μετά σε κοινές πειραματικές συνθήκες μέχρι το στάδιο της μεταμόρφωσης. Μόλις επιτεύχθηκε το επιθυμητό στάδιο, άτομα υποβλήθηκαν σε κρυτομές για μελέτη της μορφολογίας της παρεγκεφαλίδας αλλά και για ενεργοποίηση νευρώνων ως ανταπόκριση σε παρατεταμένη κολύμβηση.

2.2. Πειραματόζωα

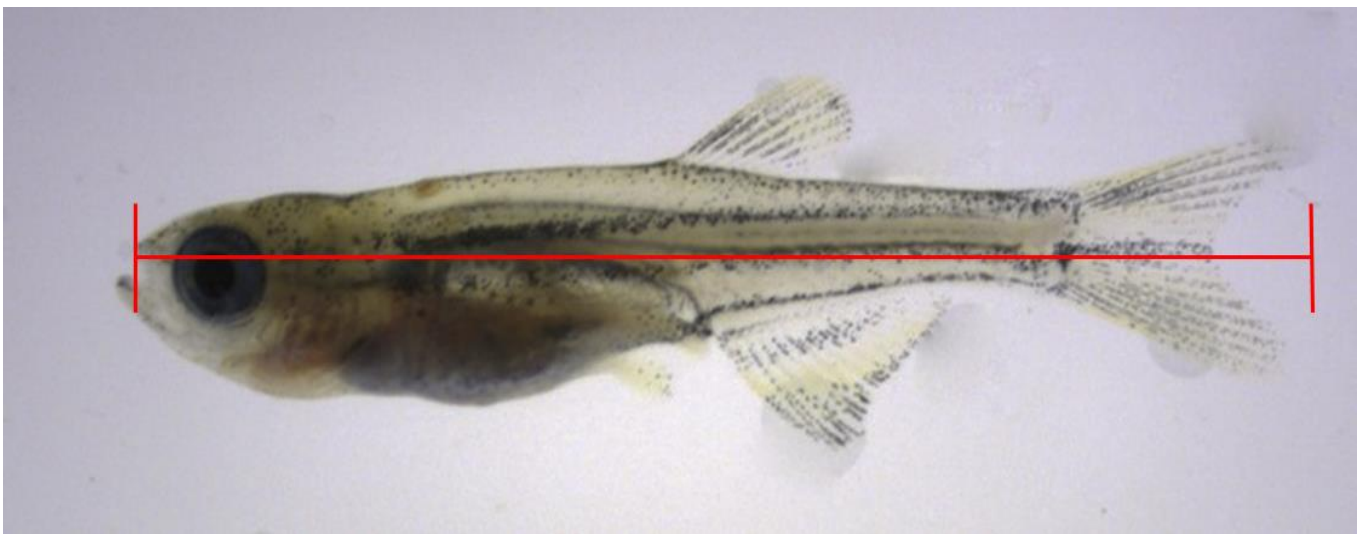
Για την συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε το zebrafish (*Danio rerio*) ως μοντέλο οργανισμός. Το μικρό μέγεθος και η ευκολία συντήρησης και αναπαραγωγής του zebrafish, καθώς και ο μικρός χρόνος γενεάς, ο συνεχής και μαζικός αναπαραγωγικός κύκλος και το υψηλό ποσοστό γονιμοποίησης, το καθιστούν αποτελεσματικό πειραματικό μοντέλο στην Μοριακή και Αναπτυξιακή Βιολογία των Σπονδυλωτών, στη Γενετική, καθώς επίσης στη Νευροβιολογία και την Τοξικολογία (Collin and Martin 2017). Το γεγονός ότι ακολουθεί το βασικό πρότυπο ανάπτυξης των τελεόστεων ιχθύων, συνδυαζόμενο με τα παραπάνω χαρακτηριστικά, το καθιστά ιδανικό μοντέλο και για τη μελέτη της περιβαλλοντικής βιολογίας των πρώιμων οντογενετικών σταδίων.

Τα zebrafish, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στις πειραματικές διαδικασίες προέρχονται από γεννήτορες, οι οποίοι διατηρούνται και εκτρέφονται στο Ζωοτροφείο του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης. Η διατήρηση και η εκτροφή των γεννητόρων πραγματοποιείται βάσει της μεθοδολογίας που περιγράφεται στο «The Zebrafish Book» (Westerfield 1995). Οι άγριου τύπου γεννήτορες διατηρούνται σε ενυδρεία χωρητικότητας 100L με πυκνότητα 3 άτομα/L. Τα ενυδρεία είναι εξοπλισμένα με ολοκληρωμένο κλειστό κύκλωμα επεξεργασίας του νερού. Η θερμοκρασία διατηρείται σταθερή στους 28 ± 1 °C, η φωτοπερίοδος στις 14 : 10 ώρες Φως : Σκοτάδι, το pH είναι ίσο με 7.0 - 7.2, η συγκέντρωση αμμωνιακών και νιτρώδων ιόντων διατηρείται μικρότερη του 0,1 mg/L, και ο κορεσμός του οξυγόνου στο νερό είναι 80-100%. Στα ενυδρεία, η ανανέωση του νερού γίνεται με ρυθμό 100% ανά ώρα, ενώ το σύνολο του κλειστού συστήματος υποβάλλεται σε 20% ανανέωση του νερού κάθε 3 μέρες. Το νερό των ενυδρείων προέρχεται από το νερό του αστικού δικτύου ύδρευσης αφού επεξεργάζεται με σύστημα αναστροφής ώσμωσης. Οι γεννήτορες ταΐζονται με ξηρή τροφή (Cichlid Omni, Ocean Nutrition). Η φωτοκία γίνεται αυθόρμητα χωρίς χρήση ορμονών. Τα ενυδρεία καθαρίζονται καθημερινά (σιφωνισμός) από περιττώματα και υπολείμματα τροφής.

2.3 Εγκλιματισμός και συντήρηση των πειραματικών πληθυσμών

Ανά βιολογική επανάληψη, συλλέχθηκαν περίπου 1200 γονιμοποιημένα αυγά, τα οποία μεταφέρθηκαν στις υπό έλεγχο συνθήκες (24, 28 και 32 °C, 400 αυγά/συνθήκη), με ρυθμό εγκλιματισμού 1 °C/ώρα και με συγκέντρωση οξυγόνου > 90%. Μόλις ολοκληρώθηκε ο εγκλιματισμός, επιλέχθηκαν τα έμβρυα τα οποία έφτασαν στο στάδιο της επιβολής (περίπου 200 έμβρυα/συνθήκη) να παραμείνουν στις εκάστοτε συνθήκες. Οι διαφορετικές θερμοκρασίες διατηρήθηκαν μέχρι την εκκόλαψη και στη συνέχεια οι λεκιθοφόρες νύμφες μεταφέρθηκαν σε

επωαστήρες στους 28 °C με ρυθμό εγκλιματισμού 1 °C/ώρα. Καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων, παρακολουθούνταν η θνησιμότητα των εμβρύων και ο κορεσμός του νερού σε οξυγόνο στα ενυδρεία και τους επωαστήρες διατηρούταν στο 80-95 %, το pH στο 7,0 - 7,5 και η αγωγιμότητα νερού ήταν 550 – 650 $\mu\text{S cm}^{-1}$. Οι νύμφες αρχικά ταΐζονταν με ζωντανή τροφή (*Artemia Nauplii* Instar 1), ενώ ακολούθως, τρέφονταν και ξηρά τροφή (*Zebrafeed*). Στις 18 dpf έγινε δειγματοληψία μεγέθους στους πληθυσμούς. Πιο αναλυτικά, το 30% περίπου του πληθυσμού σε κάθε συνθήκη χρησιμοποιήθηκε για παρακολούθηση του ρυθμού αύξησης. Τα ψάρια, τα οποία επιλέχθηκαν με τυχαίο τρόπο, αναισθητοποιήθηκαν ήπια με 2% φαινοξαιθανόλη (0,2 ml/L) και μετρήθηκε το ολικό τους μήκος (Total Length, TL). Τοποθετήθηκαν πλάγια στο στερεοσκόπιο, λήφθηκαν φωτογραφίες από την αριστερή μεριά του ψαριού και η μέτρηση του ολικού τους μήκους έγινε με τη χρήση του Software Infinity Analyze and Capture for Windows. Ως ολικό μήκος θεωρήθηκε η ευθεία απόσταση από την αρχή του ρύγχους του ψαριού μέχρι το τέλος του ουραίου πτερυγίου. Ακολούθησε εκτίμηση του μέσου όρου, της διασποράς και του συντελεστή μεταβλητότητας του TL κάθε πληθυσμού. Ακολούθως, οι πληθυσμοί διατηρήθηκαν μέχρι και το στάδιο της ενηλικίωσης σε σύστημα Zebtec stand alone (Techniplast Italy).



Εικόνα 6: Νύμφη zebrafish τοποθετημένη στο στερεοσκόπιο και μέτρηση του ολικού της μήκους.

2.4 Ιστολογικές τομές

Η προετοιμασία των ατόμων για την κρυοτόμο μπορεί να χωριστεί σε φάσεις με την εξής σειρά.

Φάση 1 – Μονιμοποίηση ιστού

Στις 20 - 21 dpf επιλέχθηκαν πάλι με τον ίδιο τρόπο άτομα, τα οποία το μέγεθος τους κυμαινόταν από 10,5 – 12,5 mm TL σε κάθε συνθήκη. Τα άτομα αυτά θυσιαστήκαν με εμβάπτιση σε διάλυμα 2-φαινόξυαιθανόλης (0,3 – 0,5 mg/L) για περίπου 10 λεπτά μέχρι να σταματήσει η κίνηση των βραγχιακών επικαλυμμάτων. Σε κάθε άτομο έγινε απομόνωση του κεφαλιού και τοποθετήθηκαν για μονιμοποίηση σε 1,5 ml ebbendorf με παραφορμαλδεύδη (PFA 4 %), στους 4 °C για 24 ώρες.

Παρασκευή PFA 4% formaldehyde solution σε PBS 1x

Σε 100 ml PBS 1x διαλύθηκαν 4 gr Paraformaldehyde powder σε θερμοκρασία ≈ 60 °C

Φάση 2 – Συντήρηση ιστού

Την επόμενη μέρα τα κεφάλια απομακρύνθηκαν από το μονιμοποιητικό και υποβλήθηκαν σε συνεχόμενες πλύσεις σε PBS 1x με την εξής σειρά: Αρχικά, 1 φορά για 5 λεπτά και μετά 2 φορές για 10 λεπτά με αλλαγή του PBS σε κάθε πλύση. Στη συνέχεια αφαιρέθηκε το PBS από τα κεφάλια, και τοποθετήθηκαν σε ebbendorf χωρητικότητας 1,5 ml με sucrose 30 % (σε PBS 1x) και παρέμειναν στους 4 °C μέχρι να καταβυθιστούν στο διάλυμα (1-2 μέρες).

Φάση 3 – Embedding ιστού

Ο εγκλεισμός πραγματοποιήθηκε με ζελατίνης – σουκρόζης (gelatin-sucrose). Σε petri-dish δημιουργήθηκε στρώση gelatin-sucrose, που χρησιμοποιήθηκε ως βάση, η οποία φυλάσσεται στους 4 °C μέχρι να στερεοποιηθεί. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν τα κεφάλια οριζόντια. Προστέθηκε μια επιπλέον στρώση gelatin-sucrose αρκετή για να καλύψει τα κεφάλια. Το petri-dish παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 15 λεπτά ώστε να στερεοποιηθεί ελαφρώς και μεταφέρθηκε στους 4 °C για περίπου 30 λεπτά. Τέλος, συμπληρώθηκε μια λεπτή στρώση gelatin-sucrose ώστε να καλυφθούν πλήρως τα κεφάλια και ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία.

Παρασκευή gelatin – sucrose

Σε 100 ml PBS 1x διαλύονται 15 γρ. σουκρόζης και 7,5 γρ. ζελατίνης και αναδεύονται σε θερμοκρασία 60° C. Το gelatin-sucrose μπορεί να διατηρείται στους -20 °C.

Φάση 4 – Πάγωμα ιστού

Το πάγωμα των κρανίων πραγματοποιήθηκε σε ισοπεντάνιο (2 Μέθυλο-βουτάνιο). Πιο συγκεκριμένα, σε δοχείο με ξηρό πάγο τοποθετήθηκε beaker με $\approx 60\text{ml}$ Methyl Butane (ισοπεντάνιο) του οποίου, η επιθυμητή θερμοκρασία του κυμαίνεται από $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ έως $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$. Αποκόπηκαν τα τμήματα του ψαριού, τα οποία δε θα χρησιμοποιούνταν στην κρυτοτόμο, και ο εγκλεισμένος ιστός διαμορφώθηκε κατάλληλα ανάλογα με τις τομές που πραγματοποιούνταν. Ο εγκλεισμένος ιστός, κολλήθηκε με OCT και βυθίστηκε στο Methyl Butane, αφού είχε ελεγχθεί η θερμοκρασία του με κατάλληλο θερμομόμετρο. Οι παγωμένοι ιστοί φυλάχθηκαν στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Φάση 5 – Ζελατινάρισμα Αντικειμενοφόρων πλακών

Για το ζελατινάρισμα των αντικειμενοφόρων πλακών, διαλύθηκαν 1,25 γρ. ζελατίνη σε 250 ml απεσταγμένου νερού (dH_2O). Στη συνέχεια, προστέθηκαν 0,125γρ. $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2$ για ανάδευση. Ακολούθως, τοποθετήθηκε το διάλυμα μέσα σε bath με τις αντικειμενοφόρους πλάκες για 15 λεπτά. Μόλις περάσαν τα 15 λεπτά, οι αντικειμενοφόροι πλάκες τοποθετήθηκαν σε φούρνο στους $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 24 ώρες. Την επόμενη μέρα ήταν έτοιμες για χρήση.

Φάση 6 – Λήψη τομών

Πραγματοποιήθηκαν συνεχόμενες τομές πάχους 10 μm και 20 μm σε κρυτοτόμο (LEICA) με κλίση 10° . Η φύλαξη των αντικειμενοφόρων πλακών έγινε στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.5 Χρώση Nissl

Το διάλυμα χρώσης που χρησιμοποιείται σε αυτό το πρωτόκολλο είναι το ιώδες του κρεσυλίου, το οποίο συνδέεται με νουκλεϊκά οξέα και τα χρωματίζει μπλε-ιώδες. Το ιώδες του κρεσυλίου δεσμεύεται με το DNA και βάφει τον πυρήνα, και περιοχές υψηλής συγκέντρωσης RNA, όπως είναι τα σωματίδια Nissl (Kádár et al. 2009). Τα σωματίδια Nissl είναι μεγάλα κοκκιώδη σωματίδια τα οποία μπορούν να βρεθούν συγκεκριμένα στο κυτταρόπλασμα των νευρώνων. Αποτελούνται από αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο με υψηλό ποσοστό ριβοσωμάτων και συμμετέχουν στη σύνθεση πρωτεϊνών (Kádár et al. 2009). Το ιώδες του κρεσυλίου διαπερνά όλα τα κύτταρα σε μια λεπτή φέτα εγκεφάλου, αλλά δεσμεύεται αποτελεσματικά μόνο σε δομές του κυτταρικού σώματος του νευρώνα (Kádár et al. 2009). Κατά συνέπεια, δύναται η δυνατότητα να υπολογιστεί ο αριθμός των κυτταρικών σωμάτων σε μια περιοχή μέσω του υπολογισμού του αριθμού των κηλίδων που έχουν βαφεί με Nissl και η παρατήρηση της περιοχής ενδιαφέροντος.

Για την συγκεκριμένη χρώση θυσιάστηκαν 10 άτομα ανά συνθήκη ανά βιολογική επανάληψη και υποβλήθηκαν σε συνεχόμενες τομές στην κρυοτόμο, με πάχος τομών 10 μm . Για την χρώση των τομών, ακολουθήθηκε το παρακάτω πρωτόκολλο (Chalkiadaki et al. 2019). Οι αντικειμενοφόροι πλάκες με τις τομές εμβαπτίστηκαν διαδοχικά σε αραιωμένες αλκοόλες ως εξής: 3 λεπτά σε αραιωμένη αιθανόλη 95%, 3 λεπτά σε αιθανόλη 70% και 3 λεπτά σε απεσταγμένο νερό (dH_2O). Στη συνέχεια παρέμειναν για 11 λεπτά σε Cresyl Violet Staining σε θερμοκρασία 60 $^{\circ}\text{C}$. Ακολουθήθηκαν συνεχόμενες αφυδατώσεις με την εξής σειρά : 3 λεπτά σε αιθανόλη 70%, 3 λεπτά σε αιθανόλη 95% και 10 εμβαπτίσεις σε καθαρή αιθανόλη 100%. Τέλος, παρέμειναν για 3 λεπτά σε ξυλένιο και σφραγίστηκαν με καλυπτρίδα με 90 μl EU Kitt. Αφέθηκαν overnight στην απαγωγό εστία και την επόμενη μέρα ήταν έτοιμα για παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο.

Παρασκευή διαλύματος Cresyl Violet Staining

Διάλυμα A:

0.2 γρ. Cresyl Violet Acetate σε 150 ml dH_2O

Διάλυμα B:

282 ml 0.1 M Acetic Acid (6 ml Glacier Acetic Acid/1000 ml dH_2O)

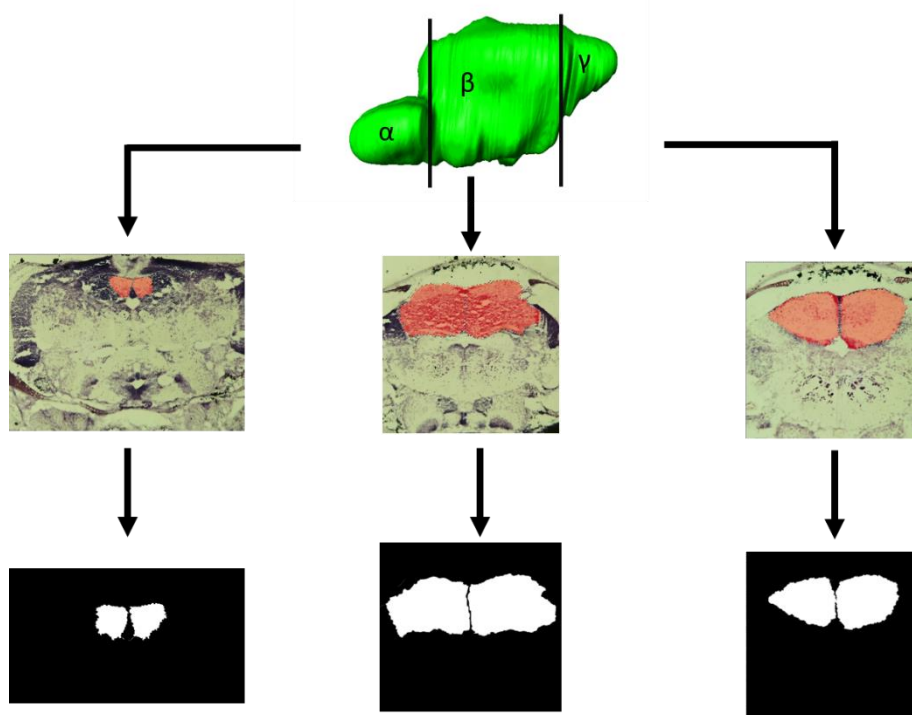
18 ml 0.1 M Sodium Acetate (13.6 γρ. σε 1000 ml dH_2O)

pH: 3.5

-Τα διαλύματα A και B αναμιγνύονται και παραμένουν σε αναδευτήρα overnight

2.6 Υπολογισμός Εμβαδού Παρεγκεφαλίδας

Οι τομές παρατηρήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο με 10 x μεγέθυνση φακού, συνδεδεμένο με κάμερα και λήφθηκαν φωτογραφίες με τη χρήση του προγράμματος Micro Capture Ver6.9. Ακολούθως, υπολογίστηκε το εμβαδόν της παρεγκεφαλίδας. Λόγω του πολύπλοκου σχήματός της, η παρεγκεφαλίδα χωρίστηκε σε 3 διακριτές υποπεριοχές, από τις οποίες υπολογιζόταν το εμβαδόν της κάθε υποπεριοχής ξεχωριστά. Πιο αναλυτικά, χωρίστηκε στην πρόσθια, η οποία αντιστοιχεί στην βαλβιδική περιοχή, την κεντρική η οποία αντιστοιχεί στην κύρια παρεγκεφαλίδα και την οπίσθια η οποία αντιστοιχεί στον ουραίο λοβό. Σε κάθε υποπεριοχή υπολογιζόταν το μέσο εμβαδόν από 3-4 τομές. Δεδομένου ότι σε προηγούμενες εργασίες έχει δειχθεί ότι η θερμοκρασία ανάπτυξης επηρεάζει της συμμετρία των εγκεφαλικών δομών (Pouca et al. 2018) οι μετρήσεις έγιναν για το κάθε ημισφαίριο ξεχωριστά. Η εκτίμηση του μεγέθους έγινε στο πρόγραμμα Adobe Photoshop και ακολουθήθηκε το μονοπάτι: Quick Selection Tool -> Επιλογή της επιθυμητής περιοχής -> Save Selection -> Channel -> Window -> Measurement Log -> Select Data -> Custom -> Area -> Record. Με αυτό το τρόπο υπολογίστηκε το εμβαδόν της παρεγκεφαλίδας, κάθε ψαριού, σε pixels, μετατράπηκε σε μm^2 και κανονικοποιήθηκε με το ολικό μήκος σώματος του ψαριού.



Εικόνα 7: Απεικόνιση της παρεγκεφαλίδας και των διακριτών περιοχών της (α, β, γ) (πάνω). Ακολουθούν φωτογραφίες ιστολογικών εγκάρσιων τομών με χρώση Nissl, όπου σκιαγραφούνται οι διακριτές περιοχές της (ενδιάμεσα) και ακολουθεί απεικόνιση του περιγράμματος της κάθε μίας (κάτω), το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό του εμβαδού.

Η επίδραση του περιβαλλοντικού παράγοντα στο μέγεθος της παρεγκεφαλίδας ελέγχθηκε με One Way Anova μεταξύ των τριών συνθηκών. Στη περίπτωση, όπου ο παράγοντας είχε σημαντική επίδραση, πραγματοποιήθηκαν post-hoc μέσες συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων, για κάθε υποπεριοχή της παρεγκεφαλίδας, με το test του Bonferroni ($\alpha = 0,05$), αφού προηγουμένως ελέγχθηκε η ομοιογένεια των διασπορών με το test του Levene.

2.7 Κολυμβήσεις

Στο στάδιο του ιχθυδίου, τυχαία άτομα, από κάθε συνθήκη, επιλέχθηκαν για να πραγματώσουν συνεχόμενες κολυμβήσεις, ώστε να μελετηθεί εάν η θερμοκρασία πρώιμης ανάπτυξης επηρεάζει την απόκριση της παρεγκεφαλίδας των ιχθυδίων έναντι της κολυμβητικής άσκησης. Πιο συγκεκριμένα σε κάθε μία από τις τρεις συνθήκες, 10 ψάρια αποτελούσαν την ομάδα ελέγχου, δηλαδή δεν κολυμπούσαν παρατεταμένα, και παράλληλα 10 ψάρια κολυμπούσαν συνεχόμενα για πέντε ώρες. Τα ψάρια κολυμπάγανε σε προσαρμοσμένη συσκευή κολύμβησης, η οποία διέθετε ένα κανάλι με διαστάσεις: 70 cm μήκος, 10 cm βάθος και 5 cm πλάτος. Τα ψάρια κολυμπούσαν στο κανάλι, στο οποίο η ρύθμιση ροής νερού έγινε με τη χρήση εξωτερικών μαγνητικών αντλιών και ρυθμιζόμενων βαλβίδων και οι έξοδοι του καναλιού κλείνονταν με καλαμάκια, τα οποία διατηρούσαν την στρωτή ροή και εμπόδιζαν τα ψάρια να διαφύγουν.

Τα zebrafish τείνουν να κολυμπούν συνεχόμενα στα ανοιχτά νερά, το οποίο προσομοιάζεται με το κανάλι κολύμβησης (Fuiman and Webb 1988). Παρ' όλα αυτά μπορούν να κολυμπούν και να στρίβουν στο ρεύμα, μόνο όταν η ταχύτητα ροής ισούται με την μέγιστη φυσική ταχύτητα τους, η οποία εκτιμάται ως 6,5 SL/s (Fuiman and Webb 1988). Σαν ταχύτητα ροής νερού προτιμήθηκαν τα 8 TL/s, γιατί ξεπερνώντας την μέγιστη φυσική ταχύτητάς τους, τα ψάρια δε γυρίζουν και κολυμπάνε συνεχόμενα αντίθετα στο ρεύμα (Plaut 2000). Επιπλέον, σε αυτές τις ταχύτητες εξασφαλίστηκε η ανταπόκριση των ψαριών στο ερέθισμα, που στη παρούσα εργασία είναι η ταχύτητα συνεχόμενης κολύμβησης.

Μετά το πέρασμα των 5 ωρών τα ψάρια σταμάτησαν την κολύμβηση και αφέθηκαν σε ηρεμία για 90 λεπτά μετά το τέλος της διαδικασίας, όπου η ενεργότητα του c-fos, όπως θα αναφερθεί στη συνέχεια είναι μέγιστη (Krukoff 2003). Μόλις πέρασαν τα 90 λεπτά ακολουθήθηκε η διαδικασία για ιστολογικές τομές (Ενότητα 2.4) με πάχος τομών 20 μm .

2.8 Ανοσοϊστοχημεία

Τα άμεσα πρώιμα γονίδια (immediate early genes, IEGs), σχετίζονται με τη ρύθμιση της ανάπτυξης και ενεργοποιούνται άμεσα από εξωκυττάρια ερεθίσματα, κωδικοποιώντας πρωτεΐνες απαραίτητες για τις ακόλουθες λειτουργίες του κυττάρου (Curran and Morgan 1995). Ένα τέτοιο γονίδιο είναι το c-Fos, το οποίο παράγει την πρωτεΐνη Fos, που αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες της οικογένειας Jun και ως πρωτεϊνικό σύμπλοκο δεσμεύονται στην πρωτεΐνη ενεργοποιητή I (activate protein AP- I) . Γονίδια, τα οποία διαθέτουν το σύμπλοκο AP – I ενεργοποιούνται από το σύμπλοκο Fos/Jun, επιτρέποντας έτσι την έκφραση γονιδίων, τα οποία εκφράζουν διάφορα νευρωνικά προϊόντα όπως οι νευροδιαβιβαστές, οι οποίοι παράγονται ως ανταπόκριση στο ερέθισμα (Krukoff 2003).

Ουσιαστικά, η έκφραση του c-fos αποτελεί δείκτη ενεργοποιημένων νευρώνων, ως ανταπόκριση σε κάποιο περιβαλλοντικό ερέθισμα. Η μεταγραφή του c – Fos πραγματοποιείται μέσα σε λίγα λεπτά από την εφαρμογή ενός ερεθίσματος, με τις μέγιστες ποσότητες mRNA να φτάνουν στα 90 λεπτά (Müller et al. 1984). Μία προσέγγιση για την μελέτη της παρουσίας του c- Fos είναι με ανοσοϊστοχημεία στους πυρήνες των νευρώνων. Αυτή η προσέγγιση γεφυρώνει το χάσμα μεταξύ των μορφολογικών δεδομένων και της σημασίας τους για τη φυσιολογία του οργανισμού. Η παρουσία του Fos δίνει τη δυνατότητα για την αναγνώριση των νευρώνων που συμμετέχουν σε μια συγκεκριμένη λειτουργία καθώς δίνεται και η δυνατότητα να γνωρίζουμε επακριβώς τη θέση των συγκεκριμένων νευρώνων (Krukoff 2003).

Για τη μελέτη της έκφρασης του γονιδίου c-Fos μετά τις κολυμβήσεις στα πειραματόζωα, οι αντικειμενοφόροι πλάκες με τις τομές επεξεργάστηκαν, ακολουθώντας το πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας με τη χρήση πρωτογενούς αντισώματος c-Fos (*c-Fos anti-rabbit polyclonal antibody*) για τον εντοπισμό της πρωτεΐνης Fos (Weymann et al. 2014). Πιο αναλυτικά, οι τομές αφέθηκαν για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Με τη χρήση pap pen δημιουργήθηκε γύρω από τις τομές υδρόφοβο φράγμα. Στη συνέχεια, οι τομές ξεπλύθηκαν 2 φορές για 5 λεπτά με PBS – Tween (0,1%) και επώαστηκαν σε Blocking Solution (PBS 0,1 M, pH = 7,4, 10% Fetal Bovine Serum, 0,3% Triton X100) για 1 ώρα. Αμέσως μετά οι τομές επώαστηκαν για 24 ώρες με το διάλυμα του πρώτου αντισώματος (1:1500 σε 2% FBS, PBS 0,1 M, pH = 7,4) στους 4 °C. Μετά από 3 ξεπλύματα με PBS 0,1 M για 5 λεπτά, οι τομές επώαστηκαν για 2 ώρες με το δευτερογενές αντίσωμα (*1:500 Goat anti-rabbit IgG Fluor Conjugate*) σε θερμοκρασία δωματίου μαζί με το blocking solution. Ακολούθησαν 1-2 ξεπλύματα των 5 λεπτών με PBS 0,1 M. Στη συνέχεια επώαστηκαν με διάλυμα RNase (1:200 RNaseA 0,001% Tween-20) στους 37 °C για 30 λεπτά. Ακολουθούν 1-2 ξεπλύματα των 5 λεπτών με PBS 0,1 M και επώαση με διάλυμα Propidium Iodide (1:1000 PI, 0,001% Tween-20) σε θερμοκρασία

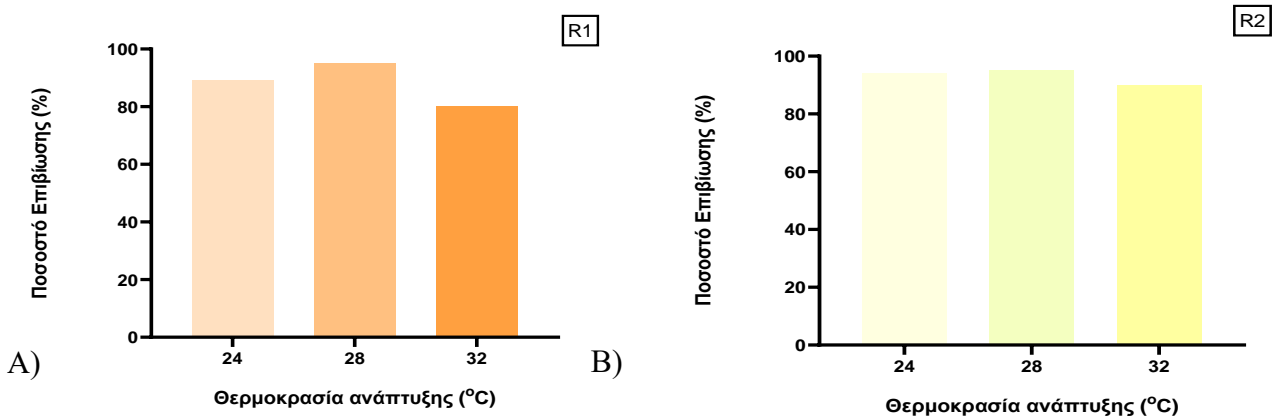
δωματίου για 7,5 λεπτά. Τέλος, έγιναν 1-2 ξεπλύματα των 5 λεπτών με PBS 0,1 M. Με την ολοκλήρωση της ανοσοϊστοχημείας, οι τομές καλύπτονταν με καλυπτρίδα χρησιμοποιώντας διάλυμα Mowiol και αφήνονταν στους 4 °C για μια ημέρα, πριν από την παρατήρηση σε μικροσκόπιο.

Φωτογραφίες για τα c-Fos θετικά κύτταρα της παρεγκεφαλίδας, λήφθηκαν με ανάστροφο συνεστιακό μικροσκόπιο συνδεδεμένο με κάμερα και με χρήση του προγράμματος Leica TCS software SP/NT, από 4 άτομα ανά συνθήκη. Οι υποπεριοχές της παρεγκεφαλίδας αρχικά αναγνωρίστηκαν σε χαμηλή ανάλυση (10x φακό), με βάση τον χάρτη (Zebbrain, Zebrafish Brain Atlas, National Institute of Genetics, Department of Gene Function and Phenomics Molecular and Developmental Biology, Kawakami Laboratory) και στη συνέχεια, με χρήση 20x φακού, λήφθηκε αριθμός μικροφωτογραφιών που κάλυπταν όλο το εύρος της περιοχής ενδιαφέροντος. Για κάθε μικροφωτογραφία λαμβάνονταν 4 συνεχόμενα συνεστιακά επίπεδα, ώστε να δημιουργηθεί ένα stack συνεχόμενων εικόνων και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ποιοτική ανάλυση των εικόνων.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

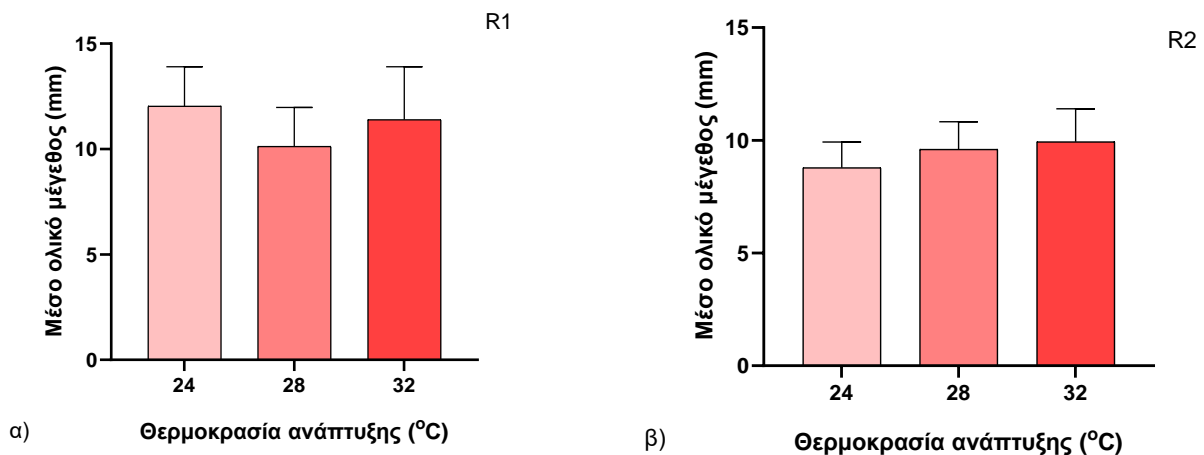
3.1 Εκκόλαψη και ρυθμός ανάπτυξης

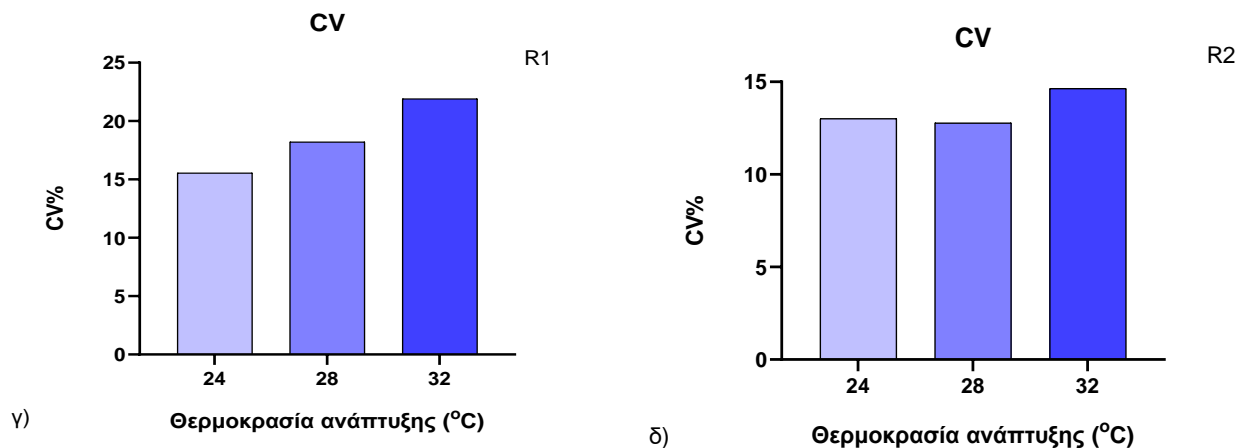
Τα γονιμοποιημένα αυγά τοποθετήθηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης μέχρι την εκκόλαψη. Κατά τη διάρκεια της παραμονής τους σε διαφορετικές συνθήκες, υπολογιζόταν το ποσοστό θνησιμότητας των πληθυσμών, το οποίο και στις δύο βιολογικές επαναλήψεις, σε κανέναν πληθυσμό δεν υπερέβαινε το 20%.



Εικόνα 8: Ποσοστό επιβίωσης των πληθυσμών των τριών διαφορετικών συνθηκών ανάπτυξης A) της πρώτης βιολογικής επανάληψης R1 και B) της δεύτερης R2.

Στις 18 dpf υπολογίστηκε ο ρυθμός ανάπτυξης και των τριών πληθυσμών (δείγμα >30 ατόμων, ανά πληθυσμό) σε κάθε βιολογική επανάληψη. Ενώ το μέσο ολικό μέγεθος διέφερε μεταξύ των βιολογικών επαναλήψεων, και στις δύο βιολογικές επαναλήψεις οι πληθυσμοί, οι οποίοι κατά το εμβρυικό στάδιο εκτέθηκαν στους 32°C παρουσίαζαν μεγαλύτερο συντελεστή μεταβλητότητας σε σχέση με τους άλλους δύο (Εικ. 7).

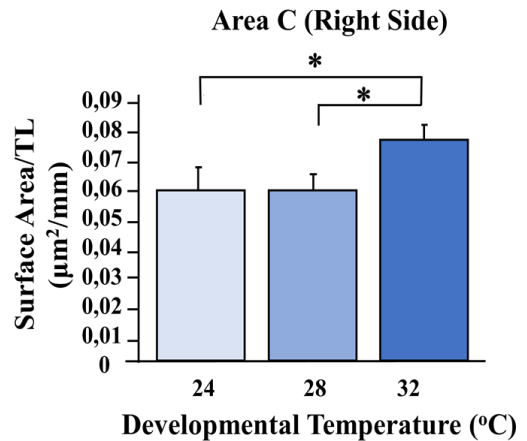
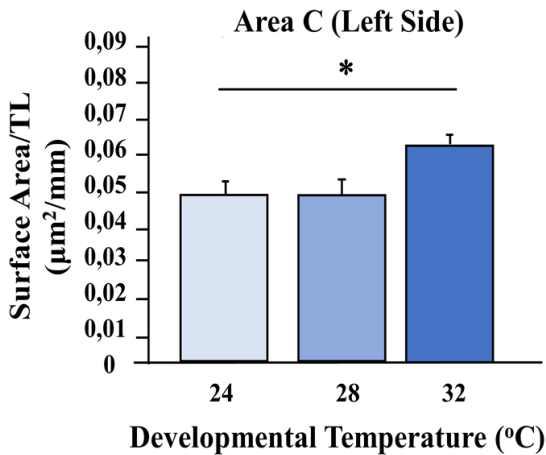
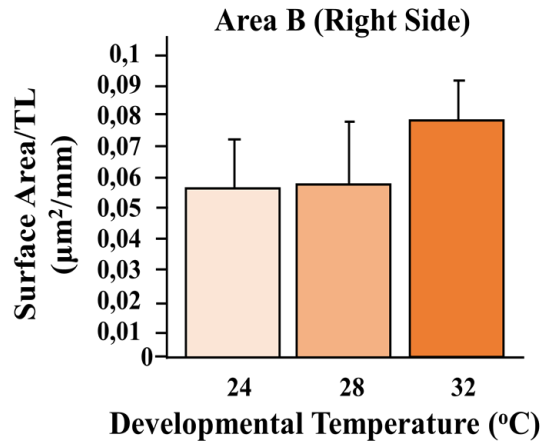
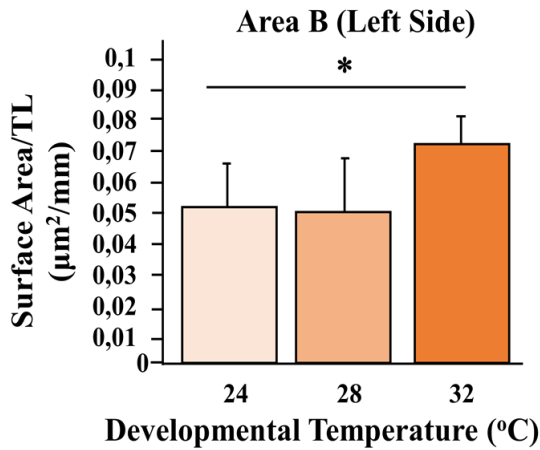
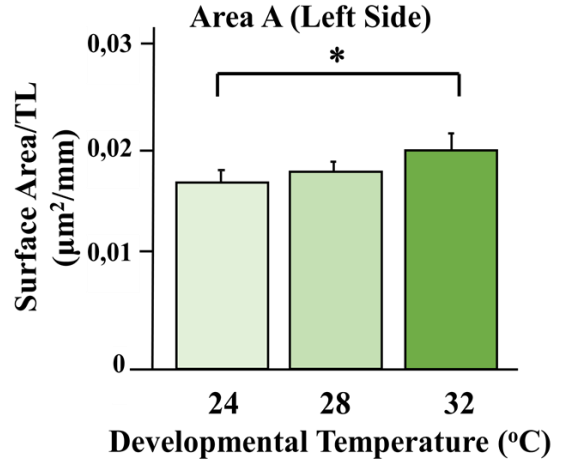
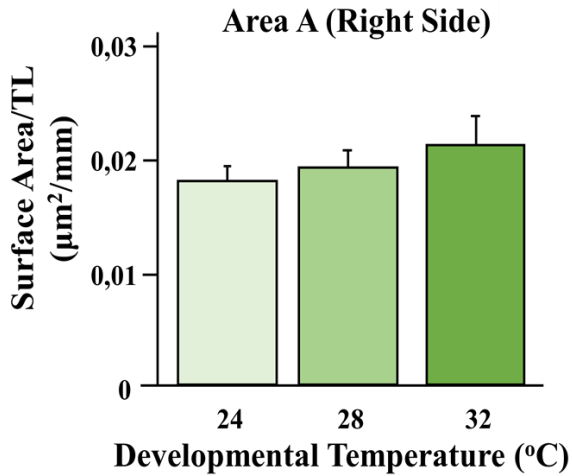




Εικόνα 9: Μέσος όρος του ολικού μεγέθους (Total Length, TL) των πληθυσμών των τριών διαφορετικών συνθηκών ανάπτυξης α) της πρώτης βιολογικής επανάληψης R1 και β) της δεύτερης R2 (πάνω). Επιπλέον απεικονίζεται και ο συντελεστής μεταβλητότητας (CV) για κάθε πληθυσμό γ) της πρώτης βιολογικής επανάληψης και δ) της δεύτερης (κάτω).

3.2 Μορφολογία Παρεγκεφαλίδας

Τα αποτελέσματα από την εκτίμηση μεγέθους των τριών υποπεριοχών της παρεγκεφαλίδας έδειξαν ότι στη μεταμόρφωση (20 – 21 dpf), τα άτομα τα οποία εκτέθηκαν κατά το εμβρυικό στάδιο στους 32 °C είχαν σημαντικά μεγαλύτερο μέγεθος παρεγκεφαλίδας σε σχέση με τις άλλες δύο συνθήκες. Πιο αναλυτικά, όσο αφορά στο αριστερό ημισφαίριο της παρεγκεφαλίδας, η βαλβιδική περιοχή (υποπεριοχή A) είχε μεγαλύτερο εμβαδόν στα άτομα τα οποία εκτέθηκαν στους 32 °C σε σχέση με αυτά που εκτέθηκαν στους 24 °C, και η κύρια παρεγκεφαλίδα (υποπεριοχή B) διέφερε στατιστικά σημαντικά μεταξύ των 3 συνθηκών, με τα άτομα τα οποία εκτέθηκαν στους 32 °C να διέθεταν μεγαλύτερο εμβαδόν περιοχής. Τα αποτελέσματα επαναλαμβάνονταν και για τον ουραίο λοβό (υποπεριοχή Γ) στο αριστερό ημισφαίριο, και όσο αφορά το δεξί τα άτομα τα οποία είχαν εκτεθεί στους 32 °C κατά το εμβρυικό στάδιο, είχαν μεγαλύτερο εμβαδόν περιοχής σε σχέση με τις άλλες 2 ομάδες (Εικ. 8).

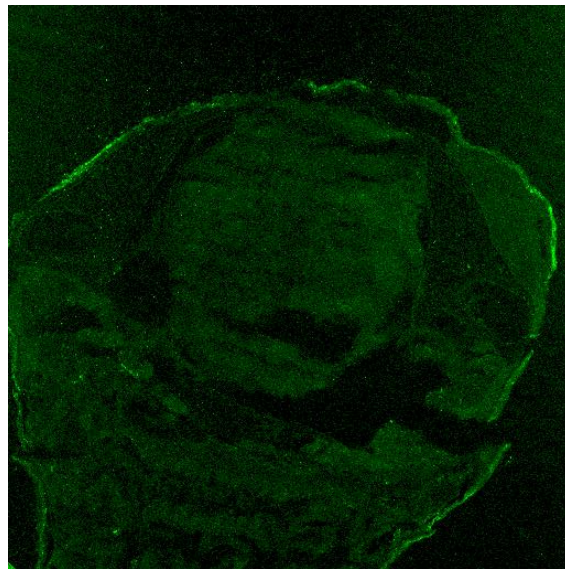


Εικόνα 10: Μέσος όρος του εμβαδού κάθε περιοχής της παρεγκεφαλίδας διαιρεμένο με το συνολικό μήκος του ψαριού (TL) ως προς τη θερμοκρασία ανάπτυξης. Συγκεκριμένα, απεικονίζονται οι διαφορές στο μέγεθος της Α. πρόσθιας, Β. κεντρικής και Γ. οπίσθιας υποπεριοχής στο δεξιό και αριστερό ημισφαίριο. Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (Bonferroni test, $df = 14$, $p < 0,05$). Οι γραμμές σφάλματος ισούνται με 1 SD.

3.3 Έκφραση πρωτεΐνης c-Fos

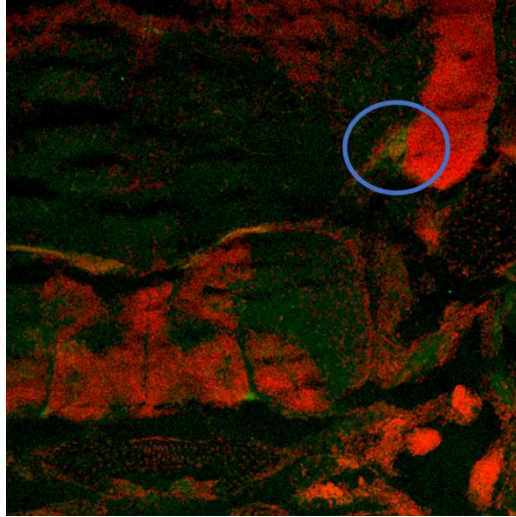
Για μελέτη της έκφρασης της πρωτεΐνης c-Fos, μετά από παρατεταμένη κολύμβηση, χρησιμοποιήθηκαν 4 άτομα ανά συνθήκη στα οποία εφαρμόστηκε το παραπάνω πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας. Μελετήθηκε ολόκληρος ο εγκέφαλος του ψαριού με έμφαση στην περιοχή της παρεγκεφαλίδας με βάση τον χάρτη Zebbrain, Zebrafish Brain Atlas (National Institute of Genetics, Department of Gene Function and Phenomics Molecular and Developmental Biology, Kawakami Laboratory).

Τα αποτελέσματα για την χρώση c-Fos, στην περιοχή της παρεγκεφαλίδας έδειξαν απουσία χρώσης για την πρωτεΐνη c-Fos, εκτός από ελάχιστα, σποραδικά καταναμημένα κύτταρα.



Εικόνα 11: Τομή του κύριου μέρους της παρεγκεφαλίδας (υποπεριοχή B) με 10x εστίαση, που δε φαίνεται χρώση c-Fos

Παρ' όλα αυτά κατά την παρατήρηση στο μικροσκόπιο παρατηρήθηκαν σημασμένα κύτταρα ενδιάμεσης έντασης κατά μήκος του εγκεφάλου. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκαν πολύ λίγα, σποραδικά καταναμημένα κύτταρα σε περιοχές του θαλάμου και του προμετωπιαίου φλοιού (pallium).



Εικόνα 12: Τομή με 20x εστίαση στην περιοχή του θαλάμου όπου φαίνεται χαμηλής έντασης χρώση c-Fos

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αποτελέσματα από την εκτίμηση μεγέθους των τριών υποπεριοχών της παρεγκεφαλίδας, στη παρούσα εργασία, έδειξαν ότι στη μεταμόρφωση (20 – 21 dpf), άτομα zebrafish τα οποία εκτέθηκαν κατά το εμβρυικό στάδιο στους 32°C είχαν σημαντικά μεγαλύτερο μέγεθος παρεγκεφαλίδας σε σχέση με τις άλλες δύο συνθήκες.

Όσο αφορά στην μεθοδολογία για την εκτίμηση των διαφορών μεγέθους της παρεγκεφαλίδας μεταξύ των διαφορετικών συνθηκών, έχει παρατηρηθεί ότι οι ιστολογικές μελέτες μπορεί να διαφέρουν όσον αφορά την εκτίμηση του μεγέθους ενός ιστού, σε σχέση με άλλες τεχνικές όπως τα micro-CTs (White & Brown 2015). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι κατά την προετοιμασία του ιστού, ο εγκέφαλος συρρικνώνεται κατά το στάδιο της αφυδάτωσης, με αποτέλεσμα να υπάρχουν διαφορές στις εκτιμήσεις μεγέθους (White & Brown 2015). Στη παρούσα όμως μελέτη, ακολουθήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο και για τους τρεις πληθυσμούς, με αποτέλεσμα οι διαφορές που παρατηρήθηκαν μεταξύ των διαφορετικών συνθηκών να μην επηρεάζονται από την μεθοδολογία.

Παρόμοιες ενδείξεις έχουν παρατηρηθεί στο είδος *Gasterosteus aculeatus*, όπου άτομα τα οποία διαβίωναν σε θερμότερα νερά μέχρι και το στάδιο της ενηλικίωσης εμφάνιζαν μεγαλύτερο μέγεθος εγκεφάλου και πιο συγκεκριμένα επιμέρους περιοχών του όπως η παρεγκεφαλίδα, το άνω διδύμιο και ο ραχιαίος μυελός (Toli et al. 2017). Η παρεγκεφαλίδα αποτελεί μια δομή, η οποία συμμετέχει στον συντονισμό και την κίνηση των νυμφών μετά τη μεταμόρφωση. Αλλαγές στο μέγεθος, την δομή και τα νευρωνικά δίκτυα της μπορεί να σηματοδοτούν την ανάπτυξη διαφορετικών συμπεριφορών και προτύπων κολύμβησης (Haesemeyer et al. 2018). Για παράδειγμα, η θερμοκρασία ανάπτυξης επηρεάζει και την ασυμμετρία του εγκεφάλου σε ελασμοβράγχιους, επηρεάζοντας τις μετέπειτα συμπεριφορικές αποκρίσεις που στηρίζονται σε αυτές τις ασυμμετρίες, όπως είναι η συμπεριφορά πλευρίωσης (Pouca et al. 2018). Αυτό παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τη ζωή των ψαριών, αφού τα πρότυπα κίνησης συνδέονται με την αποφυγή θηρευτών, την μετανάστευση, το ζευγάρισμα, την εύρεση τροφής αλλά την στρατολόγηση που είναι ιδιαίτερα σημαντική στο στάδιο μετά τη μεταμόρφωση, στο οποίο και πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα (Fuiman et al. 2006).

Η θερμοκρασία περιβάλλοντος είναι ένας από τους παράγοντες που επηρεάζει την φυσιολογία των εκτόθεμων οργανισμών και μπορεί να επηρεάσει επιμέρους δομές και λειτουργίες. Η θερμοκρασία επηρεάζει την φυσιολογία των οργανισμών, εξαιτίας της επίδρασης της στην ταχύτητα των βιοχημικών αντιδράσεων (Podolsky 1993). Επομένως, είναι πιθανό ότι κατά τη δημιουργία του νευρικού σωλήνα κατά το εμβρυικό στάδιο, η θερμοκρασία περιβάλλοντος να επηρεάζει την οριοθέτηση των διάφορων περιοχών του εγκεφάλου, με επακόλουθο να παρατηρούνται διαφορές όσο

αφορά το μέγεθος αυτών των περιοχών, μεταξύ ατόμων που έχουν εκτεθεί σε διαφορετικές θερμοκρασίες περιβάλλοντος (Kani et al. 2010; Podolsky 1993). Για περαιτέρω ανάλυση ενδεχομένως θα πρέπει οι διαφορές σε μια συγκεκριμένη υποπεριοχή του εγκεφάλου, να συγκριθούν με τις υπόλοιπες υποπεριοχές και το ολικό μέγεθος του εγκεφάλου.

Όσο αφορά την ενεργότητα των νευρώνων είναι γνωστό ότι ενεργοποίηση διαφορετικών νευρώνων μπορεί να επάγει την ανάπτυξη διαφορετικών μοτίβων κίνησης και συμπεριφορών (Haesemeyer et al. 2018). Ένας παράγοντας που μπορεί να επηρεάσει την μορφολογία του εγκεφάλου και πιθανώς να οδηγήσει στην ανάπτυξη κάποιας διαφορετικής συμπεριφοράς είναι η θερμοκρασία ανάπτυξης (Toli et al. 2017; Haesemeyer et al. 2018; Rouca et al. 2018). Στη παρούσα ερευνητική εργασία, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των ατόμων τα οποία εκτέθηκαν κατά το εμβρυικό στάδιο σε διαφορετικές θερμοκρασίες, όσο αφορά την έκφραση του γονιδίου c-fos στην παρεγκεφαλίδα μετά από παρατεταμένη κολύμβηση. Αυτό ίσως, οφείλεται στο γεγονός ότι η παρεγκεφαλίδα είναι μια υποδομή του εγκεφάλου που συμμετέχει στην εκμάθηση και τον συντονισμό κινήσεων (Hashimoto and Hibi 2012), ενώ δομές όπως ο ραχιαίος μυελός να συμβάλουν στην ανάπτυξη νέων κινήσεων, που σχετίζονται περισσότερο με την κολύμβηση (Haesemeyer et al. 2018). Ενεργότητα των γονιδίων c-fos παρατηρήθηκε σε περιοχές του θαλάμου και του pallium, ενδεχομένως λόγω του γεγονότος ότι οι συγκεκριμένες περιοχές συμμετέχουν στην γνωστική ευελιξία των ζώων και στο να προσαρμόζονται σε νέα περιβάλλοντα καθώς και σαν ανταπόκριση στο stress στο οποίο υποβλήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία (Krukoff 2003; White and Brown 2015; Toli et al. 2017). Επομένως σαν συνέχεια της πειραματικής διαδικασίας προτείνεται να μελετηθούν οι διαφορές μεταξύ της ενεργότητας αυτών των περιοχών, μεταξύ των τριών συνθηκών.

Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα, είναι σημαντικά γιατί παρά τη μεγάλη λειτουργική σημασία του εγκεφάλου, λίγες είναι οι εργασίες οι οποίες έχουν ασχοληθεί με την ανταπόκριση του σε διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες καθώς και με τις μακροχρόνιες επιδράσεις τους σε αυτόν. Ιδιαίτερα, η επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης (μόνο κατά το εμβρυϊκό στάδιο) στη μορφολογία του εγκεφάλου των ψαριών και των λειτουργιών οι οποίες ελέγχονται από αυτόν κατά τα μετέπειτα στάδια της ζωής τους (νύμφες, ιχθύδια και ενήλικα), δεν έχει μελετηθεί σε κανένα είδος.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Acampora, Dario. 1999. "Otx Genes in Corticogenesis and Brain Development." *Cerebral Cortex* 9 (6): 533–42. <https://doi.org/10.1093/cercor/9.6.533>.
- Agrawal, Anurag. 2001. "Phenotypic Plasticity in the Interactions and Evolution of Species." *Science* 294 (5541): 321–26. <https://doi.org/10.1126/science.1060701>.
- Bisazza, Angelo, and Marco Dadda. 2005. "Enhanced Schooling Performance in Lateralized Fishes." *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 272 (1573): 1677–81. <https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3145>.
- Chalkiadaki, Kleanthi, Aggeliki Velli, Evangelos Kyriazidis, Vasiliki Stavroulaki, Vasilis Vouvoutsis, Ekaterini Chatzaki, Michalis Aivaliotis, and Kyriaki Sidiropoulou. 2019. "Development of the MAM Model of Schizophrenia in Mice: Sex Similarities and Differences of Hippocampal and Prefrontal Cortical Function." *Neuropharmacology* 144 (April 2018): 193–207. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.10.026>.
- Collin, John, and Paul Martin. 2017. "Zebrafish as a Research Organism." In *Basic Science Methods for Clinical Researchers*, 235–61. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803077-6.00013-8>.
- Cosacak, Mehmet Ilyas, Christos Papadimitriou, and Caghan Kizil. 2015. "Regeneration, Plasticity, and Induced Molecular Programs in Adult Zebrafish Brain." *BioMed Research International* 2015: 1–10. <https://doi.org/10.1155/2015/769763>.
- Curran, Tom, and James I. Morgan. 1995. "Fos: An Immediate-early Transcription Factor in Neurons." *Journal of Neurobiology* 26 (3): 403–12. <https://doi.org/10.1002/neu.480260312>.
- Dimitriadi, Anastasia, Dimitris Beis, Christos Arvanitidis, Dominique Adriaens, and George Koumoundouros. 2018. "Developmental Temperature Has Persistent, Sexually Dimorphic Effects on Zebrafish Cardiac Anatomy." *Scientific Reports* 8 (1): 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25991-8>.
- Dohaku, Ryuji, Masahiro Yamaguchi, Naoyuki Yamamoto, and Takashi Shimizu. 2019. "Tracing of Afferent Connections in the Zebrafish Cerebellum Using Recombinant Rabies Virus." *Frontiers in Neural Circuits* 13 (April): 1–15. <https://doi.org/10.3389/fncir.2019.00030>.
- Fuiman, Lee A., and Paul W. Webb. 1988. "Ontogeny of Routine Swimming Activity and Performance in Zebra Danios (Teleostei: Cyprinidae)." *Animal Behaviour* 36 (1): 250–61. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(88\)80268-9](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(88)80268-9).
- Georga, Ioanna, and George Koumoundouros. 2010. "Thermally Induced Plasticity of Body Shape in Adult Zebrafish Danio Rerio (Hamilton, 1822)." *Journal of Morphology* 271 (11): 1319–27.

<https://doi.org/10.1002/jmor.10874>.

- Gilbert, Scott F. 2001. "Ecological Developmental Biology: Developmental Biology Meets the Real World." *Developmental Biology* 233 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0210>.
- Gonzalez-Voyer, Alejandro, Svante Winberg, and Niclas Kolm. 2009. "Social Fishes and Single Mothers: Brain Evolution in African Cichlids." *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 276 (1654): 161–67. <https://doi.org/10.1098/rspb.2008.0979>.
- Haesemeyer, Martin, Drew N. Robson, Jennifer M. Li, Alexander F. Schier, and Florian Engert. 2015. "The Structure and Timescales of Heat Perception in Larval Zebrafish." *Cell Systems* 1 (5): 338–48. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2015.10.010>.
- . 2018. "A Brain Wide Circuit Model of Heat Evoked Swimming Behavior in Larval Zebrafish." *SSRN Electronic Journal* 98 (4): 1–15. <https://doi.org/10.2139/ssrn.3155628>.
- Hashimoto, Mitsuhiro, and Masahiko Hibi. 2012. "Development and Evolution of Cerebellar Neural Circuits." *Development, Growth & Differentiation* 54 (3): 373–89. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2012.01348.x>.
- Hibi, Masahiko, Koji Matsuda, Miki Takeuchi, Takashi Shimizu, and Yasunori Murakami. 2017. "Evolutionary Mechanisms That Generate Morphology and Neural-Circuit Diversity of the Cerebellum." *Development, Growth & Differentiation* 59 (4): 228–43. <https://doi.org/10.1111/dgd.12349>.
- Hicken, Corinne E., Tiffany L. Linbo, David H. Baldwin, Maryjean L. Willis, Mark S. Myers, Larry Holland, Marie Larsen, et al. 2011. "Sublethal Exposure to Crude Oil during Embryonic Development Alters Cardiac Morphology and Reduces Aerobic Capacity in Adult Fish." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (17): 7086–90. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019031108>.
- Hutcheon, James M., John A.W. Kirsch, and Theodore Garland Jr. 2002. "A Comparative Analysis of Brain Size in Relation to Foraging Ecology and Phylogeny in the Chiroptera." *Brain, Behavior and Evolution* 60 (3): 165–80. <https://doi.org/10.1159/000065938>.
- Kádár, Andrea, Gábor Wittmann, Zsolt Liposits, and Csaba Fekete. 2009. "Improved Method for Combination of Immunocytochemistry and Nissl Staining." *Journal of Neuroscience Methods* 184 (1): 115–18. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2009.07.010>.
- Kani, Shuichi, Young-Ki Bae, Takashi Shimizu, Koji Tanabe, Chie Satou, Michael J Parsons, Ethan Scott, Shin-ichi Higashijima, and Masahiko Hibi. 2010. "Proneural Gene-Linked Neurogenesis in Zebrafish Cerebellum." *Developmental Biology* 343 (1–2): 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.03.024>.
- Kolm, Niclas, Alejandro Gonzalez-Voyer, Daniel Brelín, and Svante Winberg. 2009. "Evidence for

Small Scale Variation in the Vertebrate Brain: Mating Strategy and Sex Affect Brain Size and Structure in Wild Brown Trout (*Salmo Trutta*).” *Journal of Evolutionary Biology* 22 (12): 2524–31. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2009.01875.x>.

Kotrschal, Alexander, Katja Räsänen, Bjarni K. Kristjánsson, Mike Senn, and Niclas Kolm. 2012. “Extreme Sexual Brain Size Dimorphism in Sticklebacks: A Consequence of the Cognitive Challenges of Sex and Parenting?” Edited by Andrew Iwaniuk. *PLoS ONE* 7 (1): e30055. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030055>.

Kreke, Nicola, and Daniel R. Dietrich. 2008. “Critical Reviews in Toxicology Physiological Endpoints for Potential SSRI Interactions in Fish Physiological Endpoints for Potential SSRI Interactions in Fish.” *Critical Reviews in Toxicology* 38 (3): 215–47. <https://doi.org/10.1080/10408440801891057>.

Krukoff, Teresa L. 2003. “C-Fos Expression as a Marker of Functional Activity in the Brain: Immunohistochemistry.” In *Cell Neurobiology Techniques*, 213–30. New Jersey: Humana Press. <https://doi.org/10.1385/0-89603-510-7:213>.

Loizides, Michael, Eustathia Georgakopoulou, Maria Christou, Maria Iliopoulou, Ioannis E. Papadakis, Pantelis Katharios, Paschal Divanach, and George Koumoundouros. 2014. “Thermally-Induced Phenotypic Plasticity in Gilthead Seabream *Sparus Aurata* L. (Perciformes, Sparidae).” *Aquaculture* 432 (August): 383–88. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.06.002>.

López-Olmeda, J.F., and F.J. Sánchez-Vázquez. 2011. “Thermal Biology of Zebrafish (*Danio Rerio*).” *Journal of Thermal Biology* 36 (2): 91–104. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2010.12.005>.

Matsui, Hideaki. 2017. “Dopamine System, Cerebellum, and Nucleus Ruber in Fish and Mammals.” *Development Growth and Differentiation* 59 (4): 219–27. <https://doi.org/10.1111/dgd.12357>.

Müller, Rolf, Rodrigo Bravo, Jean Burckhardt, and Tom Curran. 1984. “Induction of C-Fos Gene and Protein by Growth Factors Precedes Activation of c-Myc.” *Nature* 312 (5996): 716–20. <https://doi.org/10.1038/312716a0>.

Munday, Phillip, Michael J. Kingsford, Mark O’Callaghan, and Jennifer M. Donelson. 2008. “Elevated Temperature Restricts Growth Potential of the Coral Reef Fish *Acanthochromis Polyacanthus*.” *Coral Reefs* 27 (4): 927–31. <https://doi.org/10.1007/s00338-008-0393-4>.

Picker, Alexander, Caroline Brennan, Frank Reifers, Jonathan D.W. Clarke, Nigel Holder, and Michael Brand. 1999. “Requirement for the Zebrafish Mid-Hindbrain Boundary in Midbrain Polarisation, Mapping and Confinement of the Retinotectal Projection.” *Development* 126 (13): 2967–78.

- <http://pubget.com/paper/10357940%5Cnhttp://dev.biologists.org/cgi/reprint/126/13/2967.pdf>.
- Plaut, Itai. 2000. "Effects of Fin Size on Swimming Performance, Swimming Behaviour and Routine Activity of Zebrafish *Danio Rerio*." *The Journal of Experimental Biology* 203 (Pt 4): 813–20. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10648223>.
- Podolsky, R D. 1993. "Separating the Effects of Temperature and Viscosity on Swimming and Water Movement By Sand Dollar Larvae (*Dendraster Excentricus*)." *Journal of Experimental Biology* 176 (1): 207–22.
- Poloczanska, Elvira S., Christopher J. Brown, William J. Sydeman, Wolfgang Kiessling, David S. Schoeman, Pippa J. Moore, Keith Brander, et al. 2013. "Global Imprint of Climate Change on Marine Life." *Nature Climate Change* 3 (10): 919–25. <https://doi.org/10.1038/nclimate1958>.
- Pouca, Catarina Vila, Connor Gervais, Joshua Reed, and Culum Brown. 2018. "Incubation under Climate Warming Affects Behavioral Lateralisation in Port Jackson Sharks." *Symmetry* 10 (6): 184. <https://doi.org/10.3390/sym10060184>.
- Reifers, Frank, Heike Böhli, Emily C. Walsh, Phillip H. Crossley, Didier Y. R. Stainier, and Michael Brand. 1998. "Fgf8 Is Mutated in Zebrafish Acerebellar (Ace) Mutants and Is Required for Maintenance of Midbrain-Hindbrain Boundary Development and Somitogenesis." *Development (Cambridge, England)* 125 (13): 2381–95. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9609821>.
- Scalise, Karina, Takashi Shimizu, Masahiko Hibi, and Nathaniel B. Sawtell. 2016. "Responses of Cerebellar Purkinje Cells during Fictive Optomotor Behavior in Larval Zebrafish." *Journal of Neurophysiology* 116 (5): 2067–80. <https://doi.org/10.1152/jn.00042.2016>.
- Schepers, Raf J., and Matthias Ringkamp. 2010. "Thermoreceptors and Thermosensitive Afferents." *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 34 (2): 177–84. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2009.10.003>.
- Sheridan, Jennifer A., and David Bickford. 2011. "Shrinking Body Size as an Ecological Response to Climate Change." *Nature Climate Change* 1 (8): 401–6. <https://doi.org/10.1038/nclimate1259>.
- Simpson, Stephen D., Philip L. Munday, Matthew L. Wittenrich, Rachel Manassa, Danielle L. Dixson, Monica Gagliano, and Hong Y. Yan. 2011. "Ocean Acidification Erodes Crucial Auditory Behaviour in a Marine Fish." *Biology Letters* 7 (6): 917–20. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2011.0293>.
- Spence, Rowena, Gabriele Gerlach, Christian Lawrence, and Carl Smith. 2007. "The Behaviour and Ecology of the Zebrafish, *Danio Rerio*." *Biological Reviews* 83 (1): 13–34. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2007.00030.x>.
- Toli, Elisavet A., Kristina Noreikiene, Jacquelin DeFaveri, and Juha Merilä. 2017. "Environmental

Enrichment, Sexual Dimorphism, and Brain Size in Sticklebacks.” *Ecology and Evolution* 7 (6): 1691–98. <https://doi.org/10.1002/ece3.2717>.

Weymann, Kris B., Lisa Wood, Xinxia Zhu, and Daniel L. Marks. 2014. “A Role for Orexin in Cytotoxic Chemotherapy-Induced Fatigue.” *Brain, Behavior, and Immunity* 37 (March): 84–94. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2013.11.003>.

White, Gemma, and Culum Brown. 2015. “Variation in Brain Morphology of Intertidal Gobies : A Comparison of Methodologies Used to Quantitatively Assess Brain Volumes in Fish Variation in Brain Morphology of Intertidal Gobies : A Comparison of Methodologies Used to Quantitatively Assess Brain V.” *Brain, Behavior and Evolution* 85 (4): 246–57.

Young, Larry J., Zuoxin Wang, and Thomas R. Insel. 1998. “Neuroendocrine Bases of Monogamy.” *Trends in Neurosciences* 21 (2): 71–75. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(97\)01167-3](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(97)01167-3).